

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
FMVZ – UNESP BOTUCATU**

**CARACTERIZAÇÃO DA HEMODINÂMICA UTERINA DE ÉGUAS
DURANTE O CICLO ESTRAL**

HELOÍSA DE SIQUEIRA CANESIN

**BOTUCATU – SP
ABRIL 2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
FMVZ – UNESP BOTUCATU**

**CARACTERIZAÇÃO DA HEMODINÂMICA UTERINA DE ÉGUAS
DURANTE O CICLO ESTRAL**

HELOÍSA DE SIQUEIRA CANESIN

**Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira
Co-Orientador: Prof. Dr. José Nicolau P.
P. Filho**

**BOTUCATU – SP
ABRIL 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Canesin, Heloísa de Siqueira.

Caracterização da hemodinâmica uterina de éguas durante o ciclo estral /
Heloísa de Siqueira Canesin. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira

Coorientador: José Nicolau Próspero Puoli Filho

Capes: 50504002

1. Égua. 2. Hemodinâmica. 3. Fluxo sanguíneo. 4. Hormônios
esteroidianos. 5. Doppler, ultra-sonografia.

Palavras-chave: Ciclo estral; Éguas; Estradiol; Perfusão vascular uterina;
Progesterona.

Nome do Autor: Heloísa de Siqueira Canesin

Título: CARACTERIZAÇÃO DA HEMODINÂMICA UTERINA DE ÉGUAS DURANTE O CICLO ESTRAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA – USP Pirassununga

Data da Defesa: 10 de abril de 2013.

“Os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, e sim aqueles que os descobriram.”

Albert Schweitzer

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

*Dedico este trabalho à minha mãe, meu escudo,
meu espelho, e ao meu segundo pai, Flamarion
Tenório de Albuquerque, meu eterno mestre.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Meira, que me proporcionou esta oportunidade, pela credibilidade e confiança. Por compartilhar e auxiliar na realização de meus objetivos, pela compreensão em todos os momentos e, principalmente, pela firmeza nas horas necessárias, me conduzindo sempre pelo melhor caminho.

À minha mãe por todos momentos dedicados. À ela que, muitas vezes, renunciou seus sonhos para que pudesse realizar os meus, nunca saberei agradecê-la.

À minha irmã pelo conforto nas horas mais difíceis.

Ao meu eterno orientador, mestre, e muitas vezes pai, Flamarion, pela amizade e exemplo, além dos inúmeros ensinamentos.

À Fernanda, mais do que uma colega, uma orientadora, uma amiga. Agradeço pela oportunidade, confiança, disponibilidade, por ter compartilhado comigo um pouco de seus conhecimentos e experiência profissional. À ela não basta o meu muito obrigada!

Ao Rafael, um irmão que ganhei no mestrado, não só por compartilhar as dificuldades, mas por trazer alegria a esta nossa caminhada.

À toda “Equipe Meira”, Yatta, Elisa, Luiz Fernando e Jair, por compartilharmos do mesmo sonho e objetivo.

Àqueles que, mais que colegas, foram amigos durante esta jornada, pelo carinho e companheirismo.

À Laura, por dividir tantas aflições, pela sabedoria, pelos conselhos, por mensalmente trazer alegria às nossas vidas.

Aos estagiários que tanto nos ajudaram. Àqueles que se tornaram companheiros, que compartilharam as dificuldades, e nos fizeram crescer durante todo este tempo, sem eles nada disso seria possível. Os meus agradecimentos especiais ao Bruno, Alexandre, João e Jordana.

À todos os funcionários da Reprodução Animal, pessoas fundamentais na realização de nossos objetivos.

Aos professores que me proporcionaram conhecimento para uma boa formação, muito obrigada! Em especial à Prof. Eunice e ao Prof. João, por auxiliarem nas inúmeras e incansáveis dosagens hormonais. Ao Prof. Pantoja, pelos ensinamentos, atenção e principalmente paciência, meus sinceros agradecimentos.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro em nossos projetos e bolsas de estudo.

Ao Fábio, por compartilhar um pouco do seu conhecimento conosco, pela disponibilidade e auxílio, à ele não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao Prof. Luciano, por ter nos recebido tão bem e, apesar do pouco tempo, por ter compartilhado um pouco da sua experiência.

Aos amigos e familiares que, mesmo de distantes, estavam sempre presentes.

Ao ReProduz, nunca me esquecerei do papel fundamental de vocês na minha formação.

Enfim, o meu sincero agradecimento a todos que, de alguma forma, compartilharam desta caminhada.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores p , por meio da análise pelo teste- t , para as variáveis respostas paramétricas durante o diestro e estro de 12 éguas.....	89
Tabela 2. Valores p , por meio da análise pelo teste- t , para as variáveis respostas paramétricas durante período peri-luteolítico de 12 éguas.....	89
Tabela 3. Coeficiente de correlação (r) e valores p , por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de diestro de 12 éguas.....	89
Tabela 4. Valores p , por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de diestro de 12 éguas.	90
Tabela 5. Coeficiente de correlação (r) e valores p , por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de estro de 12 éguas.	90
Tabela 6. Valores p , por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de estro de 12 éguas.	90
Tabela 7. Coeficiente de correlação (r) e valores p , por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período peri-luteolítico de 12 éguas.....	91
Tabela 8. Valores p , por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período peri-luteolítico de 12 éguas.....	91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vista dorsal do trato reprodutivo da égua. O trato foi rebatido para expor a superfície medial do ligamento largo e cornos uterinos. O infundíbulo esquerdo foi retraído, enquanto o infundíbulo direito foi colocado sobre a fossa da ovulação. A porção da prega transversa foi rebatida para expor o orifício uretral. Fonte: Ginther (1992).	3
Figura 2. Esquema representativo de uma secção do corno uterino da égua. Fonte: McKINNON et al. (2011).	4
Figura 3. Órgãos e suprimento vascular do sistema reprodutivo da égua. Fonte: Ginther (2007).	5
Figura 4. Exame ultrassonográfico Doppler modos B (A), <i>Color-flow</i> (B) e <i>Power-flow</i> (C). Corte transversal do corno uterino de égua, mostrando a diferença da intensidade de sinais coloridos nos diferentes modos.	8
Figura 5. Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral, em. Coleta de dados espectrais realizada em vasos de pequeno calibre presentes no mesométrio, em corte transversal do corno uterino de égua (A) e na artéria uterina (B).	9
Figura 6. Valores dos índices de pulsatilidade (PI) encontrados nas artérias uterinas dominante () e não dominante () ao longo de dois ciclos estrais de éguas. Os valores são médias±SD. Fonte: Bollwein et al. (2002).	10
Figura 7. Concentrações de sulfato de estrona de amostras diárias de sangue periférico. Fonte: Ginther (1992).	13

- Figura 8. Exame ultrassonográfico modo-B, em corte transversal de corno uterino de éguas não gestantes. Seleção de imagens representativas da classificação subjetiva do edema uterino em escores de 0 a 4, indicando ausência, baixo, moderado, elevado e máximo edema uterino, respectivamente..... 20
- Figura 9. Exame ultrassonográfico Doppler modo *Power-flow*, em corte transversal de corno uterino de éguas não gestantes. Seleção de imagens representativas da classificação subjetiva da perfusão vascular uterina (PVU) em um escore de 1 a 4, indicando baixa, moderada, elevada e máxima perfusão vascular, respectivamente..... 21
- Figura 10. Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral, em corte transversal do corno uterino de égua não gestante. Coleta de dados espectrais realizada em vasos de pequeno calibre presentes no mesométrio. 21
- Figura 11. Gráfico representativo da leitura da curva padrão de estradiol (5 a 500pg/ml de E2) pelo Radioimunoensaio (RIA). Os eixos x e y representam as concentrações de estradiol da curva padrão fornecida pelo kit comercial para dosagem de 17 β -estradiol humano (Estradiol Duplo Anticorpo; Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) e as respectivas contagens por minuto (CPM) pelo RIA..... 23
- Figura 12. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU - classificados em escores de 1 a 4), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o ciclo estral de 12 éguas. Asteriscos simples indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), asteriscos duplos indicam diferença estatística entre dois dias

- específicos, situados nas extremidades das linhas tracejadas ($p < 0,05$)..... 27
- Figura 13. Médias \pm EPM dos índices de resistência relativo (RI), pulsatilidade relativo (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva relativa (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o ciclo estral de 12 éguas. Os dados foram padronizados para o dia da ovulação, sendo os valores obtidos referentes à diferença em relação ao D0. Asteriscos simples indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), asteriscos duplos indicam diferença estatística entre dois dias específicos, situados nas extremidades das linhas tracejadas ($p < 0,05$)..... 28
- Figura 14. Médias \pm EPM do edema uterino, classificados em escores de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente), durante o ciclo estral de 12 éguas. Asteriscos indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), letras distintas indicam diferença estatística entre os dias no período de estro ($p < 0,05$)..... 29
- Figura 15. *Boxplots* para as concentrações plasmáticas de progesterona durante o ciclo estral de 12 éguas. As partes inferiores e superiores da caixa central representam os 25^o e 75^o percentis, respectivamente, a banda localizada no interior da mesma representa o 50^o percentil (mediana), as extremidades inferiores e superiores das barras representam o 5^o e 95^o percentis, respectivamente, enquanto os pontos externos são os valores extremos. Asteriscos indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$)..... 30
- Figura 16. *Boxplots* para as concentrações plasmáticas de estradiol durante o ciclo estral de 12 éguas. As partes inferiores e

- superiores da caixa central representam os 25° e 75° percentis, respectivamente, a banda localizada no interior da mesma representa o 50° percentil (mediana), as extremidades inferiores e superiores das barras representam o 5° e 95° percentis, respectivamente, enquanto os pontos externos são os valores extremos. Asteriscos simples indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), asteriscos duplos indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D1 ($p < 0,05$), letras distintas indicam diferença estatística entre os dias no período de estro ($p < 0,05$). 31
- Figura 17. Médias \pm EPM para as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o ciclo estral de 12 éguas. 31
- Figura 18. Médias \pm EPM da perfusão vascular uterina (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, classificados em escores de 1 a 4 (mínima e máxima, respectivamente), durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$). 32
- Figura 19. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o período peri-luteolítico de 12 éguas L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Asteriscos indicam diferença estatística entre os dois grupos nos momentos sinalizados ($p < 0,05$); letras distintas indicam diferença estatística entre os dias, desconsiderando o efeito do grupo ($p < 0,05$). 33

- Figura 20. Médias±EPM dos índices de resistência relativo (Rrel), pulsatilidade relativo (PIrel) e perfusão vascular uterina subjetiva relativa (PVUrel), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$)..... 35
- Figura 21. Médias±EPM do edema uterino, classificados em escores de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente), durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$). 36
- Figura 22. Médias±EPM das concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol, durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias, dentro da mesma variável ($p < 0,05$)..... 37
- Figura 24. Médias±EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o estro de 12 éguas. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05. 39
- Figura 26. Médias±EPM dos índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; edema uterino em um escore de

classificação de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente); concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

41

Figura 27. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; edema uterino em um escore de classificação de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente) durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

42

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Anatomia e histologia uterina.....	2
2.2. Ultrassonografia Doppler	6
2.3. Avaliação uterina por meio da ultrassonografia Doppler.....	8
2.4. Perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral.....	10
2.5. Fatores que influenciam a hemodinâmica uterina.....	12
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Animais	18
4.2. Delineamento Experimental.....	19
4.3. Avaliação ovariana.....	19
4.4. Avaliação uterina	20
4.5. Concentração plasmática dos hormônios esteroidais.....	22
4.6. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Diestro e estro.....	26
5.2. Período Peri-luteolítico.....	32
5.3. Correlação entre as variáveis respostas.....	37
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS	49
9. TRABALHO CIENTÍFICO	55
9.1. Trabalho enviado para revista “Equine Veterinary Journal”.....	55
9.2. Normas da revista “Equine Veterinary Journal”	83
Anexos.....	89

CANESIN, H.S. **Caracterização da hemodinâmica uterina de éguas durante o ciclo estral**. Botucatu, 2013. 91p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O útero, por ser o local de desenvolvimento do conceito, necessita de um exame criterioso, principalmente na avaliação e seleção de receptoras de embrião. A ultrassonografia Doppler permite uma avaliação não invasiva e em tempo real da hemodinâmica uterina. Em éguas, assim como em outras espécies, o útero sofre alterações fisiológicas ao longo do ciclo estral, reguladas pelos hormônios esteroidais, estrógeno (E2) e progesterona (P4), e por complexas interações entre fatores de crescimento locais secretados pelo útero. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a hemodinâmica uterina de éguas não gestantes, ao longo do ciclo estral, por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler de vasos de pequeno calibre, presentes no endométrio, miométrio e mesométrio e correlacioná-la às concentrações plasmáticas dos hormônios esteroidais. Para tanto, 12 éguas não gestantes foram acompanhadas diariamente, durante o intervalo interovulatório, para avaliação do edema e da perfusão vascular uterina. Amostras de sangue foram coletadas diariamente para análise de E2 e P4, por radioimunoensaio. A hemodinâmica uterina apresentou um padrão ondular durante o ciclo estral, com uma diminuição da irrigação no dia da ovulação e no final do diestro, e um aumento no início do diestro e no estro. As concentrações plasmáticas de P4 e de E2 apresentaram correlação negativa e positiva, respectivamente, com a perfusão vascular uterina apenas durante o estro. É muito provável que os hormônios esteroidais estejam envolvidos na regulação da perfusão vascular uterina durante o ciclo estral. No entanto, há diversos fatores mediadores envolvidos neste processo, como a expressão de seus receptores e interações hormonais, que ainda precisam ser explorados.

Palavras-chave: Perfusão vascular uterina, estradiol, progesterona, ciclo estral, éguas.

CANESIN, H.S. **Characterization of uterine hemodynamic in mares during the estrous cycle**. Botucatu, 2013. 91p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The uterus as the site of the conceptus development needs judicious examination, mainly for evaluation and selection of recipient mares. The Doppler ultrasound enables noninvasive evaluation in real-time of uterine hemodynamics. In mares, and also in other species, the uterus suffers physiological alterations during the estrous cycle, regulated by estrogen (E2) and progesterone (P4) hormones, and by complex interactions among local growth factors secreted by the uterus. The aim of this study was to characterize uterine hemodynamics of nonpregnant mares during the estrous cycle using Doppler ultrasonographic analysis in small vessels of the endometrium, myometrium and mesometrium, and correlate it to plasma concentrations of steroid hormones. For that purpose, 12 nonpregnant mares were daily followed, during interovulatory interval for evaluation of uterine edema and vascular perfusion. Blood samples were daily collected for analysis of plasma concentrations of steroid hormones using the radioimmunoassay technique. The uterine hemodynamics presented a wave shaped profile throughout the estrous cycle, with a decrease in the day of ovulation and last diestrus, and an increase in early diestrus and estrus. Negative and positive correlation between P4 and E2 plasma concentrations and uterine vascular perfusion, respectively, was found only during the estrus. The steroid hormones are probably involved in the uterine vascular perfusion regulation during the estrous cycle. However, there are also many mediated factors associated, such as expression of hormone receptors and hormonal interactions which still need to be investigated.

Keywords: uterine vascular perfusion, estrogen, progesterone, estrous cycle, mare.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias da reprodução assistida tem aumentado ao longo dos anos, sendo uma importante ferramenta na otimização do desempenho reprodutivo dos animais. O útero, por ser o local de desenvolvimento do conceito, necessita de um exame criterioso, especialmente na avaliação de matrizes e seleção de éguas receptoras de embriões. Até o presente momento, os exames complementares mais utilizados para avaliação e detecção de alterações uterinas na espécie equina têm sido o citológico, histológico e ultrassonográfico (McKINNON et al., 2011).

O sistema vascular é indispensável para manutenção e desempenho do trato reprodutivo, assim como para todos os outros sistemas do organismo animal. Por cumprir com a necessidade metabólica e auxiliar no transporte regulatório de substâncias, este sistema está diretamente relacionado não só ao suprimento hormonal, como também às variações fisiológicas do trato reprodutivo, refletindo as alterações ocorridas no local de estudo (GINTHER, 1992).

Nas últimas décadas, na medicina veterinária, iniciaram-se os estudos de uma ferramenta capaz de avaliar a perfusão vascular de tecidos e órgãos, de forma não invasiva e em tempo real: a ultrassonografia Doppler. Esta técnica é amplamente utilizada na medicina humana, além da aplicação crescente na medicina veterinária de pequenos animais. No entanto, ganhou especial importância na reprodução equina a partir da década de 90, sendo atualmente considerada uma das melhores técnicas disponíveis para o estudo *in vivo* da hemodinâmica. Ela adiciona informações do fluxo sanguíneo sobrepostas a uma imagem ultrassonográfica, em modo bidimensional (modo-B), da estrutura avaliada, possibilitando coletar informações anatômicas e funcionais do local de interesse (GINTHER & UTT, 2004).

Os principais estudos e aplicações da ultrassonografia Doppler na reprodução equina envolvem a avaliação da perfusão vascular de folículos, corpo lúteo (CL) e do útero.

Sabe-se que a perfusão vascular é influenciada por inúmeros fatores, tanto vasculares específicos, quanto por variações fisiológicas do organismo animal

(FORD, 1983; BOLLWEIN et al., 2002b). Desta forma, o trato reprodutivo feminino apresenta alterações periódicas vasculares e hormonais ao longo do ciclo estral. Entretanto, os fatores que desencadeiam estas modificações não estão completamente elucidados. Atualmente, há poucas informações sobre a perfusão vascular uterina ao longo de todo o ciclo estral, bem como os fatores vasoativos envolvidos.

Por ser a ultrassonografia Doppler uma técnica de aplicação recente na reprodução equina, a ausência da determinação de padrões da perfusão vascular do útero em processos fisiológicos e patológicos é um dos principais fatores limitantes da utilização desta técnica a campo, merecendo enfoque nos trabalhos atuais.

Recentemente, foi observado que alterações degenerativas no endométrio interferem na irrigação uterina de éguas (FERREIRA et al., 2008). Desta forma, o desenvolvimento de métodos eficazes para avaliação da qualidade do útero de éguas, objetiva principalmente a detecção de alterações relacionadas à fertilidade, apresentando grande importância não só em estudos científicos, como também para ser futuramente utilizada na rotina da prática veterinária (IGNÁCIO et al., 2011a).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e histologia uterina

A égua apresenta útero bipartido, com dois cornos e um proeminente corpo uterino. Está essencialmente situado na cavidade abdominal, mas estende-se por uma curta distância dentro da cavidade pélvica. As laterais do útero são unidas às paredes pélvicas e abdominais pelo ligamento largo (SISSON, 2008), sendo este o principal responsável pelo suprimento sanguíneo, linfático e nervoso do útero (Figura 1; GINTHER, 1992).

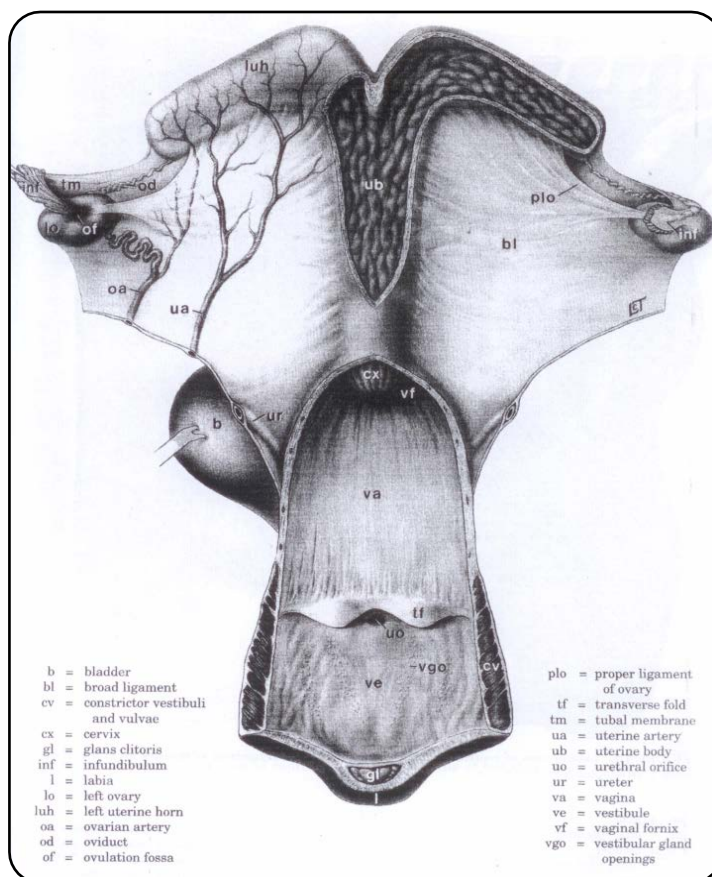


Figura 1. Vista dorsal do trato reprodutivo da égua. O trato foi rebatido para expor a superfície medial do ligamento largo e cornos uterinos. O infundíbulo esquerdo foi retraído, enquanto o infundíbulo direito foi colocado sobre a fossa da ovulação. A porção da prega transversa foi rebatida para expor o orifício uretral. Fonte: Ginther (1992).

Histologicamente, o útero é composto por três camadas: serosa (perimétrio), muscular (miométrio) e mucosa (endométrio). A túnica serosa está, em sua maior parte, aderida à túnica muscular, sendo uma continuação dos ligamentos largos do útero (GINTHER, 1992; SISSON, 2008).

O miométrio é dividido em dois extratos: o primeiro se apresenta como uma camada espessa, interna, formada por fibras circulares e o segundo é delgado e externo, composto por fibras longitudinais (Figura 2). Entre estas duas camadas musculares, encontra-se uma de tecido conjuntivo, altamente vascularizada (GINTHER, 1992; SISSON, 2008).

O endométrio está em contato direto com o miométrio, sendo composto por um revestimento epitelial e pela lâmina própria (Figura 2). O epitélio luminal do endométrio é secretório, composto por células altas e colunares. O epitélio pseudoestratificado, encontrado em outras espécies, pode ocorrer durante o

estro nas éguas. As células podem ser ciliadas, no entanto alterações consideráveis no padrão ciliado ocorrem ao longo do ciclo estral (GINTHER, 1992).

A lâmina própria é composta por duas camadas (Figura 2): o estrato compacto, que está em contato com o tecido epitelial, possui aproximadamente 1 mm de espessura e contém alta densidade de células estromais estreladas. O estrato esponjoso é um arranjo frouxo interligando células, com considerável fluido intersticial. A lâmina própria do útero contém glândulas que se estendem por toda sua espessura, apresentando abertura em sua superfície epitelial (GINTHER, 1992).

As glândulas endometriais são ramificadas, tubulares e altamente espiraladas nas éguas. Estas dobras glandulares se alteram consideravelmente ao longo do ciclo estral. As glândulas podem ter 10 ou mais ramificações. O epitélio é simples e colunar, com mudanças consideráveis entre as estações ovulatórias e anovulatórias, sendo encontrado na segunda um epitélio cuboidal, com estroma denso e glândulas lineares, indicativo de inatividade (GINTHER, 1992).

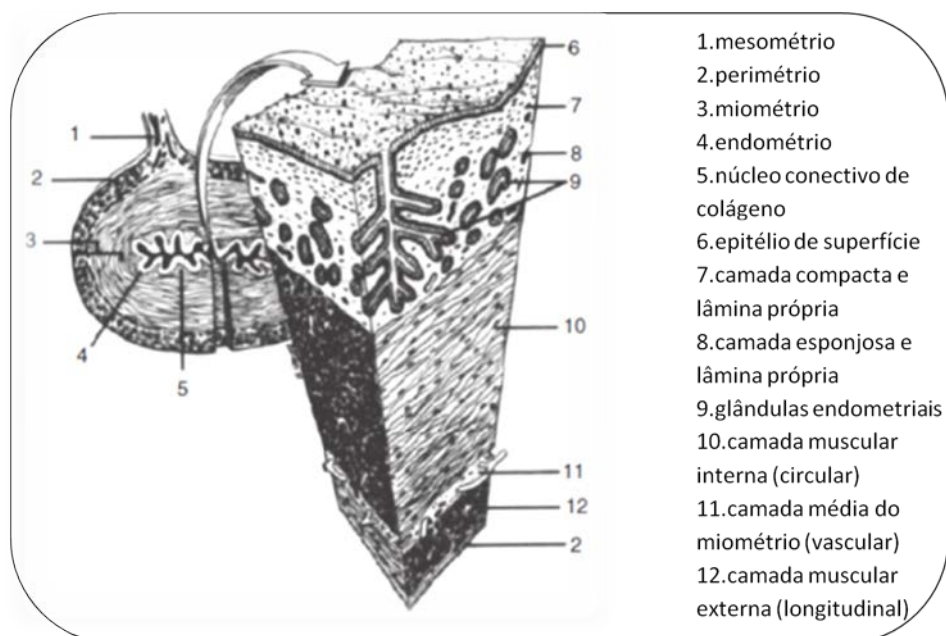


Figura 2. Esquema representativo de uma secção do corno uterino da égua. Fonte: McKINNON et al. (2011).

O suprimento sanguíneo do útero se dá por meio do ligamento largo, sendo a artéria uterina a principal responsável. Esta é um ramo da artéria ilíaca externa, que se originou na artéria aorta abdominal. Adicionalmente, o útero também recebe aporte sanguíneo do ramo uterino da artéria ovariana e do ramo uterino da artéria vaginal (Figura 3). Estas três artérias estão interligadas e sua extensão varia individualmente (GINTHER, 2007).

A artéria ovariana se apresenta como um ramo da artéria aorta abdominal, enquanto a artéria vaginal se origina da artéria pudenda interna, um ramo da artéria ilíaca interna. O ramo uterino da artéria ovariana fornece o suprimento sanguíneo para as extremidades dos cornos uterinos, enquanto o ramo uterino da artéria vaginal irriga a cérvix e corpo uterino (GINTHER, 2007).

A artéria uterina, por sua vez, se divide em ramos cranial e caudal (Figura 3). O primeiro é menor e supre a tuba uterina e a porção cranial dos cornos uterinos, sofrendo anastomose com o ramo caudal da artéria uterina e o ramo uterino da artéria ovariana, enquanto o ramo caudal supre a porção caudal dos cornos uterinos e forma anastomoses com o ramo uterino da artéria vaginal. Os ramos uterinos cranial e caudal cursam ao longo da borda antimesometrial e dão origem a numerosas ramificações arteriais tortuosas, que correm transversalmente ao longo das faces lateral e medial dos cornos uterinos (GINTHER, 2007).

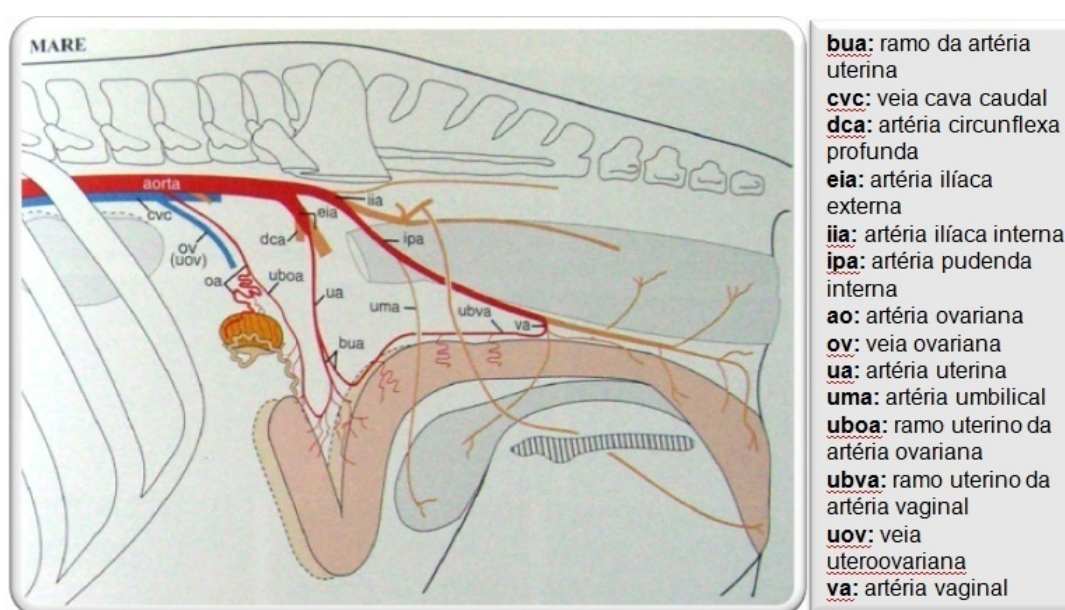


Figura 3. Órgãos e suprimento vascular do sistema reprodutivo da égua. Fonte: Ginther (2007).

2.2. Ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia bidimensional (modo-B ou escala de cinza) tem sido amplamente utilizada na reprodução equina, com a finalidade de obter informações funcionais e estruturais do tecido avaliado. A ultrassonografia Doppler, por sua vez, adiciona informações fisiológicas sobre o fluxo sanguíneo, possibilitando avaliar a hemodinâmica do local de interesse (GINTHER & UTT, 2004). Esta ferramenta de avaliação não fornece apenas informações atuais da estrutura, como também pode ser capaz de prever condições futuras, como o potencial de dominância de um folículo ou ainda sua capacidade ovulatória (GINTHER, 2007).

Esta técnica é fundamentada no efeito Doppler, que se baseia em alterações nas frequências das ondas emitidas ou refletidas por um objeto em movimento, em relação a um observador estático (GINTHER & UTT, 2004). Quando o efeito Doppler é utilizado na ultrassonografia, o observador estático é o transdutor e o objeto em movimento são as hemácias, que refletem as ondas ultrassonográficas emitidas pela probe. A frequência das ondas refletidas varia de acordo com a velocidade e sentido do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

Baseado neste princípio, a ultrassonografia Doppler abrange dois diferentes modos, a serem escolhidos de acordo com o tecido alvo estudado: o espectral e o colorido.

O modo espectral analisa quantitativamente o fluxo sanguíneo de um vaso específico, por meio da utilização de um cursor (*gate*), que é centralizado no lúmen da artéria escolhida, em uma imagem modo-B ou Doppler colorido. As alterações de frequência e amplitude são exibidas em um gráfico denominado espectro, na forma de ondas, representando cada uma um ciclo cardíaco. É neste modo que são exibidos os valores das velocidades no pico sistólico (PSV), diastólica final (EDV) e velocidade máxima média (TAMV), ao longo de um ciclo cardíaco, além dos índices Doppler de resistência (RI) e pulsatilidade (PI). Estes últimos são frequentemente utilizados por expressarem uma relação negativa com a perfusão vascular do tecido ou órgão suprido pela artéria avaliada (GINTHER, 2007).

Para calcular as velocidades do fluxo sanguíneo é considerado, além do efeito Doppler, o ângulo de incidência dos feixes ultrassonográficos no fluxo das hemácias (ângulo Doppler ou ângulo de insonância). Desta forma, a orientação do transdutor é fundamental para obtenção de uma imagem de qualidade. Para isso, preconiza-se a utilização de um ângulo entre 30° e 60° (GINTHER & UTT, 2004).

No entanto, a determinação deste ângulo é praticamente impossível quando se utiliza vasos tortuosos e de baixo calibre, como os encontrados no sistema reprodutivo. Para contornar esta dificuldade, são utilizados para análise somente os índices Doppler (RI e PI), que não sofrem interferência do ângulo Doppler (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2010).

O modo Doppler colorido, por sua vez, analisa qualitativamente e em tempo real a perfusão vascular da estrutura como um todo, permitindo uma avaliação geral da irrigação do tecido ou órgão, por meio da sobreposição de pontos coloridos Doppler à imagem ultrassonográfica da estrutura em modo-B (GINTHER & UTT, 2004). Diferente do modo espectral, este método é simples, rápido e funcional, fornecendo uma informação imediata do fluxo sanguíneo da área escaneada. Nesta abordagem, a avaliação apenas visual, subjetiva e em tempo real é capaz de prever o *status* funcional do tecido ou órgão (GINTHER, 2007). O Doppler colorido ainda é subdividido em dois modos distintos: *Color-flow* e *Power-flow*.

O modo *Color-flow* clássico representa a perfusão vascular da estrutura em duas cores: vermelho e azul, que indicam o sentido das hemácias em relação ao transdutor. O vermelho corresponde ao fluxo sanguíneo que se desloca em direção ao transdutor, enquanto o azul indica afastamento. Tonalidades escuras e claras são velocidades lentas e rápidas, respectivamente (GINTHER & UTT, 2004; GINTHER, 2007).

O modo *Power-flow* é uma inovação recente do *Color-flow*. Inicialmente utilizava uma escala graduada em uma única cor, o laranja, independente da direção do fluxo sanguíneo. No entanto, equipamentos recentes de ultrassonografia Doppler têm apresentado o modo *Power-flow* também graduado em duas cores, de acordo com o sentido do fluxo. A intensidade da

cor neste modo varia de acordo com a potência do sinal (GINTHER & UTT, 2004; GINTHER, 2007).

De acordo com Ginther (2007), a principal diferença entre o *Color-flow* e o *Power-flow* é o modo como a imagem é formada, enquanto o primeiro avalia a velocidade, o segundo utiliza a intensidade da estrutura em deslocamento. O modo *Power-flow* apresenta como principal vantagem uma maior sensibilidade a fluxos sanguíneos discretos. Adicionalmente, imagens coloridas pelo *Power-flow* são menos afetadas por artefatos (GINTHER, 2007). Desta forma, recomenda-se a utilização do Doppler modo *Power-flow* para a avaliação de vasos de pequeno diâmetro e baixo fluxo sanguíneo, como os presentes no trato reprodutivo de éguas (Figura 4; FERREIRA et al., 2011).

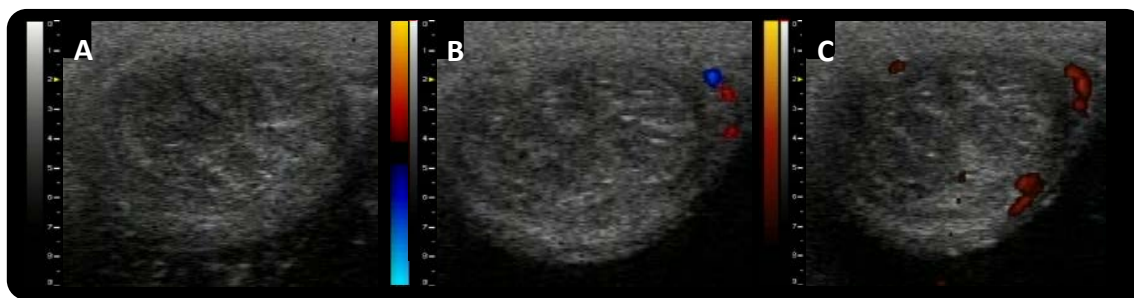


Figura 4. Exame ultrassonográfico Doppler modos B (A), *Color-flow* (B) e *Power-flow* (C). Corte transversal do corno uterino de égua, mostrando a diferença da intensidade de sinais coloridos nos diferentes modos.

2.3. Avaliação uterina por meio da ultrassonografia Doppler

Para avaliação da perfusão vascular uterina pode-se analisar o útero de forma subjetiva e objetiva. A primeira é realizada levando-se em consideração o número e a intensidade dos pontos coloridos presentes no endométrio e miométrio, podendo-se utilizar tanto o modo *Color-flow* quanto o *Power-flow*. A classificação é feita em escores de 1 a 4, indicando mínima e máxima vascularização, respectivamente, durante exame contínuo de no mínimo um minuto (SILVA et al., 2005). Adicionalmente, as imagens mais representativas de cada exame, caracterizadas por apresentarem maior quantidade de sinais coloridos, são selecionadas e o número total de pontos coloridos é contado utilizando-se *softwares* específicos. Esta contagem indicará a área de fluxo sanguíneo da imagem selecionada (SILVA et al., 2005).

A análise objetiva se faz por meio do modo espectral, onde são utilizados apenas os índices Doppler para avaliar a perfusão vascular uterina, por não sofrerem influência do ângulo de insonância. Este tipo de avaliação do útero pode ser realizada em dois locais distintos: em vasos de grande calibre (artéria uterina), como descrito por Bollwein et al. (1998), ou em vasos locais de pequeno calibre presentes no mesométrio (SILVA et al., 2005). O primeiro possui a vantagem da facilidade da coleta de gráficos, pelo grande diâmetro e baixa mobilidade da artéria, e a desvantagem de estar localizado relativamente longe de seu tecido alvo. Por este motivo, Silva et al. (2005) desenvolveram uma metodologia de análise que coleta dados diretamente do mesométrio (Figura 5), com o intuito de obter informações referentes a alterações locais e específicas da área avaliada.

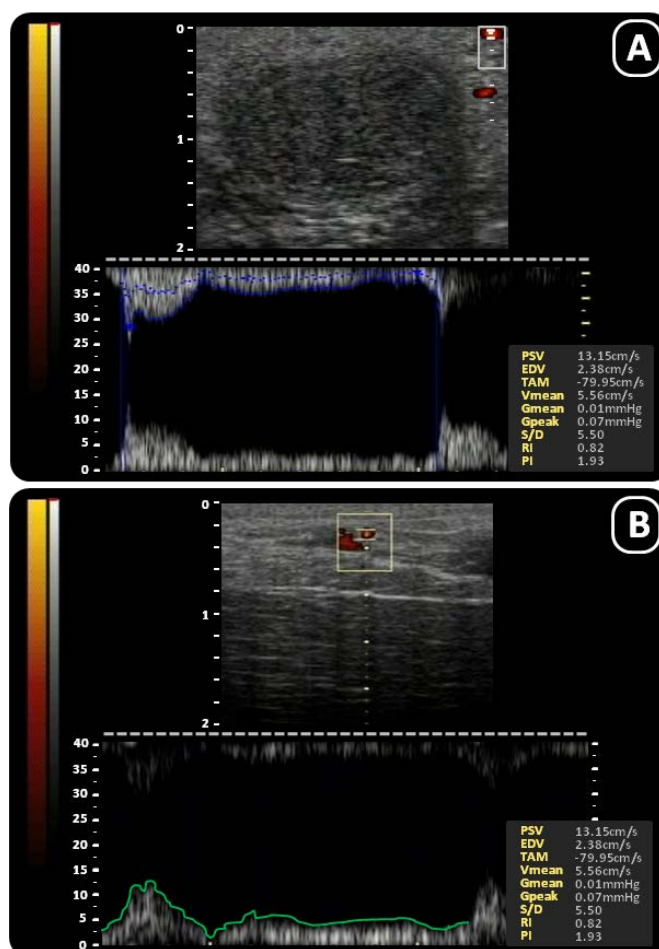


Figura 5. Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral, em. Coleta de dados espectrais realizada em vasos de pequeno calibre presentes no mesométrio, em corte transversal do corno uterino de égua (A) e na artéria uterina (B).

2.4. Perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral

Bollwein et al. (1998; 2002b; 2004) analisaram a perfusão vascular do útero de éguas cíclicas não gestantes, pela ultrassonografia Doppler modo espectral, por meio da avaliação de dados coletados nas artérias uterinas. Não foram encontradas diferenças estatísticas no fluxo sanguíneo entre as artérias uterinas ipsi (dominante) e contralateral (não dominante) ao folículo pré-ovulatório e ao CL, como também observado em outras espécies (FORD & CHRISTENSON, 1979; BOLLWEIN et al., 2000; RAINE-FENNING et al., 2004; PEREIRA et al., 2012).

A perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral em éguas, por meio da avaliação da artéria uterina, apresenta um padrão ondular, com valores máximos de PI (baixa irrigação) no D1 e no D11, e valores mínimos (alta irrigação) entre D4 e D6 e nos dias que antecedem a ovulação (D-3 e D-2; BOLLWEIN et al., 2002b).

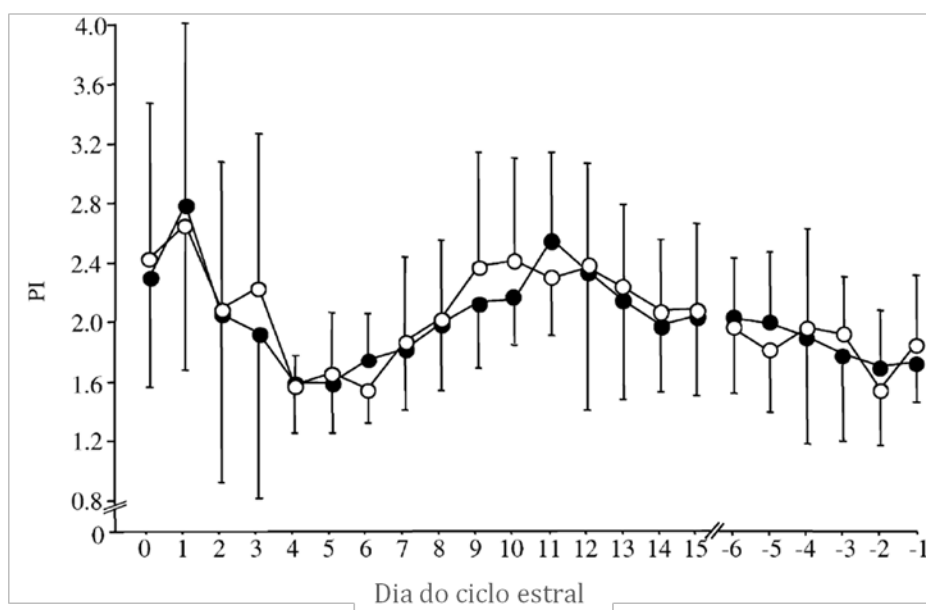


Figura 6. Valores dos índices de pulsatilidade (PI) encontrados nas artérias uterinas dominante (●) e não dominante (○) ao longo de dois ciclos estrais de éguas. Os valores são médias±SD. Fonte: Bollwein et al. (2002).

No início do diestro (D0 e D1), a irrigação uterina em éguas apresenta valores mínimos, assim como encontrado em vacas (BOLLWEIN et al., 2000; 2002b; 2004). Após este período, há um aumento da irrigação, tanto por meio

da avaliação da artéria uterina (BOLLWEIN et al., 1998; 2002b; 2004), quanto de arteríolas locais, presentes no endométrio, miométrio e mesométrio (IGNÁCIO et al., 2012). Da mesma forma, esta elevação na perfusão vascular uterina foi encontrada em éguas gestantes (FERREIRA et al., 2010), e em éguas receptoras de embriões (IGNÁCIO et al., 2011b). Bollwein et al. (1998) observaram que este aumento da irrigação uterina no início do diestro coincide com o momento da entrada do embrião no útero (D5).

Uma elevação similar na perfusão vascular uterina no diestro foi encontrada em porcas gestantes (FORD & CHRISTENSON, 1979), coincidindo, da mesma maneira, com o período de descida do embrião para o útero (GEISERTE & MALAYER, 2004). Em mulheres, este aumento da perfusão vascular uterina durante o diestro inicia-se no dia 5 e se mantém até 12 dias após a ovulação (AGRAWAL et al., 1999; RAINE-FENNING et al., 2004; JOKUBKIENE et al., 2006).

No final do diestro (D11), há uma diminuição no fluxo sanguíneo da artéria uterina de éguas (BOLLWEIN et al., 1998; 2002b; 2004), com valores semelhantes aos encontrados no D0 e D1. Similarmente, o mesmo fenômeno foi observado em ovelhas, vacas e porcas (FORD & CHRISTENSON, 1979; FORD, 1982; ROMAN-PONCE et al., 1983).

Durante o estro, quando avaliada a artéria uterina em éguas, há um aumento pré-ovulatório da perfusão vascular do útero (BOLLWEIN et al., 1998; 2002b; 2004). Esta elevação também foi observada em vacas (FORD, 1982; BOLLWEIN et al., 2000), ovelhas (ROMAN-PONCE et al., 1983; SPRAGUE et al., 2009), porcas (FORD & CHRISTENSON, 1979) e em mulheres (AGRAWAL et al., 1999; RAINE-FENNING et al., 2004).

No entanto, até o presente momento, não há dados na literatura sobre o padrão da hemodinâmica uterina ao longo de todo o ciclo estral de éguas saudáveis e não inseminadas, por meio da coleta de dados em vasos locais uterinos.

2.5. Fatores que influenciam a hemodinâmica uterina

Em éguas, assim como em outras espécies, o útero sofre alterações fisiológicas ao longo do ciclo estral, sendo o estágio deste diretamente relacionado à perfusão vascular uterina (BOLLWEIN et al., 1998; 2002b). Estas alterações são reguladas pelos hormônios esteroidais (estrógeno e progesterona) e por uma rede de complexas interações entre fatores de crescimento locais, secretados pelo epitélio e estroma uterinos (ROMAN-PONCE et al., 1983; BOLLWEIN et al., 2002b; SAGSOZ & SARUHAN, 2011).

O estradiol (E2) é um hormônio esteroidal que, conhecidamente, apresenta efeito vasodilatador, estando relacionado à formação do edema uterino em éguas e à proliferação e diferenciação celular do endométrio e miométrio (FORD, 1982; GINTHER, 1992).

Na égua, em torno de 6 a 8 dias antes da ovulação (início do estro), concentrações circulantes deste hormônio começam um aumento progressivo, que atingem o pico aproximadamente dois dias antes da ovulação, e iniciam sua queda, chegando a valores basais no final do estro (ou até dois dias após a ovulação). Entretanto, somente o pico pré-ovulatório de estradiol tem sido descrito no ciclo estral em éguas (GINTHER, 1992).

Um segundo aumento nos níveis periféricos deste hormônio é sugerido, em torno do dia 6 pós-ovulação (Figura 7; GINTHER, 1992; CHRISTENSEN, 2011), com base na mensuração do sulfato de estrona circulante. Estes autores defendem esta hipótese sugerindo que éguas que possuem duas ondas de crescimento folicular exibem atividade folicular durante a primeira metade do diestro, ou ainda devido à secreção de E2 pelo corpo lúteo. Possíveis efeitos clínicos deste pico secundário incluem um aumento do tônus uterino e um leve aumento no edema endometrial. As concentrações plasmáticas retornam a valores basais até o final do diestro, em torno dos dias 14 e 15, devido à regressão de folículos diéstricos ou à luteólise (CHRISTENSEN, 2011).

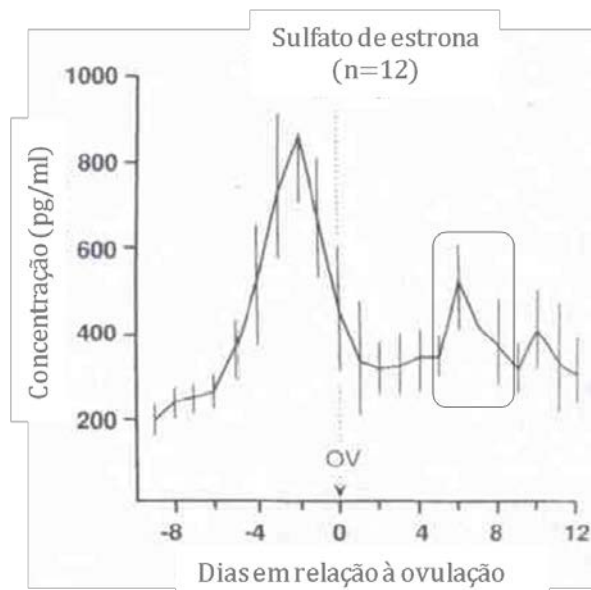


Figura 7. Concentrações de sulfato de estrona de amostras diárias de sangue periférico. Fonte: Ginther (1992).

É difícil estudar o E2 e seus possíveis efeitos no sistema reprodutivo sem levar em consideração outro importante hormônio esteroidal, a P4, uma vez que estes dois hormônios apresentam ações sinérgicas e/ou antagônicas em seus tecidos alvos (VANDERWALL, 2011).

A P4 também apresenta efeitos importantes no trato reprodutivo feminino durante o ciclo estral. Na égua não gestante atua no útero, em especial, elevando o tônus, e está associada à quiescência do miométrio e estímulo à secreção histotrófica (VANDERWALL, 2011). À ultrassonografia, é visualizado um aumento na ecotextura da imagem durante a fase progesterônica (GINTHER, 1992).

As concentrações plasmáticas deste hormônio no estro estão abaixo de 1ng/ml, iniciam o seu aumento dentro de 24 a 36 horas após a ovulação, elevando-se progressivamente até alcançar valores máximos próximo ao D8 (valores médios entre 4 e 33 ng/ml). Níveis altos de P4 sérica são mantidos até os dias 13 e 14 (aproximadamente 3 dias antes do início do estro), caindo até atingir novamente concentrações basais durante o estro subsequente (GINTHER, 1992; GINTHER et al., 2007).

Dentre estes dois principais hormônios esteroidais que atuam no sistema reprodutivo da fêmea, a P4 apresenta-se como o hormônio dominante, um

fenômeno facilmente demonstrado pela administração concomitante de E2 e P4 em éguas acíclicas ou ovariectomizadas, resultando na detecção de efeitos progesteracionais (VANDERWALL, 2011).

Mudanças fisiológicas no padrão da irrigação do útero durante o ciclo estral e menstrual parecem estar correlacionadas aos efeitos dos hormônios esteroidais (FORD, 1982; ROMAN-PONCE et al., 1982; BOLLWEIN et al., 2002b; RAINE-FENNING et al., 2004).

Na tentativa de correlacionar a perfusão vascular uterina de éguas aos hormônios esteroidais, Bollwein et al. (2002b) encontraram uma correlação positiva entre o fluxo sanguíneo das artérias uterinas e o E2 plasmático, apenas durante a fase de estro, assim como relatado em mulheres (RAINE-FENNING et al., 2004). Enquanto estes mesmos autores observaram que, durante a fase progesterônica, não houve correlação da perfusão vascular uterina aos níveis plasmáticos deste hormônio. De acordo com Bollwein et al., (2002b) e Raine-Fenning et al., (2004), não existe esta relação em éguas e mulheres uma vez que o E2 se mantém em concentrações basais no início do diestro, no entanto, alterações significativas na perfusão vascular uterina são detectadas neste momento. Estes achados indicam que outros fatores vasoativos podem estar relacionados à hemodinâmica uterina ao longo do ciclo estral, e não somente as concentrações plasmáticas de E2 (BOLLWEIN et al., 2002b).

Por outro lado, Ginther (1992) e Christensen (2011) relatam um aumento do estradiol no início do diestro em éguas, como mencionado anteriormente, que pode coincidir com a elevação da irrigação uterina neste mesmo momento.

Diferentemente do observado em éguas, em vacas houve uma correlação positiva do E2 com o fluxo sanguíneo da artéria uterina ao longo do ciclo estral (BOLLWEIN et al., 2000), enquanto em ovelhas não foi encontrada correlação deste hormônio com a perfusão vascular do útero (ROMAN-PONCE et al., 1983; SPRAGUE et al., 2009).

Quando estudadas as concentrações plasmáticas da P4, estas não se correlacionaram à perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral tanto em éguas quanto em vacas (BOLLWEIN et al., 2000; 2002b). Diferentemente do encontrado em ovelhas e porcas, que apresentaram uma forte correlação

positiva e negativa, respectivamente (FORD & CHRISTENSON, 1979; ROMAN-PONCE et al., 1983). Já na mulher existe uma alta correlação positiva da P4 com a irrigação uterina, apenas durante o diestro (RAINE-FENNING et al., 2004).

Ao analisar a relação existente entre os hormônios esteroidais, em ovelhas, vacas e porcas houve uma alta correlação do fluxo sanguíneo uterino com a relação E2/P4 (FORD, 1982; ROMAN-PONCE et al., 1983; SPRAGUE et al., 2009).

A administração exógena de E2 mostrou elevar a irrigação uterina em ovelhas (MAGNESS et al., 1993) e vacas (ROMAN-PONCE et al., 1978). No entanto, em éguas foi observada uma diminuição na perfusão vascular do útero ao longo de todo o ciclo estral após a aplicação deste hormônio (BOLLWEIN et al., 2004).

Apesar disto, após a administração de estradiol no D0, um aumento da perfusão vascular ocorreu no D1. Este fenômeno não foi observado após outras aplicações durante o diestro (D5 e D10). Tal fato pode estar relacionado a um efeito de *down-regulation* nos receptores de E2 presentes nos vasos uterinos, ou a alta concentração plasmática de P4 presente no momento das outras aplicações hormonais (BOLLWEIN et al., 2004).

Quando administrado P4 exógena, Greiss e Anderson (1970; apud BOLLWEIN et al., 2004), observaram um aumento na perfusão vascular uterina após o termino do tratamento em ovelhas ovariectomizadas, enquanto Bollwein et al. (2004) observaram uma redução significativa na perfusão vascular uterina em éguas durante o tratamento e no ciclo subsequente. Provavelmente, esta diminuição se deve à redução na expressão de receptores para estrógeno, provocada pela administração de progestágenos (TSAI et al., 1988; apud BOLLWEIN et al., 2004). Caton et al. (1974) não observaram alterações no fluxo sanguíneo uterino quando administrado somente P4 em ovelhas ovariectomizadas, mas quando foi administrado P4 em animais que já haviam recebido E2 anteriormente houve uma diminuição do fluxo sanguíneo uterino. A P4 parece capaz de antagonizar ou inibir da resposta ao E2, dependendo na sequência em que os hormônios forem dadas.

Com base na grande variação dos resultados encontrados após a administração exógena dos hormônios esteroidais, demonstrou-se que vários fatores influenciam o efeito hormonal no tecido alvo, além de sua concentração plasmática. A sensibilidade dos tecidos e a dinâmica dos receptores hormonais neles presentes contribuem igualmente para a magnitude da resposta (ROMAN-PONCE et al., 1983; HONNENS et al., 2011).

O E2 age por meio de duas vias: genômica e não genômica. Na primeira, E2 se liga a seus receptores nucleares (ER α e ER β) presentes nas células alvo, e age regulando a expressão gênica. A via não genômica apresenta uma ação mais rápida, uma vez que não envolve a síntese de novas proteínas. Nesta última, os receptores de membrana controlam a ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que atua estimulando a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (BJORNSTROM & SJOBERG, 2005; PASTORE et al., 2012).

Bollwein et al., (2002a) observaram uma alta correlação da velocidade máxima média do fluxo sanguíneo da artéria uterina com a expressão de RNAm de eNOS ao longo do ciclo estral de éguas. Similarmente, Honnens et al. (2011) observaram que o aumento da perfusão vascular uterina em éguas é regulada pela estimulação hormonal, tanto da P4 e quanto do E2, mediada pelo eNOS.

Da mesma forma observada para o E2, a P4 apresenta dois tipos de receptores nucleares (PRA e PRB), que possuem ação em diferentes tipos de tecidos (MULAC-JERICEVIC et al., 2000; 2003).

Ao longo do ciclo estral, os receptores de E2 e P4 apresentam padrões de expressão variados nas diferentes células e tecidos que compõe o útero. De modo geral, durante o estro o E2 estimula tanto a expressão de seus próprios receptores, quanto a expressão dos receptores de P4. No período de diestro, a elevada concentração P4 inibe a expressão dos receptores de E2, e suprime seus próprios receptores a partir do meio até o final desta fase. O mecanismo pelo qual há supressão destes receptores pela P4 ainda não é bem elucidada (HARTT et al., 2005; HONNENS et al., 2011). No entanto, na espécie equina, ainda há controvérsias sobre a expressão destes receptores no útero durante o ciclo estral (BOLLWIEN et al., 2002a; HONNENS et al., 2011).

Quando estudada a expressão dos ER α no endotélio vascular da artéria uterina em ovinos, houve maior expressão destes no estro, demonstrando um controle ovariano da perfusão vascular uterina (PASTORE et al., 2012). Em equinos, houve alta correlação entre a velocidade máxima média do fluxo sanguíneo da artéria uterina e a expressão de ER α no endométrio. No entanto não foram encontrados trabalhos na literatura a respeito da expressão de receptores de E2 e P4 nos vasos uterinos de equinos.

Desta forma, para saber ao certo a ação dos hormônios esteroidais na perfusão vascular uterina de éguas, é preciso primeiramente padronizar a expressão destes receptores no endotélio vascular uterino. Além dos hormônios esteroidais, é provável que outros fatores com ação vasoativa alterem os padrões de perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral.

Vários fatores tem sido citados como potenciais reguladores do aumento da angiogênese e, conseqüentemente, da perfusão vascular, tais como: fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante (TGF), fator de crescimento de hepatócitos, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL), etc. Embora já tenha sido demonstrada a capacidade angiogênica destas moléculas em alguns sistemas modelos, ainda é difícil a correlação com o crescimento dos vasos sanguíneos. É neste contexto que o fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) ganha especial atenção dos estudos, uma vez que já foi elucidado seu papel na regulação da angiogênese (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997).

O VEGF é um potente agente mitótico, com ação em células endoteliais micro e macrovasculares derivadas de artérias, veias, e vasos linfáticos. No entanto, não possui atividade mitogênica em outros tipos celulares (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997).

Alterações periódicas na expressão deste fator e seus receptores uterinos são encontradas nas diferentes fases do ciclo estral em bovinos, sendo estas possivelmente relacionadas às concentrações sanguíneas dos hormônios esteroidais (SAGSOZ & SARUHAN, 2011). Da mesma forma, em mulheres há uma possível ligação entre o VEGF e alterações do fluxo sanguíneo no trato reprodutivo ao longo do ciclo menstrual. Foi observada uma correlação positiva entre os níveis séricos de VEGF com a P4 e o E2 durante a fase luteal

média do ciclo menstrual, entretanto não há correlação deste fator com os níveis de LH (hormônio luteinizante), sugerindo que este não está relacionado à regulação e expressão de VEGF (AGRAWAL et al., 1999).

A expressão de RNAm de VEGF na musculatura lisa do útero parece ser estimulada pelo estradiol, sendo o VEGF o possível mediador do aumento da permeabilidade vascular uterina induzida por este hormônio (AGRAWAL et al., 1999). No entanto, a expressão de RNAm de VEGF no miométrio e endométrio é significativamente mais elevada durante o diestro (SAGSOZ & SARUHAN, 2011). Desta maneira, o VEGF parece ser um dos principais fatores promotores da angiogênese e aumento da atividade secretora das células epiteliais, necessários para adequada receptividade do endométrio. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar o papel exato destes fatores no útero ao longo de todo o ciclo reprodutivo feminino (AGRAWAL et al., 1999; SAGSOZ & SARUHAN, 2011).

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram: a) caracterizar a hemodinâmica uterina de éguas não gestantes, ao longo do ciclo estral, por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler de vasos de pequeno calibre, presentes no endométrio, miométrio e mesométrio; b) correlacionar a perfusão vascular uterina às concentrações plasmáticas dos hormônios esteroidais (estradiol e progesterona) durante o ciclo estral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas 12 éguas não gestantes, mestiças, com idade entre quatro e 15 anos, em bom estado corporal, ao longo de duas estações reprodutivas subsequentes (2011/2012 e 2012/2013). Exames citológicos e histológicos do útero foram previamente realizados para exclusão de animais com alterações inflamatórias ou degenerativas. Foram utilizadas para o estudo apenas éguas

que apresentaram $\leq 5\%$ neutrófilos durante o estro (McKINNON et al., 2011) e com grau I ou II de degeneração endometrial (KENNEY & DOIG, 1986).

O experimento foi realizado no Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – CERBEQ (Posto de Monta), UNESP Botucatu (Latitude 22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"). Os animais foram mantidos em piquetes e alimentados com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*), ração concentrada, suplementação mineral e acesso livre à água.

4.2. Delineamento Experimental

Para o maior aproveitamento da estação reprodutiva, as éguas foram submetidas a um programa de luz artificial, iniciado no solstício de inverno (21 de junho) e mantido por 60 dias. Os animais foram expostos a 15 horas diárias de luz, com intensidade de 100 Lux de luz artificial (McKINNON et al., 2011). Com a finalidade de excluir os efeitos da sazonalidade, não foram utilizados o primeiro e o último ciclo estral da estação reprodutiva.

As éguas foram acompanhadas diariamente, por meio de ultrassonografia transretal modo-B (escala de cinza), para detecção da ovulação espontânea. Esta foi caracterizada pela ausência do folículo pré-ovulatório presente anteriormente em um dos ovários, e verificação de um corpo hemorrágico.

Após a ovulação, as avaliações foram realizadas diariamente, por meio da ultrassonografia modo-B e Doppler, até a ovulação subsequente. Para o exame ultrassonográfico foi utilizado equipamento Doppler (SONOACE PICO, Medison do Brasil Ltda.) equipado com transdutor multi-frequencial (5 a 9 MHz) linear endocavitário de banda larga (LV5-9CDn, 60mm). As configurações do equipamento não foram alteradas ao longo do estudo.

4.3. Avaliação ovariana

Durante o intervalo interovulatório, a avaliação ovariana foi realizada diariamente, por meio da ultrassonografia modo-B, para verificação da

presença do CL e acompanhamento folicular, por meio da mensuração do diâmetro médio dos dois maiores folículos.

4.4. Avaliação uterina

A avaliação uterina foi realizada diariamente durante o intervalo interovulatório. Utilizou-se o exame ultrassonográfico modo-B para mensuração subjetiva do edema uterino, graduado em escores de 0 a 4, indicando ausência, baixo, moderado, elevado e máximo edema uterino (Figura 8; GINTHER, 1992).

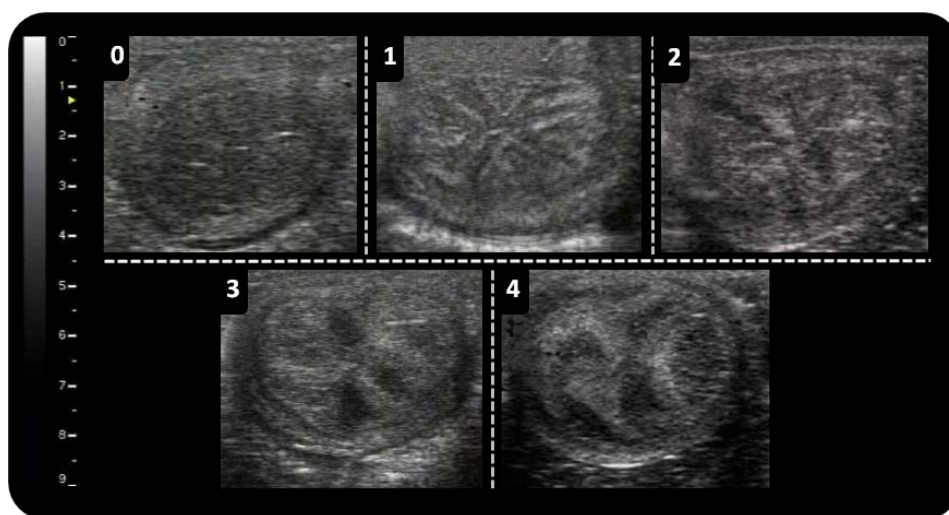


Figura 8. Exame ultrassonográfico modo-B, em corte transversal de corno uterino de éguas não gestantes. Seleção de imagens representativas da classificação subjetiva do edema uterino em escores de 0 a 4, indicando ausência, baixo, moderado, elevado e máximo edema uterino, respectivamente.

Para avaliação da hemodinâmica uterina analisou-se subjetiva e objetivamente o útero. A perfusão vascular subjetiva (PVU) foi estimada levando-se em consideração o número e a intensidade dos sinais Doppler coloridos presentes no mesométrio, miométrio e endométrio. Utilizou-se o exame ultrassonográfico Doppler modo *Power-flow*, em um escaneamento contínuo em tempo real de 1min, em corte transversal por toda extensão dos cornos uterinos (adaptado de FERREIRA et al., 2008). A PVU foi classificada em um escore de 1 a 4 (mínima e máxima perfusão vascular, respectivamente; Figura 9).

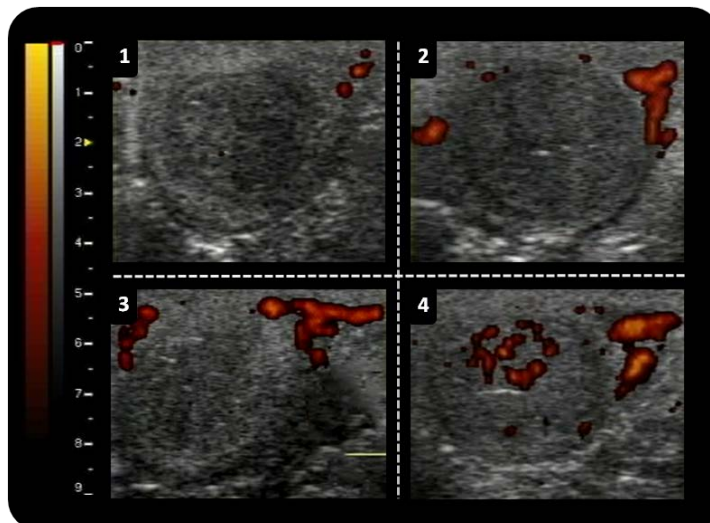


Figura 9. Exame ultrassonográfico Doppler modo *Power-flow*, em corte transversal de corno uterino de éguas não gestantes. Seleção de imagens representativas da classificação subjetiva da perfusão vascular uterina (PVU) em um escore de 1 a 4, indicando baixa, moderada, elevada e máxima perfusão vascular, respectivamente.

Para a análise objetiva, os dados foram coletados das artérias de pequeno calibre presentes no mesométrio de ambos os cornos uterinos, em modo espectral Doppler (SILVA et al., 2005). Para tanto, posicionou-se o cursor em uma artéria mesometrial e um gráfico espectral, com no mínimo três ciclos cardíacos semelhantes, foi gerado. Deste, foi escolhido um ciclo cardíaco, que forneceu os valores dos Índices de Resistência (RI) e de Pulsatilidade (PI). Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes em cada corno uterino (Figura 10), e a média dos valores encontrados foi utilizada para análise estatística.

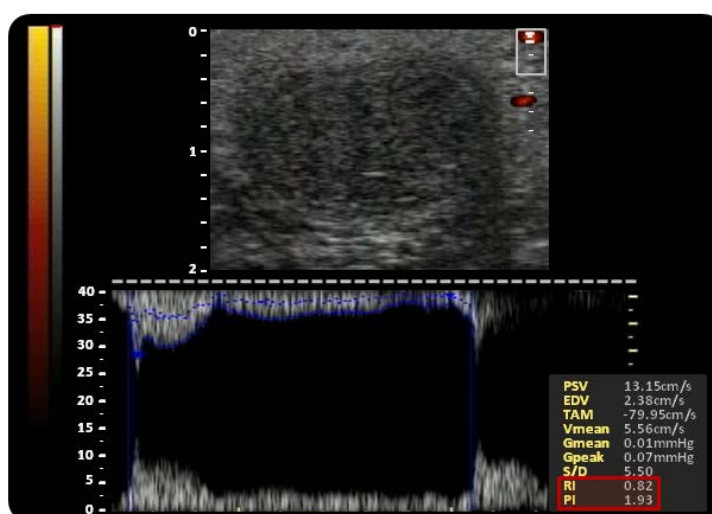


Figura 10. Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral, em corte transversal do corno uterino de égua não gestante. Coleta de dados espectrais realizada em vasos de pequeno calibre presentes no mesométrio.

4.5. Concentração plasmática dos hormônios esteroidais

Para determinação da concentração plasmática dos hormônios esteroidais, P4 e E2, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, por venopunção da jugular através de sistemas vacutainer, após cada avaliação ultrassonográfica diária. As coletas iniciaram-se no dia da detecção da ovulação (D0) e foram mantidas diariamente até um dia antes da ovulação subsequente (D-1). As amostras foram centrifugadas a 900g por 10 min. para separação do plasma, e armazenadas a -20°C .

As concentrações de E2 foram determinadas por radioimunoensaio (RIA), utilizando-se kit comercial para dosagem de 17β -estradiol humano (Estradiol Duplo Anticorpo; Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), adaptado e validado para análises das concentrações plasmáticas de E2 equino (adaptado de GASTAL et al. 1999). Amostras de 500 μl de plasma foram duplamente extraídas com 3,0 ml de éter etílico, congeladas em solução de gelo seco e metanol, e decantadas em tubo de ensaio. Após a extração, o éter etílico foi removido por evaporação. As amostras secas foram ressuspensas em 200 μl de solução tampão (PBS gelatina 0,1%). Para o ensaio, seguiu-se as recomendações descritas pelo fabricante do kit. Os padrões para curva (5 a 500pg/ml de 17β -estradiol) foram utilizados do kit duplo anticorpo humano.

Durante o período de diestro as concentrações plasmáticas de estradiol em éguas tendem a apresentar valores inferiores à 5pg/ml (GINTHER, 1992), valor este considerado o mínimo de leitura com base na curva padrão fornecida pelo kit. Para contornar esta dificuldade, as concentrações plasmáticas de E2 que apresentavam concentrações abaixo de 5pg/ml foram obtidas, por meio da técnica de RIA, em contagens por minuto (CPM), e preditas de acordo com a equação da curva padrão (Figura 11) fornecida pelo kit:

Contagens por minuto (CPM)

pg/ml

Figura 11. Gráfico representativo da leitura da curva padrão de estradiol (5 a 500pg/ml de E2) pelo Radioimunoensaio (RIA). Os eixos x e y representam as concentrações de estradiol da curva padrão fornecida pelo kit comercial para dosagem de 17β-estradiol humano (Estradiol Duplo Anticorpo; Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) e as respectivas contagens por minuto (CPM) pelo RIA.

A equação resultante da relação entre o CPM e as concentrações de estradiol, para a curva padrão é:

$$y = -1107 \ln(x) + 8299,2$$

ou seja,

$$CPM = -1107 \ln([E2]) + 8299,2$$

Desta forma, temos:

$$[E2] = 2,72^{\frac{CPM - 8299,2}{-1107}}$$

O coeficiente de variação interensaio foi de 19,3%.

As mensurações das concentrações plasmáticas de P4 foram realizadas por RIA, utilizando-se kit comercial para dosagem de progesterona humana (Progesterona Coat-A-Count, fase sólida, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), de acordo com Ginther et al. (2005). Os coeficientes de variação inter e intraensaio foram 5,5 e 6,5%, respectivamente, e a sensibilidade do ensaio foi de 0,05%.

4.6. Análise estatística

Para facilitar a análise das variáveis durante os ciclos estrais com diferentes durações, os dados foram divididos em três períodos: estro, diestro e peri-luteolítico (L-3 a L+3). Sendo L0 o primeiro dia em que a progesterona apresentou concentrações plasmáticas abaixo de 1ng/ml (GINTHER et al., 2011). O diestro foi considerado o intervalo entre uma ovulação e o dia imediatamente anterior ao momento em que a concentração plasmática de P4 atingiu valores abaixo de 1ng/ml, enquanto o estro foi o intervalo entre o término do diestro e a ovulação subsequente. Para as análises de dados, utilizou-se a média de duração do estro e do diestro.

Para melhor visualização da variação dos dados em relação ao D0, a análise comparativa das variáveis respostas foi realizada. Padronizou-se o valor zero para o dia da ovulação, e os dados dos dias subsequentes foram a diferença em relação a este momento, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Valor final} = \frac{(\text{valor inicial} - \text{valor no D0})}{\text{valor no D0}}$$

Desta forma, a análise da perfusão vascular uterina foi realizada por meio de seis variáveis respostas: PVU, PVUrel (perfusão vascular uterina subjetiva relativa), RI, RIrel (índice de resistência relativo), PI e PIrel (índice de pulsatilidade relativo).

Quando estudadas as variáveis no período peri-luteolítico, as variáveis relativas foram padronizadas em relação ao dia da luteólise (L0) ao invés do D0, aplicando-se a fórmula:

$$\text{Valor final} = \frac{(\text{valor inicial} - \text{valor no L0})}{\text{valor no L0}}$$

No caso de animais que apresentaram co-dominância folicular durante o período das avaliações, com consequente dupla ovulação, foi realizada uma divisão dos animais em dois grupos: grupo simples e grupo dupla ovulação. Para excluir a possibilidade de qualquer interferência, foi avaliado se houve efeito do grupo e interação do grupo com os momentos, para cada variável

resposta analisada. Quando este efeito não foi encontrado, as análises foram realizadas sem a divisão dos animais em grupos, utilizando-se todos os valores conjuntamente.

Analisou-se, inicialmente, a distribuição das variáveis respostas pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não estavam normalmente distribuídos foram transformados para escala raiz quadrada, logaritmos ou rank para a análise, objetivando a normalização. Para as variáveis paramétricas, foi feita a análise fatorial (SAS PROC MIXED - Versão 9.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) para os efeitos dos cornos, grupos e dias. Um termo de interação entre os grupos e dias foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre os grupos foi dependente do momento analisado, com repetidas afirmações para minimizar a autocorrelação entre mensurações sequenciais. O teste-*t* pareado de student foi utilizado para comparações selecionadas de médias dentro de um grupo. Diferença entre grupos foi analisada pelo teste-*t* não pareado.

Para as variáveis não paramétricas (edema, PVU, PVUrel e P4 durante o estro e luteólise), utilizou-se o teste kolmogorov-smirnov para fazer comparações entre grupos dentro do mesmo momento, e o teste de wilcoxon pareado para fazer comparações entre os momentos dentro do mesmo grupo.

A correlação de pearson foi realizada entre as médias das variáveis respostas ao longo dos dias, dentro dos três períodos definidos: diestro, estro e peri-luteolítico. O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística entre 0,1 e 0,05.

5. RESULTADOS

A média de duração do ciclo estral foi de $21,5 \pm 0,9$ dias (variação 18 a 25 dias), sendo $14,3 \pm 0,3$ (variação 12 a 16 dias) para o diestro e $7,3 \pm 0,8$ (variação de um a 10 dias) para o estro.

Dos 12 animais avaliados, três apresentaram co-dominância folicular que culminaram em duplas ovulações (grupo dupla ovulação).

Não houve diferença estatística na PVU, RI e PI entre os cornos ipsi e contralateral ao CL durante o diestro, e ao folículo pré-ovulatório durante o

estro ($p < 0,05$). Desta forma, os valores de ambos os cornos foram utilizados conjuntamente para as análises subsequentes.

5.1. Diestro e estro

Quando analisadas as variáveis respostas durante o diestro e estro, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$), utilizando-se, desta forma, todos os animais para análise conjunta. Os valores p para os efeitos dos grupos, dias e a interação entre ambos para as variáveis respostas paramétricas estão descritos na Tabela 1 (Anexos).

O perfil do RI, do PI e da PVU ao longo do ciclo estral estão representados na Figura 12. Nota-se que o maior valor da PVU foi detectado no D3, enquanto o menor foi observado no D11 e, durante a fase de estro, a PVU se manteve alta, atingindo valor máximo seis dias antes da ovulação. O mesmo perfil foi encontrado para o RI e o PI, no entanto, para estes, os menores valores foram observados nos dias 5 e 3, respectivamente, enquanto o D12 apresentou os valores mais altos encontrados, para ambas variáveis. Na fase de estro, o mesmo perfil entre apresentado pela PVU foi observado para os índices Doppler, porém com algumas diferenças pontuais com relação aos valores máximos e mínimo.

Para estas variáveis, quando padronizadas em relação ao D0, o perfil encontrado ao longo do ciclo estral se assemelhou ao encontrado para as variáveis respostas sem esta padronização. Apresentaram um padrão ondular da irrigação uterina ao longo de todo o ciclo. O Rirel e o PIrel possuíram menores valores no D3 e D-4, e maiores valores no D12, enquanto a PVUrel apresentou maior valor no D3 e no primeiro dia do estro, e menor valor no D11 (Figura 13).

Figura 12. Médias±EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU - classificados em escores de 1 a 4), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o ciclo estral de 12 éguas. Asteriscos simples indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p<0,05$), asteriscos duplos indicam diferença estatística entre dois dias específicos, situados nas extremidades das linhas tracejadas ($p<0,05$).



Figura 13. Médias \pm EPM dos índices de resistência relativo (RI), pulsatilidade relativo (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva relativa (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o ciclo estral de 12 éguas. Os dados foram padronizados para o dia da ovulação, sendo os valores obtidos referentes à diferença em relação ao D0. Asteriscos simples indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), asteriscos duplos indicam diferença estatística entre dois dias específicos, situados nas extremidades das linhas tracejadas ($p < 0,05$).

Durante o diestro, o edema uterino se manteve basal e constante, apresentando diferenças estatísticas apenas no estro. Em todos os dias desta, com exceção do D-1, os valores de edema uterino diferiram-se estatisticamente do valor encontrado no D0 ($p < 0,05$). Durante o estro foram encontradas algumas diferenças estatísticas, apresentadas na Figura 14.

Edema uterino

Figura 14. Médias \pm EPM do edema uterino, classificados em escores de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente), durante o ciclo estral de 12 éguas. Asteriscos indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), letras distintas indicam diferença estatística entre os dias no período de estro ($p < 0,05$).

Durante o diestro, foram detectadas diferenças estatísticas nas concentrações plasmáticas de P4 entre os dias 1 e 14 ($p < 0,05$). Todos os dias desta fase se apresentaram diferentes estatisticamente à concentração encontrada no D0 ($p < 0,05$), apresentando um aumento progressivo do D0 ao D4 ($p < 0,05$), concentrações máximas no D7, em média, seguidas por um decréscimo do D12 ao D14 (Figuras 15 e 17). No estro, a P4 se manteve basal (concentrações menores que 1ng/ml) durante todo o período.

Progesterona [ng/ml]

Figura 15. *Boxplots* para as concentrações plasmáticas de progesterona durante o ciclo estral de 12 éguas. As partes inferiores e superiores da caixa central representam os 25^o e 75^o percentis, respectivamente, a banda localizada no interior da mesma representa o 50^o percentil (mediana), as extremidades inferiores e superiores das barras representam o 5^o e 95^o percentis, respectivamente, enquanto os pontos externos são os valores extremos. Asteriscos indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$).

Durante o diestro, as concentrações de E2 nos dias 6, 7, 8 e 14 foram mais elevadas quando comparadas àquela no D1 ($p < 0,05$), menor valor encontrado nesta fase, no entanto se apresentaram similares ($p > 0,05$) à concentração no D0 (Figuras 16 e 17). No estro, foram encontradas diferenças estatísticas em relação ao D0, ao D1 e dentro deste período, como representado na Figura 16.

Estradiol [pg/ml]

Figura 16. *Boxplots* para as concentrações plasmáticas de estradiol durante o ciclo estral de 12 éguas. As partes inferiores e superiores da caixa central representam os 25° e 75° percentis, respectivamente, a banda localizada no interior da mesma representa o 50° percentil (mediana), as extremidades inferiores e superiores das barras representam o 5° e 95° percentis, respectivamente, enquanto os pontos externos são os valores extremos. Asteriscos simples indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D0 ($p < 0,05$), asteriscos duplos indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao D1 ($p < 0,05$), letras distintas indicam diferença estatística entre os dias no período de estro ($p < 0,05$).

Progesterona [ng/ml]

Estradiol [pg/ml]

Figura 17. Médias \pm EPM para as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o ciclo estral de 12 éguas.

5.2. Período Peri-luteolítico

Quando padronizada a PVU em relação ao momento da luteólise, não houve diferença entre os grupos dupla e simples ovulação. Desta forma, a análise desta variável foi realizada sem diferenciação por grupo. Um aumento estatístico da PVU em relação ao primeiro momento de avaliação dos dados (três dias antes de ocorrer a luteólise, L-3) foi observado até o momento zero, a partir de então houve uma queda até o último momento de avaliação (L3; Figura 18).

Perfusão vascular
uterina (PVU)

Figura 18. Médias±EPM da perfusão vascular uterina (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, classificados em escores de 1 a 4 (mínima e máxima, respectivamente), durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$).

A partir da análise dos dados utilizando-se todas as repetições dos índices Doppler, foi detectada influência do grupo e do momento para RI e PI, mas não houve interação entre grupo e momento.

Na análise do RI, quando desconsiderado o grupo, apenas o L-3 diferiu do L1 e do L3. Quando comparados os grupos, houve diferença estatística entre os momentos 0 ($p=0,003$) e 1 ($p=0,09$; Figura 19).

Na análise do PI, quando desconsiderado o efeito do grupo, foram encontradas algumas diferenças estatísticas ao longo dos dias, apresentadas na Figura 19. Quando comparados os grupos entre si, houve diferença estatística entre os momentos -2 ($p=0,04$) e 0 ($p=0,007$; Figura 19).

Figura 19. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o período peri-luteolítico de 12 éguas L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Asteriscos indicam diferença estatística entre os dois grupos nos momentos sinalizados ($p<0,05$); letras distintas indicam diferença estatística entre os dias, desconsiderando o efeito do grupo ($p<0,05$).

Quando padronizadas as variáveis em relação ao momento da luteólise, a PVUrel não apresentou diferenças entre grupos, no entanto algumas diferenças foram encontradas ao longo do tempo, apresentadas na Figura 20.

Para RIrel, não houve diferença entre os grupos ($p=0,07$), nem do momentos ($p=0,16$), nem interação entre grupo e momento ($p=0,56$; Figura 20).

Para PIrel, não houve diferença entre os grupos ($p=0,06$), nem interação entre grupo e momento, mas houve efeito do momento. Desta forma, para análise foram utilizadas as médias sem diferenciação por grupo. O PIrel antes do momento da luteólise se encontrava com valores mais altos, apresentando uma queda no L-1, que se manteve até 3 dias após a luteólise (Figura 20).

Figura 20. Médias \pm EPM dos índices de resistência relativo (RIrel), pulsatilidade relativo (PIrel) e perfusão vascular uterina subjetiva relativa (PVUrel), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais, durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$).

Durante o período peri-luteolítico, o grupo não afetou o edema uterino. Nesta fase, o edema uterino apresentou um aumento progressivo, como expresso na Figura 21.

Edema uterino

Figura 21. Médias \pm EPM do edema uterino, classificados em escores de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente), durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$).

As concentrações plasmáticas de P4 ao longo do período peri-luteolítico não foram influenciadas pelos grupos. Nesta fase, todos os dias diferiram estatisticamente em relação ao L0, havendo uma diminuição progressiva nos valores durante o período avaliado. As diferenças estatísticas estão apresentadas na Figura 22.

Os grupos dupla e simples ovulação não afetaram as concentrações plasmáticas de estradiol ao longo do período peri-luteolítico, período no qual pode ser observado um aumento numérico progressivo ao longo dos dias. As diferenças estatísticas estão apresentadas na Figura 22.



Figura 222. Médias \pm EPM das concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol, durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias, dentro da mesma variável ($p < 0,05$).

5.3. Correlação entre as variáveis respostas

5.3.1. Diestro e estro

Como não houve influência dos diferentes grupos durante os períodos de diestro e estro, as médias das variáveis respostas foram testadas, sem distinção de grupos, para avaliar as correlações lineares. As correlações entre todas as variáveis respostas estão descritas nas Tabelas 3 a 8 (Anexos). No diestro, o PI apresentou correlações lineares com a PVU ($p < 0,05$), o RI apresentou tendência a correlação linear ($p = 0,06$) com o PI e com a PVU, enquanto o edema uterino apresentou correlação linear com os níveis plasmáticos de E2 e apenas tendência à correlação linear com as concentrações plasmáticas de P4 (Figura 23).

e (PI)

Figura 23. Médias±EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; edema uterino em um escore de classificação de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente); e concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona, durante o diestro de 12 éguas. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

Durante o estro, houve uma alta correlação linear da P4 com o E2 ($p=0,04$) e com a PVU ($p=0,04$), o E2 apresentou uma tendência a correlação linear com a PVU ($p=0,06$), enquanto os índices Doppler se mostraram altamente correlacionados ($p=0,008$; Figura 24).

[m I]

Figura 234. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o estro de 12 éguas. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p<0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

5.3.2. Período Peri-luteolítico

Durante o período peri-luteolítico, foi encontrada influência dos diferentes grupos no padrão das variáveis respostas ao longo dos dias, no entanto, quando realizada a avaliação das correlações lineares, o grupo não interferiu nos resultados. Desta forma, são apresentadas a seguir as correlações lineares com as médias gerais das variáveis (Figuras 25, 26 e 27).

Figura 25. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

Figura 246. Médias \pm EPM dos índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; edema uterino em um escore de classificação de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente); concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

Figura 257. Médias±EPM dos índices de resistência (RI), pulsatilidade (PI) e perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), por meio da coleta de dados em vasos uterinos locais; edema uterino em um escore de classificação de 0 a 4 (mínimo e máximo, respectivamente) durante o período peri-luteolítico de 12 éguas. L0 foi considerado o dia em que a P4 plasmática atingiu concentrações abaixo de 1ng/ml. O coeficiente de correlação (r) indica o grau de correlação linear entre as variáveis. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$, e a tendência estatística foi definida entre 0,1 e 0,05.

6. DISCUSSÃO

A perfusão vascular uterina está diretamente relacionada ao estágio do ciclo estral, apresentando grande influência dos hormônios esteroidais neste processo (FORD, 1982; ROMAN-PONCE et al., 1983; BOLLWEIN et al., 2000; BOLLWEIN et al., 2002b; BOLLWEIN et al., 2004; RAINE-FENNING et al., 2004; SPRAGUE et al., 2009).

Como esperado, não houve diferença nas variáveis uterinas entre os cornos ipsi e contralateral ao CL e ao folículo pré-ovulatório, mostrando não haver influência do lado destes na irrigação uterina, como já observado em diversas espécies (FORD & CHRISTENSON, 1979; BOLLWEIN et al., 2000; RAINE-FENNING et al., 2004; PEREIRA et al., 2012).

No presente trabalho, o perfil da perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral, por meio da análise de dados coletados em vasos uterinos locais de pequeno calibre, foi semelhante ao encontrado em dados coletados na artéria uterina (BOLLWIEN et al., 1998; 2002b; 2004).

Entre as variáveis de avaliação da irrigação uterina (PVU, RI e PI), foi observado um mesmo padrão ondular ao longo do ciclo estral, com uma baixa perfusão vascular nos dias 0 e 11, e valores elevados no início do diestro e no estro. Quando utilizados os valores relativos ao dia da ovulação (PVUrel, RIrel e PIrel), o perfil destes ao longo do ciclo estral não diferiu dos valores brutos, apenas apresentou pequenas variações no momento em que diferenças estatísticas foram detectadas, sem que estas influenciassem no perfil ao longo do ciclo estral. Desta forma, não há necessidade da padronização relativa ao D0.

Durante o diestro, o RI apresentou uma tendência a correlação linear com o PI e com a PVU, já estes dois últimos se mostraram altamente correlacionados. Com isto, demonstra-se que a avaliação subjetiva da perfusão vascular uterina, por meio da análise de vasos mesometriais, miometriais e endometriais, é altamente confiável neste período.

O edema uterino durante o diestro manteve-se em concentrações basais, e apresentou correlação linear positiva com o E2 e tendência à correlação linear negativa com a concentração plasmática de P4, como descrito em diversas espécies (GINHER, 1992; MCKINNON et al., 2011) e evidencia a influência dos hormônios esteroidais no processo de aparecimento do edema uterino.

Em muitas espécies, alterações na perfusão vascular uterina foram atribuídas às variações nas concentrações plasmáticas de E2 (FORD, 1982; BOLLWEIN et al., 2000; BOLLWEIN et al., 2002b; RAINE-FENNING et al., 2004). No entanto, no presente estudo, foi encontrada uma baixa correlação deste hormônio às variáveis de avaliação da irrigação uterina no diestro. Da mesma forma, Bollwein et al. (2002b) não encontraram correlação entre o PI coletado na artéria uterina e a concentração plasmática de E2 nesta mesma fase em éguas. Achados estes que fortalecem a hipótese de outros fatores vasoativos estarem envolvidos nas modificações encontradas na perfusão vascular uterina.

Diferentemente dos dados encontrados por Bollwein et al. (2002b), no presente estudo foi verificado um segundo aumento do E2 plasmático, no início do diestro, como descrito por Ginther (1992) e Christensen (2011). Acreditava-se haver uma correlação deste com o aumento da perfusão vascular uterina em torno do D5. Entretanto, podemos observar que o início do aumento destas duas variáveis não foi concomitante, uma vez que a elevação dos níveis plasmáticos de E2 iniciou-se após o aumento detectado na irrigação uterina. Embora, Christensen (2011) relate que o aumento do estradiol durante o diestro se inicia no D3. A supressão progesterônica sobre os efeitos do E2 nos tecidos pode ser uma explicação para não haver aumento da perfusão vascular uterina simultânea ao aumento estrogênico no início do diestro. Bollwein et al. (2004) ao administrarem E2 durante o diestro, não observaram elevação da irrigação uterina no D5 e no D10, momento em que as concentrações plasmáticas de P4 encontraram-se elevadas.

Reforçando a idéia de que o E2 não induz o aumento na perfusão vascular uterina em éguas, Bollwein et al. (2004) encontraram efeito inibitório deste hormônio na irrigação uterina. Os animais que receberam E2 exógeno nos dias 0, 5 e 10 do ciclo apresentaram diminuição da irrigação uterina durante todo o ciclo estral, com exceção do D1, quando comparadas às éguas não tratadas. No entanto este achado não é conclusivo, uma vez que pode ter ocorrido tanto uma *down-regulation* nos receptores de E2, quanto um possível efeito da P4.

Os efeitos dos hormônios diferem-se de acordo com o tecido alvo. O E2 pode tanto estimular quanto inibir o crescimento celular, apresentando efeito antagonico ou sinérgico à P4, dependendo do seu local de ação. Uma possível explicação para isto é a variação da expressão dos tipos de receptores hormonais presentes nos diferentes tecidos (HODGES et al., 1999).

As concentrações plasmáticas de P4 não apresentaram correlação linear com as variáveis de avaliação da irrigação uterina no diestro, como já observado em estudos anteriores em éguas (BOLLWEIN et al., 2002b). A P4 plasmática apresenta um aumento abrupto do D1 ao D5 e, a partir de então, mantém as concentrações altas até iniciar seu declínio no final desta fase. Ao contrário da irrigação uterina, que apresenta um aumento entre D2 e D8 seguido por uma diminuição no final do diestro (D11 e D12). No entanto,

Honnens et al. (2011) sugerem que a P4 no início do diestro seja a responsável por elevar a irrigação uterina, mediada pela ação do óxido nítrico, uma vez que o início do aumento destas duas variáveis coincidem.

O aumento da perfusão vascular uterina no início do diestro também foi detectado em éguas inseminadas, tanto gestantes quanto não gestantes (FERREIRA et al., 2010). Até aquele momento, acreditava-se que esta elevação poderia ser uma resposta a entrada do embrião no útero. No entanto, a ação da presença do embrião era desconhecida, uma vez que mesmo as éguas não gestantes poderiam ter sofrido influência do embrião com conseqüente perda embrionária até o diagnóstico de gestação. Por meio do presente estudo, pode-se confirmar que este aumento da irrigação uterina durante o diestro ocorre fisiologicamente no ciclo estral da égua, independente da presença do embrião. Mas ainda não se sabe ao certo quais mecanismos e fatores estão envolvidos neste evento, podendo haver relação com a preparação uterina para recebimento do embrião.

As modificações na expressão dos receptores ao longo do ciclo estral são outros fatores importantes que podem estar relacionados às mudanças na relação existente entre os hormônios esteroidais e as alterações hemodinâmicas no útero. Em torno do D11, há uma evidente diminuição da irrigação uterina. Nesta mesma fase, há uma diminuição progressiva dos receptores endometriais de P4 (HARTT et al., 2005), que pode estar relacionada às modificações na hemodinâmica do útero. Entretanto o padrão de expressão dos receptores de P4 no endotélio vascular uterino não é conhecido, podendo este coincidir ou não com o encontrado no endométrio, durante esta fase do ciclo estral.

Durante o estro, apesar da alta correlação entre os índices Doppler, não houve correlação destes com a PVU, ao contrário do observado no diestro. No estro há uma vasodilatação uterina e elevação do edema endometrial, não encontradas no período de diestro (GINTHER, 1992). Estas características influenciaram o padrão vascular, gerando uma diferença deste entre as duas fases do ciclo estral. Desta forma, houve uma dificuldade em manter no estro o mesmo padrão de avaliação da PVU utilizado no diestro, levando a uma dificuldade em prever subjetivamente a PVU do estro.

Ao passo que, apenas a P4 possuiu correlação linear negativa com a PVU no estro, achados estes ainda não descritos para éguas. Em estudos anteriores, éguas e vacas não apresentaram correlação deste hormônio à irrigação uterina (BOLLWEIN et al., 2000; 2002b), enquanto porcas e ovelhas apresentaram uma forte correlação negativa ao longo de todo o ciclo estral (FORD & CHRISTENSON, 1979; ROMAN-PONCE et al., 1983). Entretanto, podemos observar que em éguas e vacas, quando avaliada a irrigação uterina por meio da ultrassonografia Doppler, os autores utilizaram os índices Doppler como forma de prever a irrigação uterina. No presente estudo, também não foram encontradas correlações entre os índices Doppler e a P4, sendo este o primeiro estudo a correlacionar a avaliação subjetiva da perfusão vascular uterina às concentrações plasmáticas dos hormônios esteroidais. Uma possível explicação para o contraste entre estes dados é a dificuldade encontrada no presente estudo em prever com eficiência a PVU durante o estro.

Corroborando com os achados de Honnens et al. (2011), no presente trabalho, a P4 apresentou correlação positiva com a perfusão vascular uterina. Similarmente, Bollwein et al. (2004) observaram que a administração de P4 exógena diminuiu a irrigação uterina de éguas.

Ao contrário do esperado, não houve correlação dos índices Doppler às concentrações plasmáticas de E2 na fase folicular, como encontrado em dados coletados na artéria uterina em éguas (BOLLWEIN et al., 2002b) e em mulheres (RAINE-FENNING et al., 2004). Uma hipótese que pode explicar esta não correlação, são os inúmeros fatores que influenciam a acurácia da técnica da dosagem plasmática de E2.

Em contrapartida, nesta mesma fase, foi encontrada uma tendência à correlação linear da PVU com o E2, concordando com os dados encontrados para outras espécies que assumem que o estradiol está diretamente relacionado ao aumento da irrigação uterina (FORD & CHRISTENSON, 1979; FORD, 1982; BOLLWEIN et al.; 2002b; RAINE-FENNING et al., 2004). No estro há uma elevação na expressão dos receptores α de E2 presentes no endotélio vascular uterino de ovinos, quando comparada à dinâmica destes receptores no diestro, mostrando haver grande influência deste hormônio no

aumento da irrigação uterina encontrada neste momento (PASTORE et al., 2012).

Para as variáveis descritas até agora, não houve diferença entre os grupos dupla e simples ovulação, provavelmente devido às alterações encontradas nas variáveis respostas serem discretas, necessitando de um maior número de animais para que se possa observar diferenças estatísticas. Além disso, Witt et al. (2012) demonstraram que éguas superovuladas apresentam aumento na perfusão vascular uterina e nos níveis plasmáticos de E2. Entretanto, estas diferenças foram estatisticamente observadas quando havia presença de três ou mais folículos pré-ovulatórios. No presente estudo, as éguas apresentaram apenas dois folículos pré-ovulatórios.

Embora não tenham sido detectadas diferenças estatísticas entre os grupos dupla e simples ovulação, o grupo dupla ovulação apresentou valores numericamente menores (maior irrigação) nos índices Doppler relativos (RIrel e PIrel) e no RI, durante todo o ciclo.

Até o presente momento, não havia sido relatada a irrigação uterina no período peri-luteolítico. Quando se avalia o ciclo estral, por haver variações no dia da luteólise entre os animais, consagradamente utiliza-se o valor médio de duração do período de estro e diestro, havendo, desta forma, um corte dos dados que excederam este período, corte este que coincide com o período da luteólise. Contudo, a normatização dos dados para o dia de detecção da luteólise ($[P4] < 1\text{ng/mL}$) permitiu a avaliação deste período.

As variáveis de avaliação da irrigação uterina apresentaram-se altamente correlacionadas nesta fase, se mostrando, desta forma, capazes de predizer com confiabilidade a perfusão vascular uterina.

Com a queda abrupta nas concentrações plasmáticas de P4 no momento da luteólise, nota-se um aumento na PVU. Tal fato possivelmente esteja relacionado ao desbloqueio que a P4 exerce nos receptores de E2 descrito por Vanderwall (2011), uma vez que, no momento da luteólise, os receptores uterinos de E2 e P4 iniciam um aumento. Talvez este padrão de expressão dos receptores seja semelhante ao encontrado nos vasos presentes no útero.

Entretanto, no final desta fase, a PVU apresentou uma queda discreta, que pode ser explicada pela crescente vasodilatação e aparecimento do edema

endometrial, com a conseqüente dificuldade em manter o mesmo padrão de avaliação da PVU antes e após a luteólise, como mencionado anteriormente.

Quando desconsiderado o efeito do grupo para os índices Doppler no período peri-luteolítico, o estradiol pareceu promover um aumento no RI e PI, corroborando com os achados de Honnens et al. (2011), que observaram que do D11 ao estro houve um aumento da perfusão vascular uterina induzida pelo estradiol, modulada pela ação do óxido nítrico.

Para os índices Doppler, o grupo dupla ovulação apresentou valores mais elevados (menor irrigação uterina) em momentos pontuais do período peri-luteolítico. Informação esta conflitante aos achados de Witt et al. (2012), que observaram um aumento da irrigação uterina durante o estro em éguas superovuladas. Entretanto, devido à uma grande variação individual das éguas e ao baixo número de animais que compunham o grupo dupla ovulação, esta diferença estatística encontrada pode ser atribuída a estes fatores, merecendo estudos com maior número de animais e utilizando delineamento estatístico onde repetem-se os animais em ambos os grupos, para eliminar variações externas.

Como não foram encontrados relatos na literatura a respeito da dinâmica dos fatores que influenciam a hemodinâmica uterina padronizados de acordo com o momento da luteólise, a análise comparativa dos resultados do presente estudo se torna dificultada.

7. CONCLUSÃO

O ovário em que o corpo lúteo e o folículo pré-ovulatório estão localizados não interfere na perfusão vascular dos cornos uterinos de éguas não gestantes.

A avaliação subjetiva da perfusão vascular do útero, por meio da análise de vasos endometriais, miometriais e mesometriais, é capaz de prever com acurácia a resistência vascular dos mesmos e, conseqüentemente, a perfusão vascular uterina durante o diestro. Ao passo que, no estro, uma padronização desta técnica ainda se faz necessária.

A perfusão vascular uterina apresenta um padrão ondular ao longo do ciclo estral, com uma diminuição no dia da ovulação e no final do diestro, e aumentos no início do diestro e estro.

Os hormônios esteroidais, estradiol e progesterona, estão diretamente correlacionados à hemodinâmica uterina ao redor do período luteolítico e durante o estro. No entanto, há diversos fatores mediadores que estão envolvidos na regulação da perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral, e poucos são os aspectos já elucidados, merecendo grande enfoque dos estudos atuais.

8. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R.; CONWAY, G. S. ; SLADKEVICIUS, P.; PAYNE, N. N.; BEKIR, J. ; CAMPBELL, S.; TAN, S. L.; JACOBS, H. S. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in the normal menstrual cycle: association with changes in ovarian and uterine Doppler blood flow. **Clinical Endocrinology**, v.50, p. 101–106, 1999.

BOLLWEIN, H.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 61, p.1137–1146, 2004.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 49, p.1483-1488, 1998.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H.H.D.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v.53, p.1541-1552, 2000.

BOLLWEIN, H.; STOLLA, R.; ROHR, S.; WELTER, H.; WEBER, F.; EINSPANIER, R. Relationships between uterine blood flow, estrogens and nitric oxide in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 575-578, 2002a.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v. 65, p. 2129-2138, 2002b.

BJORNSTROM, L.; SJOBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 833–842, 2005.

CATON, D.; ABRAMS, R. M.; CLAPP, J. F.; BARRON, D. H. The effect of exogenous progesterone on the rate of blood flow of the uterus of ovariectomized sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v.59, p.225-231, 1974.

CHRISTENSEN, B. W. Estrogens. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W. E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. chap.169, p.1631-1636.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v.18, p.4-25, 1997.

FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-50, 2008.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p.105-111, 2011.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during early gestation in mares: New concepts of evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 281-283, 2010.

FORD, S.P.; CHRISTENSON, R. K. Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy: local effect of the conceptus on the uterine blood supply. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 617-624, 1979.

FORD, S.P. Control of Uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cow. **Journal of Animal Science**, v. 55, p. 32-42, 1982.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biology of reproduction**, v. 61, p. 724–730, 1999.

GEISERTE, R.D.; MALAYER, J.R. Implantação. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. p.127.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, p. 379–388, 2005.

GINTHER, O.J.; HANNAN, M.A.; BEG, M.A. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF₂ α , progesterone, LH, and estradiol in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, p. 174–184, 2011.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**, 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 642p., 1992.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D. Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography**. Ed. OJ Ginther, 1. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007. 258p.

GREISS, F.; ANDERSON, S.G. Effect of ovarian hormones on the uterine vascular bed. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 107, p. 829–836, 1970, apud Bollwein et al. (2004).

GOSWAMY, R.K.; WILLIAMS, G.; STEPTOE, P.C. Decreased uterine perfusion – a cause of infertility. **Human Reproduction**, v. 3, p. 955-999, 1988.

HARTT, L.S.; CARLING, S.J.; JOYCE, M.M.; JOHNSON, G.A.; VANDERWALL, D.K.; OTT, T.L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v.130, p. 241–250, 2005.

HODGES, Y.K.; RICHER, J.K.; HORWITZ, K.B.; HORWITZ, L.D. Variant estrogen and progesterone receptor messages in human vascular smooth muscle. **Circulation**, v. 99, p. 2688-2693, 1999.

HONNENS, A.; WEISSER, S.; WELTER, H.; EINSPANIER, R.; BOLLWEIN, H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. **Journal of reproduction and development**, v. 57, p. 43-48, 2011.

IGNÁCIO, F.S.; CANESIN, H. S.; PANTOJA, J. C. F.; ROMANO, R.M.; FERREIRA, J.C.; NOVAES FILHO, L. F.; MEIRA, C. Uterine hemodynamic evaluation of the beginning of diestrous in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 406-407, 2012.

IGNÁCIO, F.S.; FERREIRA, J.C.; MEIRA, C. Uterine and luteal hemodynamic evaluation of the non pregnant mare. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 117-121, 2011a.

IGNÁCIO, F.S.; FERREIRA, J.C.; MELO, R.P.; ABREU, N.C.; ARAÚJO, G.H.; MEIRA C. Uterine hemodynamic evaluations in recipient mares: preliminary results. In: **II Congreso Argentino de Reproducción Equina**. p. 533-536, 2011b.

JOKUBKIENE, L.; SLADKEVICIUS, P.; ROVAS, L.; VALENTIN, L. Assessment of changes in endometrial and subendometrial volume and vascularity during the normal menstrual cycle using three-dimensional power Doppler ultrasound. **Ultrasound Obstetrics Gynecology**, v. 27, p. 672–679, 2006.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. **Equine endometrial biopsy**. In: Current Therapy in Theriogenology 2.ed. by D.A. Morrow. Philadelphia, W.B. Saunders, 1986, p.723-729.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W. E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 3288 p.

MAGNESS, R. R.; PARKER, C. R.; ROSENFELD, C. R. Systemic and uterine responses to chronic infusion of estradiol-17 beta. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 265, p.690-698, 1993.

MULAC-JERICEVIC, B.; MULLINAX, R.A.; DEMAYO, F.J.; LYDON, J.P.; CONNEELY, O.M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science**, v. 289, p.1751–1754, 2000.

MULAC-JERICEVIC B, LYDON JP, DEMAYO FJ, CONNEELY OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. **PNAS**, v. 100, p. 9744–9749, 2003.

PASTORE, M.B.; SHEIKH, O.J.; JAYANTH, R.; MAGNESS, R.R. estrogen receptor- α and estrogen receptor- β in the uterine vascular endothelium during

pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow. **Semin Reprod Med**, v. 30, p. 46–61, 2012.

PEREIRA, B.S.; FREIRE, L.M.P.; PINTO, J.N.; DOMINGUES, S.F.S.; SILVA, L.D.M. Triplex Doppler evaluation of uterine arteries in cyclic and pregnant domestic cats. **Animal Reproduction Science**, v.130, p.99– 104, 2012.

RAINE-FENNING, N.J.; CAMPBELL, B.K.; KENDALL, N.R.; CLEWES, J.S.; JOHNSON, I.R. Quantifying the changes in endometrial vascularity throughout the normal menstrual cycle with three dimensional power Doppler angiography. **Human Reproduction**, vol.19, p. 330-338, 2004.

ROMAN-PONCE, H.; CATON, D.; THATCHER, W.W ; LEHRER, R. Uterine blood flow in relation to endogenous hormones during estrous cycle and early pregnancy. **American Journal of Physiology**, v. 245, p. 843-849, 1983.

SAG˘SÖZ, B.G.; SARUHAN, H. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids H. **Theriogenology**, v.75, p. 1720–1734, 2011.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology Reproduction**, v. 72, p. 755–761, 2005.

SISSON, S. Aparelho urogenital de equinos. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 491-514.

SPRAGUE, B.J.; PHERNETTON, T.M.; MAGNESS, R.R.; CHESLER, N.C. The effects of the ovarian cycle and pregnancy on uterine vascular impedance and uterine artery mechanics. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, s.144, p.170–S178, 2009.

TSAI, M.J.; CLARK, J.H.; SCHRADER, W.T.; O'MALLY. **Mechanisms of action of hormones that act as transcription regulatory factors**. In: Wilson

JD, Foster DW, Kronenberg HM, et al., editors. Williams textbook of endocrinology. Philadelphia: WB S, apud Bollwein et al. (2004).

VANDERWALL, D. K. Progesterone. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W. E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. chap.170, p.1637-1641.

WITT, M.C.; BOLLWEIN, H.; PROBST, J.; BAACKMANN, C.; SQUIRES, E.L; SIEME, H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. **Theriogenology**, v. 77, p. 1406–1414, 2012.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

9.1. Trabalho enviado para revista “Equine Veterinary Journal”

Early and transient changes on uterine vascularity and Spectral-Doppler measurements during the first days post-ovulation in pregnant and non-pregnant mares

J. C. Ferreira^{1#}, H. S. Canesin¹, F. S. Ignácio¹, C. Meira^{1*}

¹UNESP - State University of São Paulo, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology SP18618-970, Brazil

Correspondences J.C. Ferreira, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu 18618-970, São Paulo, Brasil. Phone: 01-14-81372228. Email: jaircfvet@yahoo.com.br

* Email: meira@fmvz.unesp.br

Summary

Coordinated vascular development and a uterine blood supply are necessary for conception, successful embryo development and maintenance of pregnancy. New approaches to colored Doppler ultrasonography were used to evaluate the uterine hemodynamics of pregnant and non-pregnant mares. A total of 28 mares were assigned to three groups according the insemination procedure and diagnosing pregnancy: non-inseminated (G1; n=7 mares), inseminated non-pregnant (G2; n=7 mares) and pregnant (G3; n=14 mares) groups. Doppler end point (uterine vascular perfusion and mesometrial Doppler indices) were evaluated from D0 to D12 (G1 and G2) and during the first 20 days of gestation (G3). A pronounced and transitory increase in uterine vascularity associated with low values of Doppler indices around D4 was observed ($P<0.001$) in mares from G1 and G3. Uterine vascularity of G2 did not change ($P>0.1$) between D1 and D11. In pregnant mares, a progressive increase on uterine blood flow was detected ($P<0.001$) from D12. Additionally, a uterine horn with an embryo had greater ($P<0.01$) uterine vascular perfusion and lower ($P<0.01$)

mesometrial Doppler indices than the opposite horn. Arteries from mesometrium attachment were adequate for the measurement of Doppler indices during diestrus and early gestation. Our results demonstrated for the first time a simultaneous increase and decrease in uterine vascularity and mesometrial Doppler indices, respectively, during the first days post-ovulation in pregnant and non-inseminated mares. The low and continuous uterine blood flow of inseminated non-pregnant mares indicates uterine hemodynamics disturbances as a potential cause of subfertility.

Keywords: mare, uterus, embryo, artificial insemination, pregnancy, Doppler ultrasonography

Introduction

A transient breeding-induced inflammatory process is a physiologic response of the uterus observed after insemination is necessary for the effective elimination of sperm, seminal plasma and bacteria [1]. However, a persistent post-mating endometritis may play a role in the pathogenesis of early embryonic loss in mares [2].

Several studies have demonstrated that an uninterrupted and complete interaction between uterus and conceptus is essential for the establishment and maintenance of pregnancy [3, 4, 5, 6]. In the uterine lumen, the young and mobile embryo vesicle provides signals for maternal recognition of pregnancy, which ensures the lifespan and secretory function of the corpus luteum [7].

Ultrasonic Doppler technology provides colored blood flow images of the equine reproductive tract. This technology has the potential to increase the diagnostic, monitoring, and predictive capabilities of theriogenologists and researchers [8]. Color and power Doppler ultrasonography are noninvasive pulse wave techniques that have

recently been used to study the uterine hemodynamics of pregnant and non-pregnant mares [5, 9, 10, 11].

There are no reports of the changes on the uterine tissue vascularity and mesometrial Doppler velocimetry during the first days after artificial insemination. Bollwein et al. [9] described an increased blood flow velocity in the uterine artery few hours after semen infusion in mares. However, no directly evaluation of the uterine tissue hemodynamic has been done on the succeeding days. Earlier study in pregnant mares, using conventional color-flow imaging, found low endometrial vascular perfusion during the first nine days post-ovulation and increased vascularity after day 12[4]. Nevertheless, the Doppler signals present on the myometrium were not considered in the respective study and the approach used was not able to produce endometrial spectral waveforms during the diestrus and early gestation. Therefore, the correlation between Doppler index values from mesometrial attachment arteries and uterine vascular perfusion during the early gestation remains unknown in mares.

Power-flow mode Doppler could have advantages over conventional Color-flow imaging [8], and the myometrial blood vessel network should be considered for the evaluation of uterine hemodynamics in mares [11]. Probable, the determination of mesometrial Doppler indices, associated with a more sensitive and detailed evaluation of uterine vascularity, will provide important evidence in understanding the physiology of the uterine post-breeding response and early gestation in mares. In the future, this knowledge will be fundamental in diagnosing pregnancy disorders earlier.

The overall purpose of the present study was to characterize the hemodynamics of the uterus after artificial insemination and during the early gestation in mares. The specific goals were to (1) evaluate the influence of the semen infusion on the uterine blood flow,(2) determine the spectral-Doppler measurements from mesometrial attachment arteries and uterine vascularity through the first 20 days of pregnancy, and

(3) to evaluate the efficiency of the Doppler technology for the early pregnancy diagnosis in mares.

Materials and Methods

Animals and experimental groups

A total of 28 mares were kept under natural light in an open shelter and outdoor paddock at CERBEQ, Reproduction Center of the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, UNESP. Animals were handled in accordance with the São Paulo State University Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Research.

The mares were mixed breeds weighing 270-410 kg and were 5-12 years of age (mean 10.2 ± 0.7 years). Animals were maintained on grass hay and pelleted feed with free access to water and trace-mineralized salt. The age of the mares was estimated from dental characteristics [12]. Only mares without macroscopic abnormalities in the reproductive tract were used.

Experiment 1: Effect of semen infusion and conception on uterine hemodynamics of mares

To evaluate the effect of semen infusion and conception the uterine blood flow, the mares were retrospectively assigned into three experimental groups according to insemination procedure and, posteriorly, visualization of the embryonic vesicle: Non-inseminated group (n=7 mares; G1), Inseminated Non-pregnant group (n=7 mares; G2)

and Pregnant group (n=14 mares; G3). Data collection was done daily between D0 and D12(D0 = day of ovulation).

Examinations to confirm pregnancy were performed every day, starting from D9, using conventional B-mode ultrasonography. In inseminated non-pregnant mares (G2), a final ultrasound exam was performed on D15 to confirm the absence of the embryonic vesicle.

Mares from G2 and G3 were artificially inseminated 24 hours after induction of ovulation with hCG (2500 IU, i.v.), administered when a preovulatory follicle reached 35 mm in diameter. A stallion with proven fertility was used. Sperm concentrations of the ejaculates ranged from 50 to 100 x 10³spermatozoa/mm³ with 50–70% progressively motile sperm.

Experiment 2: Effect of CL position and embryo location on uterine hemodynamic in pregnant mares

Posteriorly to the visualization of the embryo vesicle, pregnant mares from G3 (n=14 mares) were used to evaluate the influence of side of ovulation and embryo mobility on the gravid uterus hemodynamic. Data collection was done in both uterine horns considering the uterine horn side (left *versus* right), position of the CL (ipsi *versus* contralateral to CL) and embryo vesicle location (horn with embryo *versus* opposite horn). Doppler ultrasonic end points were evaluated every 24 hours from D12 to D20.

Ultrasonography and Doppler End Points

Mares were scanned using a triplex B-mode (gray scale) and pulsed-wave color Doppler ultrasound instrument (Sonoace Pico; Medison do Brasil Ltda) equipped with a linear-array multifrequency transducer (LV5-9CDn, 5 to 9 MHz) with a beam-field width of 60mm. The principles, techniques, and interpretations of B-mode examinations of the mare reproductive tract have been reviewed [13]. The brightness and contrast controls of the monitor, and the gain controls of the scanner, were standardized to constant settings [14].

To determine the day of fixation on Experiment 2, the location of the vesicle within the uterus was evaluated every five minutes and for two consecutive hours per day from D12, as previously described by Leith & Ginther [15]. Day of fixation was defined as the first day that the embryonic vesicle was in the same uterine segment during every daily examination [13]. A final ultrasound exam was performed one day later to confirm the location of the vesicle.

Uterine hemodynamics of pregnant and non-pregnant mares was based on Doppler end points: uterine vascular perfusion and Doppler indices from mesometrial attachment arteries (Figure 1).

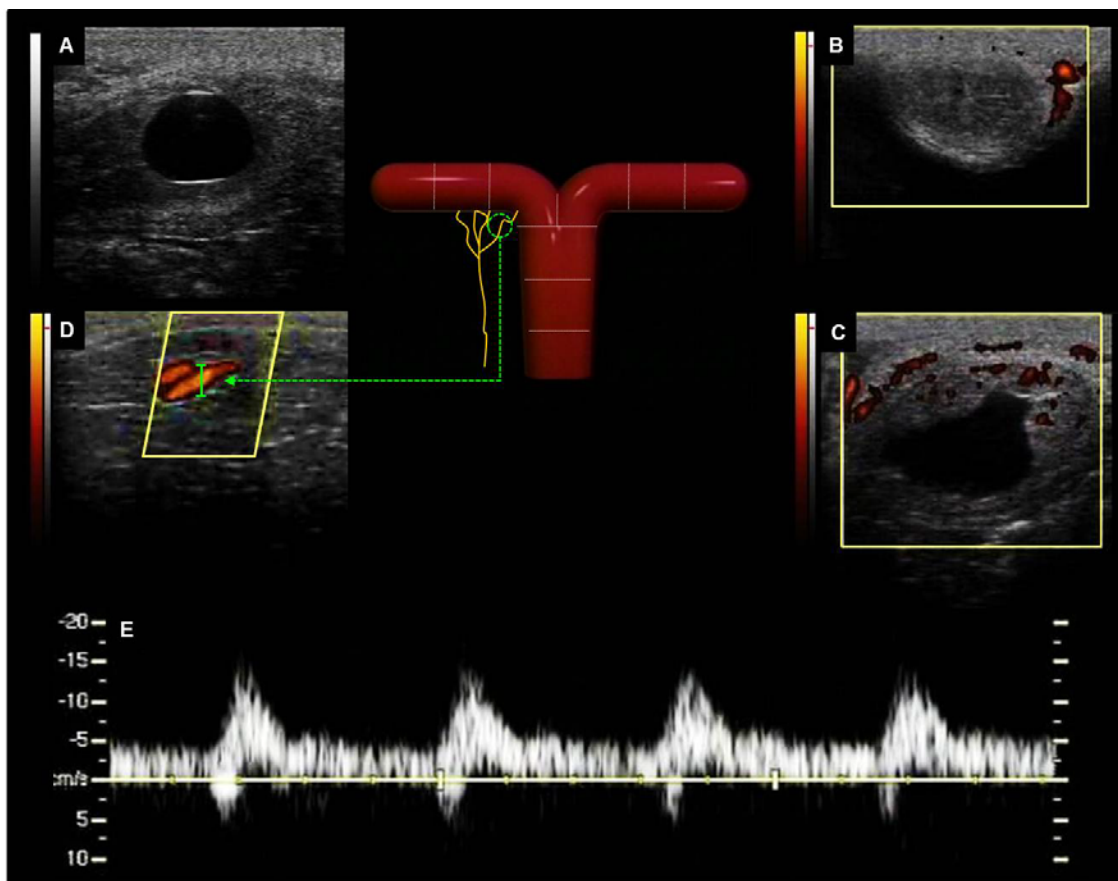


Figure 1. A diagram of the equine uterus with representative ultrasonograms. Uterus is divided into nine identical segments to evaluate the embryonic mobility and determine the day of fixation. (A) Ultrasonic visualization of the embryonic vesicle between D9 and D12 was performed to diagnosing pregnancy. Uterine vascular perfusion from non-pregnant (B) and pregnant (C) mares was estimated using Power-flow Doppler imaging. The sample gate (green cursor; D) was placed in an artery of the mesometrium attachment (green dashed circle) to generate a Doppler frequency spectral graph (E) with a minimum of three identical cardiac cycles. The spectrum graph was used to measure mesometrial blood flow velocities and uterine Doppler indices.

Vascular perfusion from both uterine horns was subjectively estimated by one operator considering the extension of uterine tissue with colored signals of blood flow, as recently described by Ferreira et al [11]. Doppler exams were performed using Power-flow function (Figures 1B and 1C). Only color signals that appeared to be within the limits of the uterus (endometrium and myometrium) were considered. Uterine vascular perfusion was scored from 1 to 4 (minimum to maximum, including fractional scores), based on the percentage of uterine tissue with color signals of blood flow,

during real-time cross-sectioning of the uterus in a continuous 1 minute scan. Different numbers and intensities of colored Doppler signals were detected in distinct segments of the same uterine horn (Figure 2). Therefore, the vascularity was based on the maximum score observed during the ultrasonic exam of the three segments of the uterine horn (distal, central, and corneal-body junction segments).

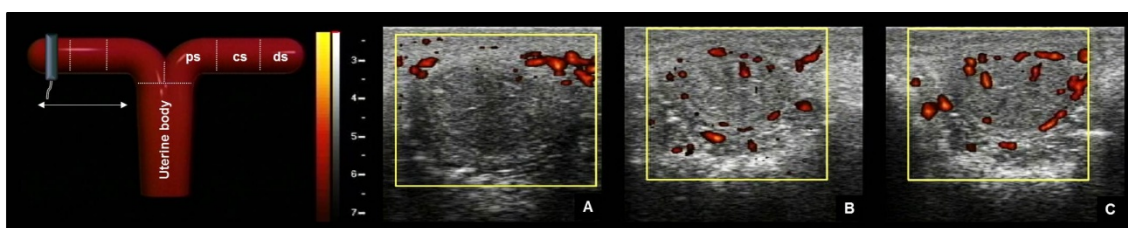


Figure 2. Representative position of the ultrasound transducer and the direction of scanning (white arrow) along the uterine horn for vascular perfusion evaluation are represented. Uterine horn is divided into three identical segments: proximal (ps), central (cs) and distal segments(ds) segments. Cross-sectional images of a single uterine horn in colored Power-flow Doppler mode are shown (A, B and C). Distinct segments of the same uterine horn show different intensity and number of colored Doppler signals, ranging from low (A) to high (B and C) vascularity. To estimate the vascularity, the three uterine horn segments and all uterine layers (endometrium and myometrium) must be evaluated considering the maximum score of colored signals observed.

The evaluated spectral Doppler end points were Pulsatility index (PI) and Resistance index (RI). The formulas for spectral data are well established [8]. Spectral assessment of arterial Doppler indexes were performed as described previously by Silva et al. [4]. To produce a spectral waveform, each entire mesometrium attachment was initially scanned in a slow, continuous motion using the Power-flow Doppler mode. Subsequently, in spectral mode, the sample-gate cursor was placed on an artery of the mesometrium attachment (Figure 1D). Spectral waveform, with a minimum of three cardiac cycles, was generated and one of the cycles was used to measure the spectral end points (Figure 1E). The procedure was repeated twice more, and the average was used for statistical analyses.

Statistical analyses

The scores for uterine vascular perfusion and spectral end points were analyzed by a two-way repeated measure (PROC MIXED, SAS Institute, 2009). To determine the main effects and interactions, a repeated statement was used to account for autocorrelation between sequential measurements. A Tukey's test was used to identify the differences both within and between horns and between groups when significant effects or interactions were identified. A probability of $P \leq 0.05$ was used to indicate significant difference. Data are presented as mean \pm S.E.M.

Results

The mean ages of G1, G2, and G3 (9.5 ± 0.8 , 10.3 ± 0.9 and 9.7 ± 0.9 , ranging from 5 to 12 years, respectively) were similar ($P > 0.1$). A significant presence of intrauterine fluid was not detected during the first three days post-ovulation (G1) or after artificial insemination (G2 and G3).

On experiment 1, no difference ($P > 0.5$) between uterine horns (ipsilateral *versus* contralateral to the CL and left *versus* right) was found for uterine vascular perfusion and mesometrial Doppler indices (PI and RI) of the three groups between D0 and D12. Therefore, the average was used for subsequent statistical analyses.

The variations of uterine vascular perfusion in G1 and G3 were similar ($P > 0.1$) during the first 11 days post-ovulation (Figure 3). In both groups, uterine vascularity was constant and low from D0 to D2, while a pronounced and transitory increase in uterine vascular perfusion was observed ($P < 0.001$) on D4. A second increase in uterine Doppler signals was detected on D12 only in pregnant mares. In inseminated non-pregnant mares (G2), the uterine vascular perfusion did not change ($P > 0.1$) between D1 and D11 (Figure 3).

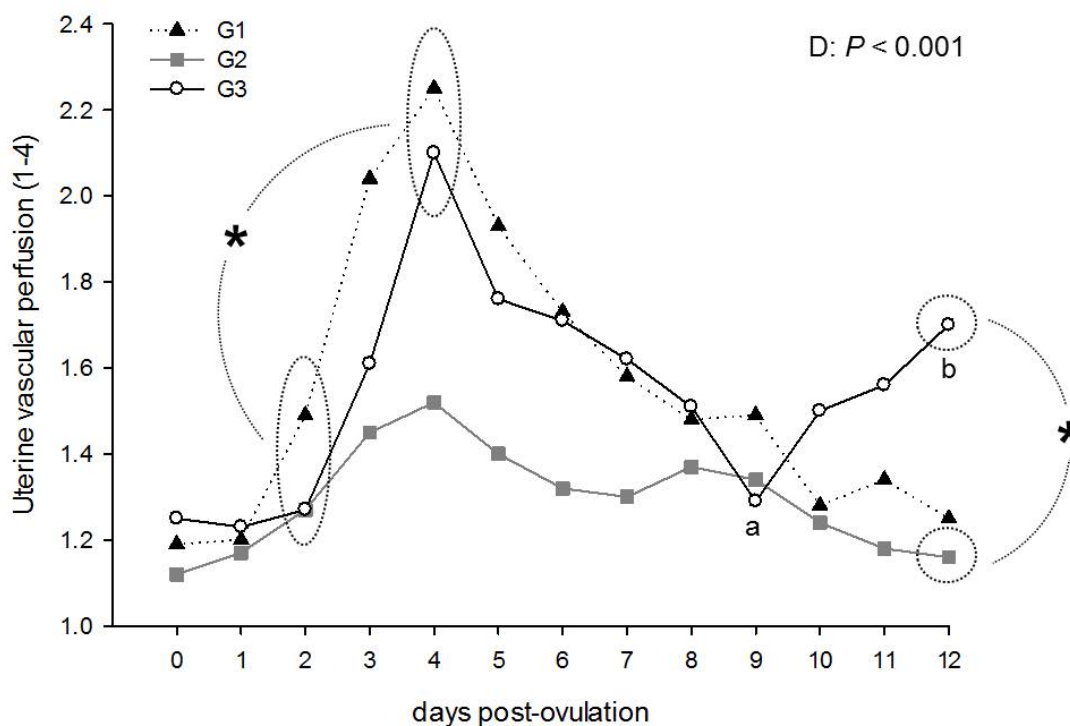


Figure 3. Mean for uterine vascular perfusion of non-inseminated (G1; n=7), inseminated non-pregnant (G2; n=7) and pregnant (G3; n=14) mares during the 12 first days after ovulation. Asterisk symbol indicates significant difference ($P < 0.05$) between days within or between groups. Means with different letters (a,b) within a same group (G3) are different ($P < 0.05$).

An effect of day was observed for mesometrial PI in mares from all groups during the first 12 days post-ovulation (Figure 4). A decreased PI was detected ($P < 0.01$) from D3 to D5 in non-inseminated mares (G1). Mares from G2 showed lower PI on D3 and D7-D8, while decreased PI was detected between D3 and D5 in mares from G3. Additionally, lower and higher PI values were observed from D10 in pregnant and inseminated non-pregnant mares, respectively.

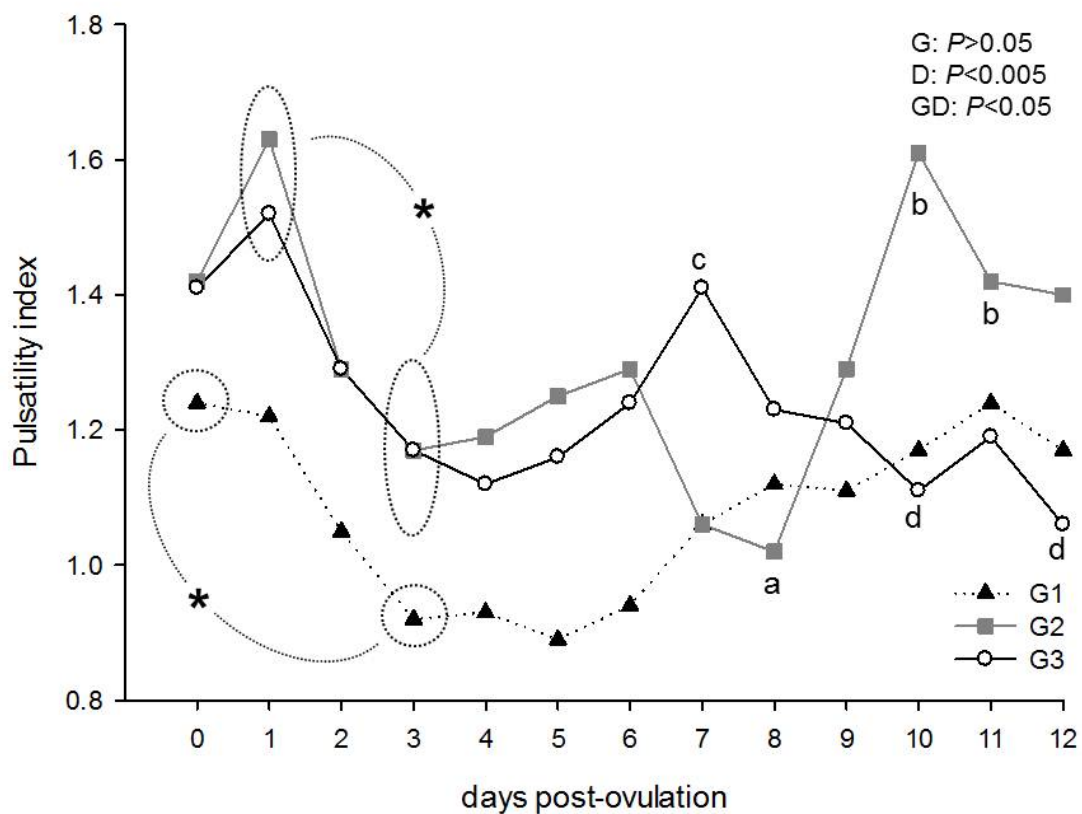


Figure 4. Mean for mesometrial Pulsatility index of non-inseminated (G1; n=7), inseminated non-pregnant (G2; n=7) and pregnant (G3; n=14) mares during the 12 first days after ovulation. Asterisk symbol indicates significant difference ($P < 0.05$) between days within groups. Means with different letters (a, b, c, d) within a same group are different ($P < 0.05$). Probability of P for the effect of group (G), day (D) and their interaction (GD) are shown.

In G1, mesometrial RI did not differ ($P > 0.1$) during the first 12 days post-ovulation. Effect of day for mesometrial RI was detected ($P < 0.001$) in pregnant and inseminated non-pregnant mares (G3 and G2, respectively). Mares from G2 showed decreased RI on D4 and D7-8, while lower RI was observed on D4-5 and from D9 in G3 (Figure 5).

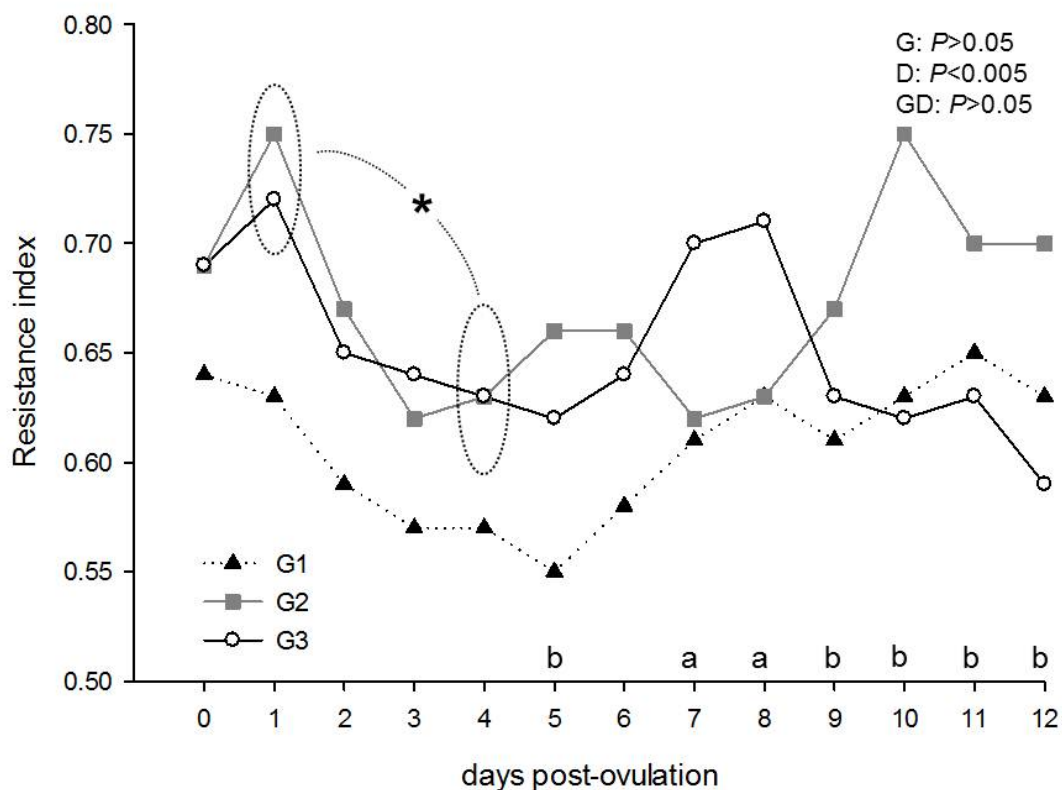


Figure 5. Mean for mesometrial Resistance index of non-inseminated (G1; n=7), inseminated non-pregnant (G2; n=7) and pregnant (G3; n=14) mares through the 12 first days after ovulation (D0). Asterisk symbol indicates significant difference ($P<0.05$) between days within a same group. Means with different letters are different to D1 ($P<0.02$) in G2 (a) or G3 (b). Probability of P for the effect of group (G), day (D) and their interaction (GD) are shown.

On Experiment 2, no effect ($P>0.01$) of CL location was observed for uterine vascular perfusion in pregnant mares through the first 20 days of gestation (Figure 6). A progressive and similar increase in vascularity was detected ($P<0.05$) in both uterine horns (ipsi and contralateral to the CL).

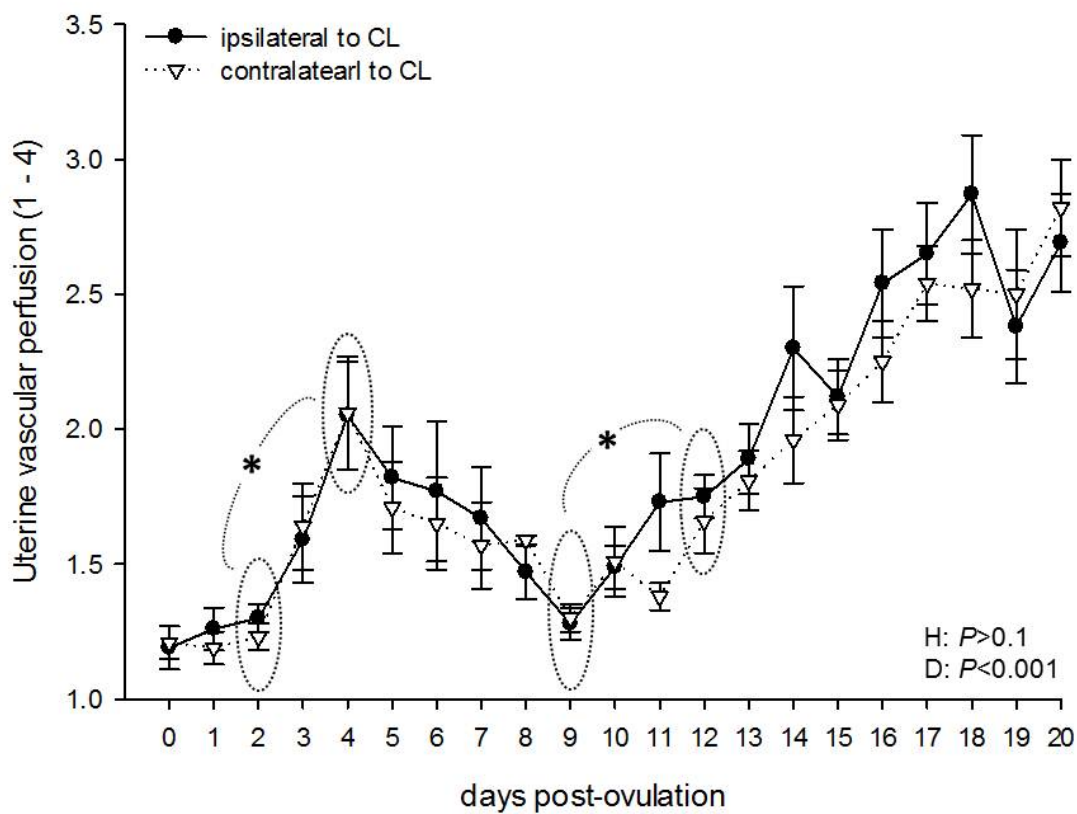


Figure 6. Mean±SEM for vascular perfusion of ipsi and contralateral horn to the CL during the first 20 days of gestation (n=14 mares; G3). Asterisk symbol indicates significant increase on uterine vascularity ($P<0.001$). Probability of P for the effect of horn (H) and day (D) are shown.

The embryonic vesicle was first detected by D9 or D10 (9.72 ± 0.1). The embryo almost always remained in the uterine body between days nine and 11 of gestation. Therefore, the statistical analysis for Doppler end points according to the position of the embryonic vesicle was performed from D12. In all pregnant mares, the cessation of embryo mobility occurred in the caudal segment of one of the uterine horns. No effect on side (left horn *versus* right horn) or CL position (ipsilateral *versus* contralateral to the CL) was detected for location of embryo fixation ($P>0.1$).

Considering the position of the embryo, an effect of horn (with embryo *versus* opposite horn) was detected ($P<0.001$) on uterine vascular perfusion and the mesometrial Doppler indices from D12 to D20 of gestation (Figures 7, 8 and 9).

Progressive increases in uterine vascular perfusion with distinctive intensities were observed ($P<0.001$) in both uterine horns according to the embryo position (Figure 7). The uterine vascularity of horns with and without an embryo did not differ from D12 to D14. However, a more pronounced increase in vascular perfusion was detected in the horn with the embryo from D15 (Figure 7). The mean vascularity of the uterine horn without an embryo was significantly lower than the observed vascularity in the uterine horn with an embryo from D12 to D20 (1.94 ± 0.01 and 2.39 ± 0.01 , respectively).

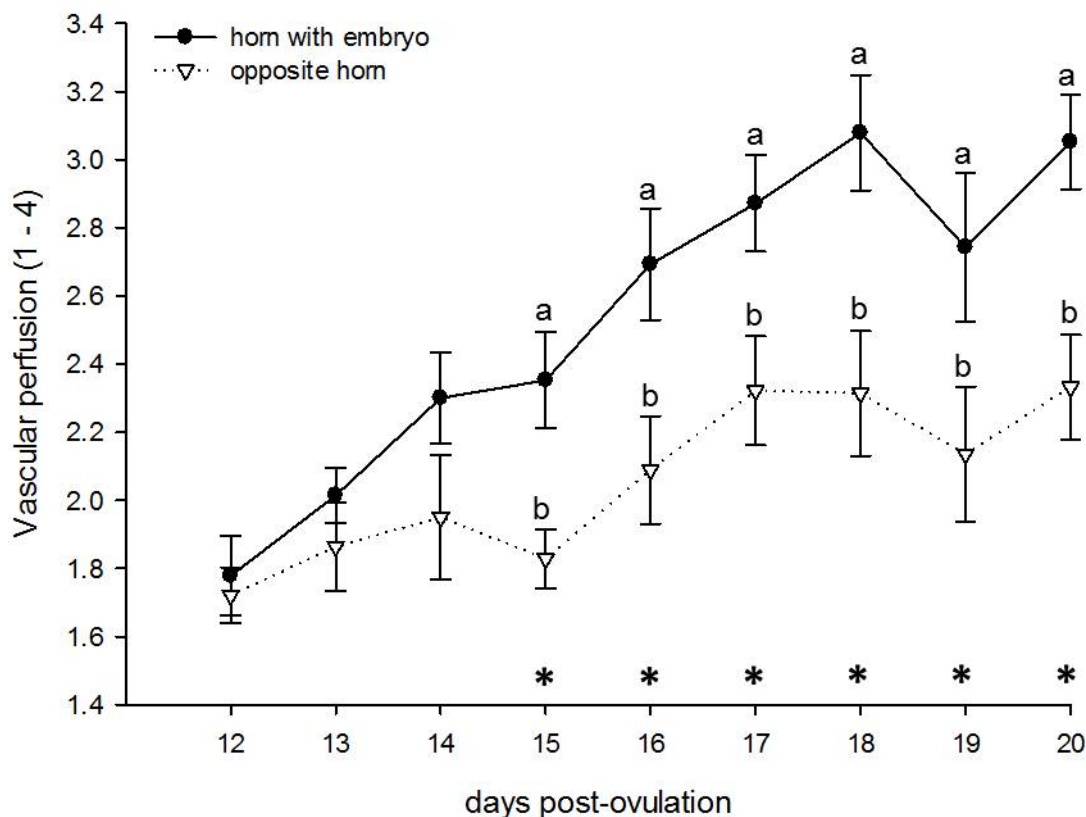


Figure 7. Mean±SEM for vascular perfusion of uterine horns (with embryo and opposite horn) from day 12 to 20 of gestation in mares (n=14). Asterisk symbol indicates a day with significant difference ($P<0.05$) to D12 in both horns. Different letters (a,b) indicates statistically difference ($P<0.05$) between uterine horns in the day.

Effect of uterine horn and day were observed ($P<0.004$) for mesometrial PI and RI between days 12 and 20 of gestation (Figure 8 and 9, respectively). Additionally, no significant difference was detected for the interaction H:D of mesometrial Doppler indices. Between D12-20 of gestation, greater values for mean PI and RI were observed in the horn ipsilateral to the embryo compared to the contralateral horn.

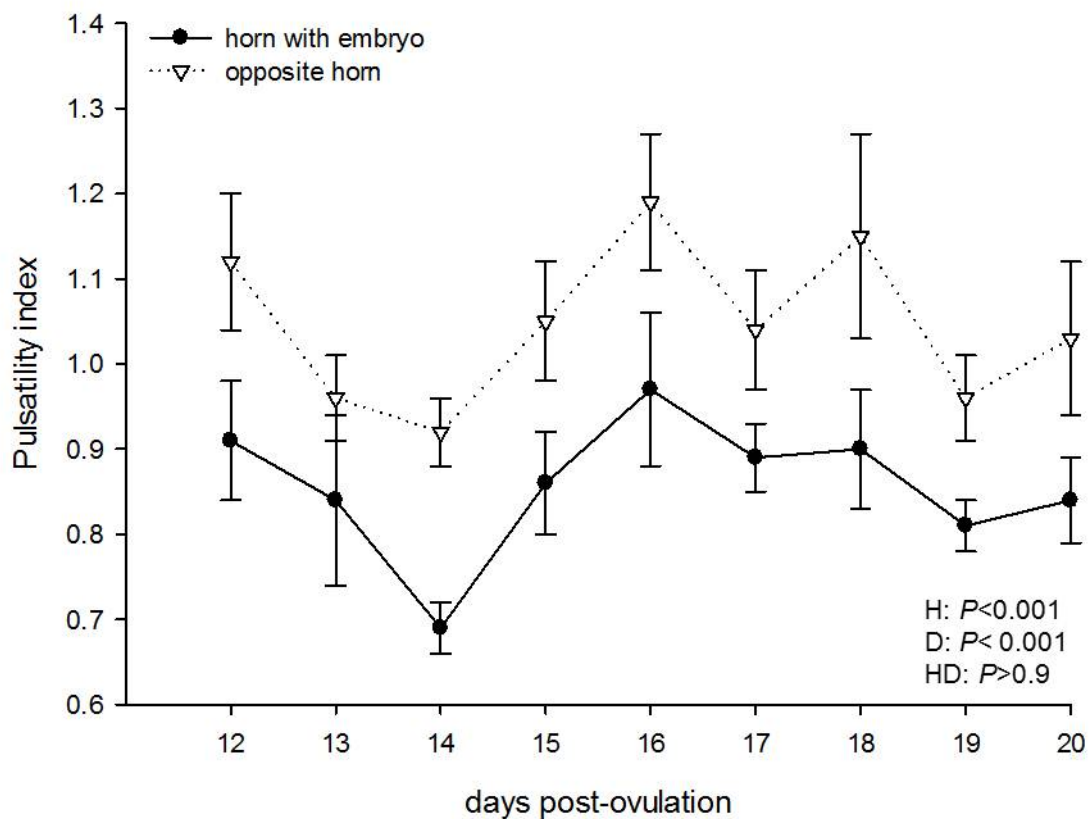


Figure 8. Mean±SEM for mesometrial Pulsatility index of uterine horns (with embryo and opposite horn) between days 12 and 20 of gestation in mares (n=14). Probability of P for the effect of horn (H), day (D) and their interaction (HD) are shown.

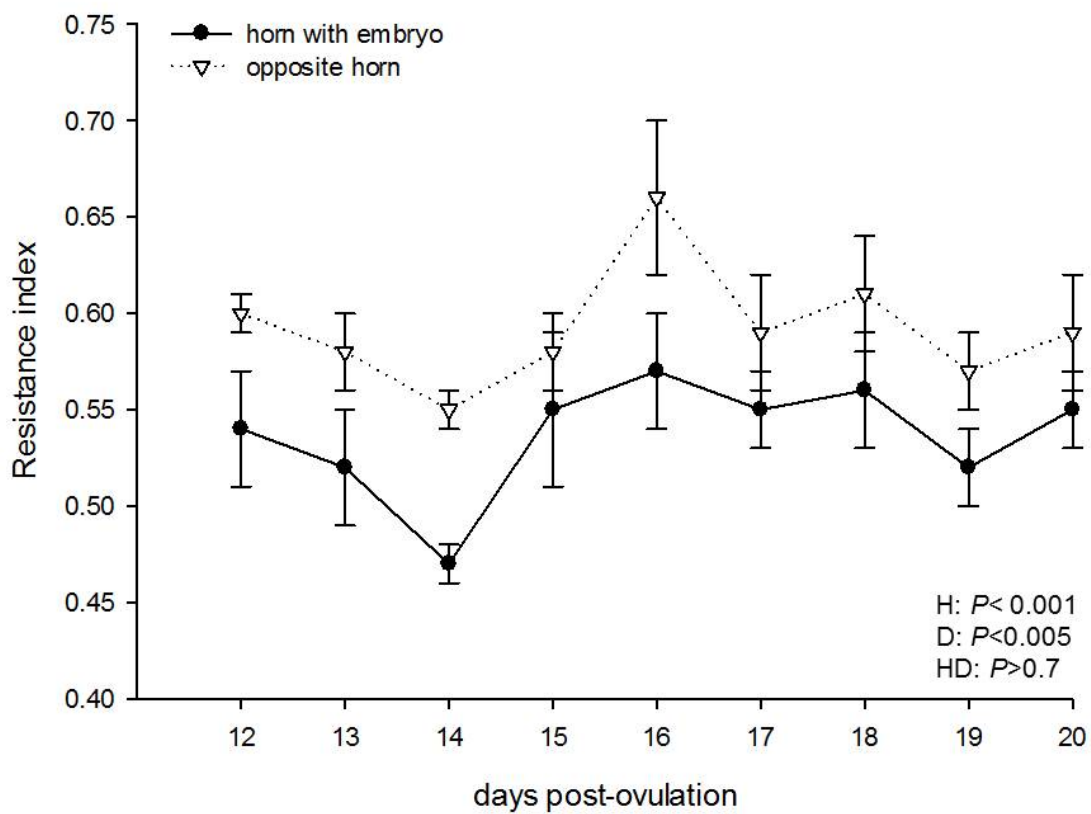


Figure 9. Mean±SEM for mesometrial Resistance index of uterine horns (with embryo and opposite horn) between days 12 to 20 of gestation in mares (n=14). Probability of *P* for the effect of horn (H), day (D) and their interaction (HD) are shown.

Discussion

Colored Doppler ultrasonography has shown to be essential for the *in vivo* evaluation of reproductive physiology in large animals. The present study demonstrated, for the first time, the viability of the analysis of mesometrial attachment arteries for the evaluation of uterine blood perfusion during diestrus and first days of gestation in mares. Additionally, new information was obtained in regards to the uterine vascularity of pregnant and non-pregnant mares. These findings will be important in determining normal standards for uterine hemodynamics during the initial days post-

breeding that will be subsequently helpful for diagnosing subfertility disorders in mares sooner.

This is the first report of uterine Doppler indices in pregnant and non-pregnant mares during the first 12 days post-ovulation. Arteries from mesometrium attachments were efficient at producing a velocity spectrum during the diestrus, showing an improvement when compared to previous studies. According to Silva et al. [4], endometrial vessels of non-pregnant mares generate inadequate colored Doppler signals for spectral evaluation through the diestrus, while satisfactory wave forms have been produced only after D12 of gestation using conventional Color-Doppler mode.

Scoring endometrial vascularity has been validated in mares previously [4]. Doppler indices can be related to the hemodynamics of a tissue supplied by an artery and a decrease in the pulsatility or resistance index indicates lower arterial resistance. Consequently, there is increased vascular perfusion on the tissue supplied by the respective vessel [8]. Mesometrium attachment is the area of entry of arteries into the uterus. Therefore, the simultaneous increase and decrease in uterine vascular perfusion and mesometrial PI, respectively, through the first 20 days of gestation and from D0 to D12 post-ovulation of non-pregnant mares validated the subjective evaluation of the uterine tissue (endometrium and myometrium).

The description of an earlier and transient increase in uterine vascularity accompanied by decreased Doppler indices of pregnant and non-inseminated mares is a new finding that contrasts previous study using conventional Color Doppler ultrasonography to evaluate only endometrium [4]. The early detection of increased uterine blood perfusion in this study can be due to the use of a more advantageous technique and approach to evaluate the endometrium and myometrium, as suggested by Ferreira et al. [11]. Power-flow Doppler recognizes intensities of blood flow velocities, showing a greater sensitivity to weak blood flow and reduced blooming

artifacts when compared to the conventional Color-mode imaging [8]. Additionally, this is the first report that evaluates the entire uterine tissue (endometrium and myometrium of the three uterine horn segments). Therefore, examining the complete uterine tissue using Power mode Doppler may improve the evaluation of vessels with small diameters and slow blood flow present in the equine uterus.

The similar and lower uterine vascularity associated with absence of intrauterine fluid during the first days post-ovulation observed in inseminated and non-inseminated mares indicate that the vascular changes posteriorly detected between D3 and D5 are not associated with an inflammatory process stimulated by semen infusion [9]. Considering that only inseminated non-pregnant mares showed low uterine vascularity from D1 and D11 and increased mesometrial PI between D10 and D11, the findings suggest that uterine vascular disturbance during the first days post-ovulation may have major impact on the reproductive efficiency of mares. According to Ferreira et al. [16], a higher uterine artery impedance is observed in women with recurrent pregnancy loss.

The reason for the early and transient increases in uterine vascularity observed in non-inseminated and pregnant mares is unknown. Conventionally, estrogen is considered to be uterotrophic and a promoter of angiogenesis and vascular permeability [17]. According to Ford [18], oestradiol stimulates increased vascular perfusion of the gravid uterus in cattle and sheep. Moreover, Silva et al. [4] suggest a local effect of embryonic estrogen on the endometrial vascularity of mares. An increase in follicular activity between D4 and D6, described in some mares [19], could be associated with a transient increase in oestradiol and, consequently, greater uterine vascularity on D4 of non-pregnant mares of the present study. Both increased total estrogen and low uterine artery PI during the estrus have been described in mares [20]. However, a decreased genital perfusion in cycling mares supplied with exogenous

estrogen has been posteriorly reported by Bollwein et al. [21]. Therefore, the influence of follicular oestradiol on the uterine hemodynamics of non-pregnant mares must be investigated.

The equine conceptus produces significant quantities of estrogens starting from D12 [22, 23, 24], but embryo steroidogenesis appears to begin previously on D6 [25]. The embryonic vesicle enters the uterus between D5 and D6 [26, 27]. Oestradiol and prostaglandin E₂, released by the oviductal transport-stage embryo [28, 29, 30], could be associated with the earlier changes in the vascular perfusion of gravid uterus because of their vasodilatory effects. However, this hypothesis is not supported by the vascular changes found in non-inseminated mares from G1.

In pregnant mares, the lower mesometrial PI from D10 associated with a progressive increase in uterine vascularity after D12 and the higher vascularity on the horn with embryo confirm the local influence of the conceptus in the hemodynamics of the gravid uterus [4, 31]. The equine conceptus secretes significant quantities of prostaglandins and oestradiol during the first days of gestation [32, 33] and PGE₂ levels remain high until D32 [34]. In human *in vitro* assays, oestradiol stimulated the proliferation of angiogenic patterns [35] and increased the response of endometrial cells to VEGF [36]. A greater abundance of VEGF mRNA, VEGFR2 transcript and blood vessel proliferation has been found in the uterine tissue of mares during early pregnancy [6], supporting the hypothesis that the embryo plays an essential role in directing vasculogenesis of the equine uterus.

In conclusion, Power-Doppler technology associated with Doppler velocimetry generated adequate color signals for measuring the Doppler indices of mesometrial attachment arteries during the diestrus and early pregnancy of mares. Early and transient changes in uterine vascular perfusion and the mesometrial Doppler indices were detected in pregnant and non-pregnant mares, while a deficient uterine blood

supply was found only in inseminated non-pregnant mares. The effect of the directly contact between embryo and endometrium on the uterine blood flow was confirmed.

Acknowledgements

This research was financial supported by FAPESP, SP, Brazil. The authors thank J. G. Lalla and J.C.F. Pantoja for assistance with the statistical analyses. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work. Additionally, the authors have declared no competing interests.

References

- [1] Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T. (1994) Sperm-induced leukozytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, **41**, 629-36.

- [2] Katila, T. (2012) Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. *Reprod Dom Anim*, **47**, 31-41.

- [3] Goff, A.K., Sirois, J., Pontbriand, D. (1993) Effect of oestradiol on oxytocin-stimulated prostaglandin F2 alpha release in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, **98**, 107-112.

- [4] Silva, L.A., Gastal, E.L., Beg, M.A., Ginther, O.J. (2005) Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biology of Reproduction*, **72**, 755-761.

[5] Silva, L.A., Ginther, O.J. (2006) An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. *Biology of Reproduction*, **74**, 337-343.

[6] Silva, L.A., Klein, C., Ealy, A.D., Sharp, D.C. (2011) Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction*, **142**, 593-603.

[7] Allen, W.R.(2001) Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, **121**, 513-527.

[8] Ginther, O.J., Utt, M.D. (2004) Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, **24**, 516-526.

[9] Bollwein, H., Weber, F., Kolberg, B., Stolla, R. (2002) Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, **57**, 2129–38.

[10] Bollwein, H., Mayer, R., Stolla, R., (2003). Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. *Theriogenology*, **60**, 597-605.

- [11] Ferreira, J.C., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (2008) Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of size of the cystic area and age. *Reproduction*, **135**, 541-550.
- [12] American Association of Equine Practitioners Manual Official Guide for Determining the age of the Horses (2002) *AAEP*, Lexington, KY, pp 26.
- [13] Ginther, O.J. (1995) Transrectal Imaging and Ovaries and Uterus. In: Ginther, O.J. (Ed.), *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses*. Cross Plains, Equiservices Publishing, pp13-42.
- [14] Gastal, E.L., Gastal, M.O., Ginther, O.J. (1998) The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology*, **50**, 1025-1038.
- [15] Leith, G.S., Ginther, O.J. (1984) Characterization of intrauterine mobility of the early conceptus. *Theriogenology*, **22**, 401-408.
- [16] Ferreira, A.M., Pires, C.R., Moron, A.F., Araujo Júnior, E., Traina, E., Mattar, R. (2007) Doppler assessment of uterine blood flow in recurrent pregnancy loss. *Int J Gynaecol Obstet.*, **98**, 115-119.
- [17] Girling, J.E., Rogers, P.A. (2005) Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis*, **8**, 89-99.

- [18] Ford, S.P. (1982) Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of the ewe, sow and cow. *Journal of Animal Science*, **55**(SII), 32-42.
- [19] Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Bergfelt, D.R., Baerwald, A.R., Pierson, R.A. (2004) Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of Reproduction*, **71**, 1105-1201.
- [20] Bollwein, H., Kolberg, B., Stolla, R. (2004) The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, **61**, 1137-1146.
- [21] Bollwein, H., Sowade, C., Stolla, R. (2003) The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. *Theriogenology*, **60**, 607-616.
- [22] Choi, S.J., Anderson, G.B., Roser, J.F. (1997) Production of free estrogens and estrogen conjugates by the preimplantation equine embryo. *Theriogenology*, **47**, 457-466.
- [23] Flood, P.F., Betteridge, K.J., Irvine, D.S. (1987) Oestrogens and androgens in blastocoelic fluid and cultures of cells from equine conceptus of 10–22 days gestation. *Journal of Reproduction and Fertility*, **27**, 414-420.

- [24] Zavy, M.T., Vernon, M.W., Asquith, R.L., Bazer, F.W., Sharp, D.C. (1984) Effect of exogenous gonadal steroids and pregnancy on uterine luminal prostaglandin F in mares. *Prostaglandins*, **27**, 311–320.
- [25] Paulo, E., Tischner, M. (1985) Activity of delta(5)3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and steroid hormones content in early preimplantation horse embryos. *Folia Histochem Cytobiol*, **23**, 81-84.
- [26] Betteridge, K.J., Eaglesome, M.D., Mitchell, D., Flood, P.F., Berlault, P., (1982) Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy*, **135**, 191-209.
- [27] Oguri, n., Tsutsumi, Y. (1972) Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility*, **31**, 187-195.
- [28] Robinson, S.J.; Neal, H.; Allen, W.R. (2000) Modulation of oviductal transport in mares by local application of prostaglandin E2. *Journal of Reproduction and Fertility*, **56**, 587-592.
- [29] Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Woods, G.L. (1991) Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biology of Reproduction*, **45**, 544-546.

- [30] Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Woods, G.L. (1991) Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biology of Reproduction*, **45**, 540-543.
- [31] Silva, L.A., Ginther, O.J. (2010) Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*, **139**, 453-463.
- [32] Weber, J.A., Woods, G.L., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K.(1992) Prostaglandin E2 secretion by day 6 to day 9 equine embryos. *Prostaglandins*, **43**, 55-59.
- [33] Vanderwall, D.K., Woods, G.L., Weber, J.A., Lichtenwalner, A.B. (1993) PGE2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. *Equine Veterinary Journal Supplement*, **15**, 24-27.
- [34] Stout, T.A., Allen, W.R.(2002) Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and diestrous mares. *Reproduction*, **123**, 261-268.
- [35] Kayisli, U.A., LUK, J., Guzeloglu-Kayisli, O., Seval, Y., Demir, R., Arici, A.(2004) Regulation of angiogenic activity of human endometrial endothelial cells in culture by ovarian steroids. *Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*, **89**, 5794-802.

[36] Iruela-Arispe, M.L., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Abu-Jawdeh G.(1999)
Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation*, **6**, 127-140.

9.2. Normas da revista “Equine Veterinary Journal”

9.2.1. Manuscript File Format

Manuscripts should be submitted as Word documents (.doc, .docx) (not write-protected) in double spacing on A4 page size, the pages should be numbered and there should be line numbers continuously throughout the document. Division of the paper should be indicated clearly by major headings, subheadings and sub-subheadings.

The text file must contain the manuscript including summary, text, references, tables and figure legends but no embedded figures. Figure tags should be included in the file. A word count for the entire text including figure and table legends and references (but not including Supplementary Information) should be provided. Figures should be provided in separate files (see below for details of format).

9.2.2. Authors' Identity and Declarations

Authors' names, institutes, affiliations and declarations should not be included within the manuscript in order to facilitate double blinded review. To ensure the integrity of this process, authors must create a separate Word document and upload this separately as the “Title page” document. This document should contain Ethical Considerations, Competing Interests, Sources of Funding, and Acknowledgements. Also list here any other details included in the Materials and Methods which might allow the reviewer to identify the authors or host institute, for example, hospital or ethical review committee names or reference to “in press” publications. In their place, within the main manuscript, state “detail to be provided on acceptance” and highlight this. All such details must be included in the “Title Page” document, with reference to the appropriate line number. With all revisions, authors must re-insert such details into a clean, unblinded version of their manuscript that should be uploaded in addition to the blinded version with revisions marked. Copies of “in press” publications, with relevant identifying details removed, should be uploaded as “supporting information” for reviewers' use.

9.2.3. Keywords for publication

Authors can provide up to six keywords for publication immediately below the title which may help readers find the article in various search engines. These should reflect the manuscript content and should usually include the word “horse” or similar but not “Equine” or “Veterinary” as these terms will be included in most Search Engines as being within the journal’s title. Keywords for publication should be listed within the “Title Page” document immediately below the authors’ names and addresses. Note during the submission process, you will also be required to choose ScholarOne keywords which facilitate the review process – see Section 5.6.

9.2.4. Language

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language should consider having their manuscript professionally edited before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

EVJ provides Chinese translations of article summaries online within the Supporting Information section. Authors are welcome to include foreign language translations of their summary as supplementary items for online only publication. Such items should be entitled “Supplementary Item: Summary in French” etc. If appropriate, start numbering any additional supplementary items from 1.

9.2.5. Abbreviations, Symbols and Nomenclature

Doses and measurements should be given in metric (SI) units with /kg bwt added where appropriate. Abbreviations are discouraged. Where possible, only abbreviations that are in common use within the relevant field or discipline should be used. Authors must avoid inventing their own abbreviations for anatomical terms and techniques. Where they are unavoidable, abbreviations must be explained in both the summary and main text. Spelling should conform

to the Oxford English Dictionary, medical terminology to Dorlands Medical Dictionary and units, symbols and abbreviations should conform to the International System of Units defined by Baron, D.N. (Ed) (1994) "Units, Symbols, and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors, 5th edn." Royal Society of Medicine Press, London.

9.2.6. Drug names and Manufacturers' details

The generic name of drugs, equipment or other materials should be given in the text, with product name in brackets. Recommended International Non-Proprietary Names (rINNs) should be used. The manufacturer's details (company name, town/city, state/county and country) should then be listed under a "Manufacturers' details" heading at the end of the article before the Reference section. References to this list should be indicated as superscript letters throughout the text. Brand or trade names should not be used in the title and must be in brackets throughout the text.

9.2.7. Optimising Your Article for Search Engines:

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimising your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximise the web-friendliness of the most public part of your article.

9.2.8. References

It is the responsibility of the authors to ensure that all reference details are accurate. References are indicated throughout the text as numbers within square brackets [1, 2, 3 etc] and the final list of references must correspond with the order in which they appear in the main body of the text.

The format in the reference list is as follows: author(s) name(s) and initials, year of publication in parentheses, full title of article, journal title (in italics) as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals, volume number (in bold)

and page numbers: e.g. Foster, B.W., Codd, J. and Smith, R. (1992) Effect of stress on ulcers in foals. *Equine vet. J.* 35, 43-52.

References to book articles should be set out as follows: author(s) name(s) and initials, date of publication in parentheses, title of chapter or article, full title of book, edition, name(s) of editor(s) if relevant, publisher, place of publication and pages referred to: e.g. Robin, C. (1991) Calcium in plants eaten by horses. In: *Dietary Calcium*, 2nd edn., Ed: J. Chalk, Blackwells Scientific, London. pp 195-201.

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see www.doi.org/ for more information. If an author cites work that does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

9.2.9. Table and Figure Legends

Legends should be short as appropriate but should be intelligible to the reader without reference to the text. Legends should also cite the reference used if appropriate. A list of figure legends should be placed at the end of the text (before references).

9.2.10. Tables

Tables should be referenced in the appropriate place in the text but should be placed at the end of the text (before references) accompanied by appropriate legends. Duplication of data in tables, figures and text should be avoided.

9.2.11. Figures

Illustrations should be provided when necessary to clarify the text. Figures should be referred to in the text. Authors are encouraged to use colour in graphs, line drawing and other figures.

Photomicrographs must state magnification, preferably with a scale bar, and staining technique. Line drawings should be original diagrams on clean white paper or board and must be submitted in digital form (see below). Symbols and lines should be standard and not drawn by hand. Do not include a “chart title” when creating graphs and charts.

Print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. Do not use pixel-oriented programs. Scans (TIFF or JPG) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Wiley-Blackwell Publishing’s guidelines for figures:

<http://www.authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting

it:<http://www.authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

9.2.12. Supplementary Information

Supplementary information, such as data sets or additional figures, tables or video files, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted as Supplementary Information Items. Where questionnaires have been used for data collection these should be included as supplementary items. There is no limit to the number of supplementary items that can be included. Supplementary Information Items are subject to the peer review process. Supporting Information Items is material that is not essential to the article but provides greater depth and background. It is not copyedited. The items should be referred to in the main body of the text of the article where appropriate. The availability of Supplementary Information should be indicated in the main manuscript by a list, to appear after the References, headed " Supplementary

Information Items" and providing titles of figures, tables, etc. See section 5.4 for details of how to upload these files.

Supplementary Information items must be prepared as follows:

1. Submit each item as a separate file.
2. Text: Word only; A4, page set up portrait, double spaced, top and bottom margins 3.17 cm; left and right margins 2.54 cm, continuous line numbers, page numbers, font – Arial size 10.
3. Figures: GIF, TIFF, EPS, PNG, JPEG, BMP, PDF; labelling Arial font, with size selected as appropriate for figure.
4. Tables: Word only; A4, Page set up can be as portrait or landscape as appropriate; top and bottom margins 3.17 cm; left and right margins 2.54 cm, continuous line numbers, page numbers, font – Arial, size as appropriate.
5. Movies: MPEG, AVI or quicktime movie format. Any labelling should be should be in Arial font, with size selected as appropriate. Several small clips are preferable to one large movie.
6. The maximum size of each individual supplementary item is 5Mb.

Anexos

Tabela 1. Valores p, por meio da análise pelo teste-*t*, para as variáveis respostas paramétricas durante o diestro e estro de 12 éguas.

Variável resposta	Grupos	Dias	Grupos*Dias
RI	0,2734	0,0478	0,6656
RIrel	0,4826	0,0745	0,7888
PI	0,1100	0,0042	0,5331
PIrel	0,4937	0,0279	0,6907
Estradiol	0,2734	0,0478	0,6656
Progesterona	0,3574	<0,0001	0,4356

Tabela 2. Valores p, por meio da análise pelo teste-*t*, para as variáveis respostas paramétricas durante período peri-luteolítico de 12 éguas.

Variável resposta	Grupos	Dias	Grupos*Dias
RI	0,0002	0,0042	0,1019
RIrel	0,1339	0,1707	0,7825
PI	0,0002	<0,0001	0,0808
PIrel	0,2370	0,0328	0,8625
Estradiol	0,0944	0, 4708	0,6926

Tabela 3. Coeficiente de correlação (*r*) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de diestro de 12 éguas.

	Estradiol	RI	PI	PVU	Edema
Progesterona	-0,317	0,146	-0,343	0,227	-0,508
Estradiol		0,232	0,045	-0,001	0,611
RI			0,496	-0,501	-0,129
PI				-0,949	0,238
PVU					-0,207

Tabela 4. Valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de diestro de 12 éguas.

	Estradiol	RI	PI	PVU	Edema
Progesterona	0,249	0,604	0,211	0,416	0,053
Estradiol		0,406	0,874	0,972	0,015
RI			0,060	0,057	0,647
PI				<0,001	0,393
PVU					0,459

*O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

Tabela 5. Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de estro de 12 éguas.

	Estradiol	RI	PI	PVU	Edema
Progesterona	-0,756	0,310	-0,0571	0,785	0,571
Estradiol		-0,310	-0,176	-0,735	-0,442
RI			0,885	0,047	0,003
PI				-0,293	-0,226
PVU					0,703

Tabela 6. Valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período de estro de 12 éguas.

	Estradiol	RI	PI	PVU	Edema
Progesterona	0,049	0,499	0,903	0,037	0,181
Estradiol		0,499	0,706	0,059	0,321
RI			0,008	0,920	0,994
PI				0,524	0,626
PVU					<0,001

*O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

Tabela 7. Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período peri-luteolítico de 12 éguas.

	Estradiol	RI	PI	PVU	Edema
Progesterona	-0,730	0,889	0,928	-0,841	-0,981
Estradiol		-0,436	-0,505	0,393	0,825
RI			0,962	-0,776	-0,794
PI				-0,746	-0,857
PVU					0,791

Tabela 8. Valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre todas as variáveis respostas durante período peri-luteolítico de 12 éguas.

	Estradiol	RI	PI	PVU	Edema
Progesterona	0,063	0,007	0,003	0,017	<0,001
Estradiol		0,329	0,248	0,383	0,022
RI			<0,001	0,040	0,033
PI				0,054	0,014
PVU					0,034

*O nível de significância estatística foi definido como 0,05.