

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE
A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA
PLASMÁTICA EM ÉGUAS CÍCLICAS

DANIELA FERNANDEZ MONTECHIESI

BOTUCATU – SP
AGOSTO 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE
A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA
PLASMÁTICA EM ÉGUAS CÍCLICAS

DANIELA FERNANDEZ MONTECHIESI

ORIENTADOR: Prof. Adj. Cezinande de Meira

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre

BOTUCATU – SP
AGOSTO 2009

Nome do Autor: Daniela Fernandez Montechiesi

Título: EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE
PROGESTERONA PLASMÁTICA EM ÉGUAS CÍCLICAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Cezinande de Meira
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Júlio César Ferraz Jacob
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UFRRJ, Rio de Janeiro/RJ

Data da Defesa: 07 de agosto de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mary e Edison Montechiesi
Por serem meus alicerces.

Aos meus avós, Antônio, Manuela, Alberto e Aparecida
Pelo incentivo e por acreditarem nos meus sonhos.

Aos meus sobrinhos Giovana e Matheus
Pelo amor incondicional.

AMO VOCÊS!!

AGRADECIMENTOS

Acredito que a vida seja uma passagem... e que todas as pessoas com as quais eu encontrei ao longo do meu caminho tinha algo para me ensinar. Talvez eu não tenha entendido o que era no momento certo, mas hoje, ao olhar para trás, vejo que cada obstáculo foi superado, cada lição compreendida e que tudo valeu a pena. Vocês me trouxeram até aqui, portanto, muito obrigada!

Agradeço:

À Deus pela vida.

Ao professor Cezinande de Meira, primeiramente pela oportunidade, pois se hoje começo a alcançar meus objetivos profissionais, devo a ele grande parte dos ensinamentos. Pela confiança depositada ao longo dos anos, o que me permitiu crescer pessoal e profissionalmente.

À família Meira, pela simpatia e compreensão.

Ao Braz Lins que me apresentou ao meu orientador e à Cássia Orlandi (Cassinha) quem iniciou todo esse trajeto. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

À todos os professores, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, em especial à professora Eunice Oba pelo empréstimo do ultrassom e do laboratório pela dosagem hormonal.

À todos os estagiários que passaram pelo Posto de Monta e que colaboraram de alguma forma na execução prática do projeto, dispostos a ajudar nas horas e datas mais difíceis: Danilo, Janaína, Danizinha, Renata, Zé Luiz, Elis, Adriana. Vocês foram fundamentais!

Aos funcionários, residentes e colegas da pós-graduação do departamento, pela ajuda quando solicitada e por tornar o dia a dia mais agradável.

Aos funcionários Miguel Alves e Benedito Fogaça pela seriedade, dedicação e amor com os animais, além das brincadeiras e ensinamentos ao longo de nossa convivência.

Ao professor Nicolau Puoli Filho pela manutenção dos animais na Fazenda Edgárdia e pelo respeito com que os trata.

À professora Lídia R. Carvalho pelas análises estatísticas.

À grande família que formamos em Botucatu. Sem vocês a minha vida não seria completa! Fernanda, Giovana, Gabriel, Ana Paula, Zere, Jair, Priscilla, Simone, Daniel, Ulisses, Luiza, Márcio, Leandro. Espero que essa amizade continue crescendo eternamente, porque hoje vocês fazem parte da minha vida!

À equipe “sucesso inevitável”!! Acreditamos nos nossos sonhos e os tornamos realidade. Hoje, com muito orgulho, entrego a vocês o meu cargo e continuo na torcida dando todo o apoio que precisarem... Fe, Jair, Dani e Angélica.

Nada e nem ninguém acontece por acaso. Nos tornamos amigas desde o primeiro instante, depois viramos “irmãs”. Fe, muito obrigada não só pela ajuda no meu

experimento, mas principalmente pelos conselhos, risadas, palavras, gestos, piadas... você fez toda a diferença na minha passagem por Botucatu. Faltam palavras para agradecer.

Aos meus irmãos Fábio e Mariana, minha cunhada Tati e meus sobrinhos Gigizinha e Matheus por me fazerem rir nos momentos mais difíceis e chorar de saudade pela distância.

Aos meus avós, tios e primos. Cada um sabe da sua importância.

À família Di Gioia, pela importância que tiveram e tem na minha vida. Obrigada pelo apoio, amizade, carinho e principalmente por acreditarem nos meus sonhos.

À Ilha Quadrada, onde morei praticamente desde que cheguei. Karina, Bruna, Valéria, Priscila, Thiago, Hení, Angélica, Michele e Monique. Vocês foram minha família por um tempo. Thi, obrigada por toda a ajuda.

Ao Tiago Ferrari, por fazer parte da minha vida hoje e me ensinar a pensar com a razão...

Às minhas amigas Fabi Irrera e Vanessa Cañete por estarem presentes mesmo de longe.

Aos funcionários do Rancho Vitória EM, pelo apoio e compreensão com meus horários.

Aos animais, em especial a espécie equina, com a qual existe uma ligação inexplicável. Agradeço todos os dias por fazer o que amo. A minha felicidade de viver se mistura à existência dos cavalos.

Aos meus pais, pela minha vida e pelo exemplo de vida. Pela dignidade, honestidade, amor, superação. Palavras não conseguiriam expressar todo o meu agradecimento, mas mesmo assim, tenho que dizer que devo a vocês tudo o que sou. Amo vocês!!

À todos, o meu muito obrigada!!

“O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade.”

(Victor Hugo)

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Concentração de progesterona plasmática (ng/mL) nos dias 1, 4, 7, 10, 13 e 16 após a aspiração folicular ou ovulação (D0) em éguas ... 23
- TABELA 2** - Intervalo em dias, da aspiração folicular ou ovulação a concentração plasmática de progesterona $>2\text{ng/mL}$, da aspiração folicular ou ovulação a concentração plasmática de progesterona $<2\text{ng/mL}$ e da aspiração folicular ou ovulação a ovulação subsequente nos diferentes grupos 24
- TABELA 3** - Concentração máxima de progesterona plasmática e dia da detecção da concentração máxima de progesterona plasmática (ng/mL) em éguas nos diferentes grupos..... 24
- TABELA 4** - Distribuição de frequências das éguas que atingiram a concentração plasmática de progesterona (P4) $>2\text{ng/mL}$ após a aspiração folicular e porcentagem de éguas com presença ou ausência de estrutura lútea (EL) visualizada pela ultrassonografia 25

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Esquema de aspiração folicular em bovino com transdutor convexo .. 18
- FIGURA 2** - Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona em éguas, iniciando a colheita de sangue no dia anterior a aspiração (D-1) ao D21, considerando-se D0 o dia da aspiração folicular 25

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3 β -HSD:** 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
- CH:** corpo hemorrágico
- CL:** corpo lúteo
- EL:** estrutura lútea
- F:** folículo
- FGF:** fator de crescimento fibroblástico
- FSH:** hormônio folículo estimulante
- GIFT:** transferência intrafalopiana de gametas
- GnRH:** hormônio liberador das gonadotropinas
- HDL:** lipoproteínas de alta densidade
- ICSI:** injeção intracitoplasmática de gametas
- IGF-1:** fator de crescimento semelhante à insulina-1
- LDL:** lipoproteínas de baixa densidade
- LH:** hormônio luteinizante
- ME:** morfoecogenicidade
- ON:** óxido nítrico
- P4:** progesterona
- P450scc:** P450 clivadora de cadeia lateral
- PBR:** receptor benzodiazepínico tipo periférico
- PGE₂:** prostaglandina E₂
- PGF_{2 α} :** prostaglandina F_{2 α}
- PGFM:** metabólito da PGF_{2 α}
- PGI₂:** prostaciclina
- PKA:** proteína kinase A
- PKC:** proteína kinase C
- RIA:** radioimunoensaio
- RNA_m:** ácido ribonucléico mensageiro
- StAR:** proteína reguladora da esteroidogênese
- VEGF:** fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Fisiologia do ciclo estral	2
2.1.1 Dinâmica folicular	2
2.2. Ovulação.....	4
2.3. Formação do corpo lúteo	6
2.3.1. Angiogênese	8
.....	
2.4. Manutenção do corpo lúteo e concentração de progesterona.....	10
2.5. Síntese de progesterona e função do corpo lúteo	11
2.6. Ultrassonografia luteal (modo-B)	12
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Animais	17
4.2. Grupos experimentais	17
4.3. Aspiração folicular	18
4.4. Avaliação ultrassonográfica.....	19
4.5. Colheita de sangue e ensaio hormonal	19
4.6. Análise estatística	19
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÕES	31
8. REFERÊNCIAS	32

MONTECHIESI, D.F. **Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas cíclicas.** Botucatu. 2009 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da aspiração de folículos $\geq 25\text{mm}$ sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas. O crescimento folicular foi acompanhado diariamente e um único folículo ovariano foi aspirado, exceto quando uma co-dominância foi observada. Neste caso, ambos os folículos foram aspirados no mesmo momento quando atingiram o diâmetro esperado nos respectivos grupos: F $\geq 25\text{mm}$ (n = 6), F $\geq 30\text{mm}$ (n = 6), F $\geq 35\text{mm}$ (n = 6), F pré-ovulatório (n = 6). O Grupo controle (n = 5) não foi submetido à aspiração, acompanhando-se as ovulações espontâneas. A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada a cada 24 horas iniciando-se 48 horas antes da aspiração folicular (D0 = dia da aspiração), continuando até a ovulação subsequente. Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância de perfil seguida do método de Tukey com nível de significância de 5% para todas as variáveis, exceto: (1) animais que responderam à aspiração folicular atingindo concentrações de 2ng/mL de progesterona; (2) presença ou ausência de estrutura lútea visualizada pela ultrassonografia, onde foi utilizado o teste do qui-quadrado. A concentração de progesterona foi $>2\text{ng/mL}$, entre os dias $4,0 \pm 0,4$ e $7,3 \pm 0,5$ após a aspiração. O intervalo entre a aspiração e a luteólise foi de $16,0 \pm 0,5$ a $19,0 \pm 1,4$ dias e entre a aspiração e a ovulação foi de $17,2 \pm 2,8$ a $23 \pm 0,5$ dias. A concentração máxima de progesterona alcançada variou entre $6,4 \pm 2,6$ e $10,9 \pm 1,8\text{ng/mL}$ e ocorreu entre os dias $8,7 \pm 3,4$ e $11,5 \pm 1,2$. A aspiração folicular em todos os grupos permitiu que as células foliculares se transformassem em estrutura hormonalmente ativa, produtora de progesterona em níveis compatíveis com o diestro.

Palavras-chave: aspiração folicular; corpo lúteo; éguas; progesterona; ultrassonografia.

MONTECHIESI, D.F. **Follicular ablation effect on plasmatic progesterone concentration in cycling mares.** Botucatu. 2009 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study aims to verify the follicles ≥ 25 mm ablation effect on plasmatic progesterone concentration in mares. Follicular growth was daily accompanied and only one follicle was ablated, excepted when codominance was observed. At this case, both follicles were ablated at the same moment when achieved the expected diameter for the following groups: F ≥ 25 mm (n = 6), F ≥ 30 mm (n = 6), F ≥ 35 mm (n = 6), F pre-ovulatory (n = 6). Control group (n = 5) was not submitted to ablation and the spontaneous ovulations were followed. Ultrasound evaluations of the ovaries were done every 24h beginning 48h after follicular ablations (D0 = day of ablation), continuing until subsequent ovulation. For statistical analysis, profile analysis followed by Tuckey method was used with a significance level of 5% for all variables excepted for: (1) animals that responded to follicular ablation achieving progesterone concentrations of 2ng/mL; (2) presence or absence of a luteum structure observed by ultrasound were analysed by Qui-square test. Interval between aspiration and luteolysis varied from $16,0 \pm 0,5$ to $19,0 \pm 1,4$ days and between ablation and next ovulation varied from $17,2 \pm 2,8$ to $23 \pm 0,5$ days. Maximum concentration of progesterone varied from $6,4 \pm 2,6$ and $10,9 \pm 1,8$ ng/mL and occurred between days $8,7 \pm 3,4$ and $11,5 \pm 1,2$. In all groups, follicular ablation allowed follicular cells to become an active hormonal structure, which produced progesterone in concentrations similar to diestrous.

Key-words: follicular ablation; corpus luteum; mares; progesterone; ultrasonographic.

1. INTRODUÇÃO

A utilização da transferência de embriões e o desenvolvimento de outras biotecnologias aplicadas ao embrião equino vêm aumentando ao longo dos anos. Dentre elas, a superovulação, transferência de oócitos, injeção intracitoplasmática de gametas (ICSI), transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), criopreservação de embriões, são as mais utilizadas (SQUIRES et al., 2003).

Com um técnico experiente, as taxas de recuperação embrionária entre 60% e 80% podem ser alcançadas em doadoras férteis, porém, após a transferência dos embriões, as taxas de prenhez raramente excedem 65% (SQUIRES et al. 1999; CARNEVALE et al., 2000).

O sucesso de um programa de transferência de embriões depende de vários fatores, dentre eles, a utilização de éguas receptoras com boa condição uterina e capazes de produzir progesterona pelos corpos lúteos em quantidades adequadas no primeiro terço da gestação. O manejo das éguas receptoras é provavelmente um dos fatores mais críticos que afetam as taxas de prenhez por necessitar da sincronização entre doadoras e receptoras; uma grande quantidade de receptoras é necessária para garantir uma sincronização segura. Porém, essa condição, além de ser cara, consome tempo. Métodos alternativos que facilitam as técnicas de manejo têm sido descritos, como o uso de hormônios para induzir o estro e a ovulação, associação de estrógeno e progesterona para manutenção da gestação em receptoras acíclicas (LAGNEAUX & PALMER, 1997), assim como em éguas ovariectomizadas (McKINNON et al., 1988).

A aspiração transvaginal de folículos com diâmetro ≥ 25 mm visando originar uma estrutura luteinizada capaz de produzir progesterona pode ser uma alternativa como um método para a preparação de receptoras de embriões (HAYNA et al., 2004; 2006), por ser prático e minimamente invasivo. A aspiração de folículos maduros em éguas cíclicas pode resultar na formação de tecido luteal (HINRICHS et al., 1991), no entanto são necessários estudos que caracterizem a formação, desenvolvimento, longevidade desta estrutura e determinação das concentrações de progesterona produzidas ao decorrer do ciclo estral, o que é o objetivo do presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia do ciclo estral

O comprimento médio do ciclo estral nos equinos é de 21 a 22 dias com variação de 16 a 26 dias, sendo dividido em estro (fase estrogênica) e diestro (fase progesterônica). O estro caracteriza-se pelo predomínio de estrógenos, relaxamento cervical, presença de folículo pré-ovulatório e edema endometrial, enquanto o diestro é o período que vai da ovulação à regressão do corpo lúteo (CL), há o predomínio da progesterona ($>2\text{ng/mL}$), rejeição ao garanhão, presença de CL, cérvix fechada, tensão uterina e perda de edema endometrial (SAMPER, 2008).

As éguas são classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais, ou seja, manifestam vários ciclos estrais em um determinado período do ano, coincidindo com os dias de maior luminosidade, o que ocorre de setembro a março no hemisfério sul (McKINNON & VOSS, 1993).

2.1.1 Dinâmica folicular

O período interovulatório nas éguas contém combinações de ondas foliculares menores, onde o maior folículo não se torna dominante, e ondas foliculares maiores que são divididas em primárias e secundárias, onde o maior folículo alcança o diâmetro do folículo dominante (GINTHER et al., 2004a). Quando a emergência ocorre durante o estro, denomina-se onda folicular secundária e dá origem a um folículo dominante de diestro, que pode regredir ou ovular. A emergência da onda no meio do diestro é chamada de onda folicular primária e produz um folículo dominante destinado a ovular durante o estro (GINTHER, 1993).

A dinâmica de crescimento folicular é primariamente regulada através dos hormônios do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. O hormônio liberador das gonadotropinas (GnRH) é um hormônio hipotalâmico que fornece uma ligação entre o sistema endócrino e nervoso. Em resposta à estimulação nervosa, pulsos de GnRH são liberados no sistema porta-hipotálamo-hipofisário promovendo a liberação de hormônio luteinizante (LH) e FSH pela hipófise anterior (HAFEZ, 2004).

O GnRH é controlado por duas áreas distintas do hipotálamo: o centro tônico, localizado no núcleo arqueado, responsável pela secreção basal e contínua, liberando

pequenos pulsos de GnRH por um longo período (dias a semanas), e o centro pré-ovulatório, localizado no núcleo paraventricular, que apresenta secreção pulsátil, podendo apresentar um padrão crescente, responsável pela onda pré-ovulatória de LH e ovulação. A liberação pré-ovulatória de GnRH é controlada por altos níveis de estrógeno e baixos de progesterona, o que em condições naturais só ocorre durante o estro. No diestro, sob baixas concentrações de estradiol e altas de progesterona, há inibição da liberação de GnRH pelos neurônios do centro pré-ovulatório (SENGER, 2003).

O FSH e o LH são hormônios glicoprotéicos secretados pela hipófise anterior, que apresentam duas subunidades diferentes chamadas α e β . A subunidade α é comum a ambos os hormônios, enquanto a subunidade β é diferente e confere especificidade a cada gonadotrofina. Os níveis tônicos de LH e FSH são regulados pelo estímulo do GnRH e pelo *feed back* gonadal negativo (HAFEZ, 2004).

A emergência da onda folicular é caracterizada pelo surgimento de um grupo de folículos com 6mm de diâmetro, concomitante ao aumento nas concentrações de FSH (BERGFELT & GINTHER, 1993; GINTHER et al., 2004b). Após a emergência de uma onda folicular ovulatória, os folículos iniciam a fase de crescimento comum quando todos os folículos, independente do tamanho, crescem com uma taxa de crescimento diário semelhante até o início do desvio. Durante esta fase, quando o maior folículo alcança 13mm, as concentrações de FSH começam a reduzir devido a inibição provocada pelo aumento das concentrações de inibina produzida pelos próprios folículos enquanto o LH continua a aumentar (GASTAL et al., 1997).

O papel do FSH após a emergência da onda folicular envolve o crescimento contínuo e desenvolvimento de todos os folículos antes do desvio, e o desenvolvimento do folículo dominante após o desvio (GINTHER et al., 2004a), enquanto o LH atua em conjunto com o FSH para estimular o desenvolvimento final do folículo dominante e a produção de estradiol (estrógeno biologicamente ativo produzido pelo ovário), que por sua vez é responsável por estimular a liberação de LH, promove o aumento pré-ovulatório deste hormônio (McKINNON & VOSS, 1993; HAFEZ, 2004).

Há poucas informações de estudos *in vitro* do papel do LH intrafolicular. No trabalho realizado por Acosta et al. (2004), a deficiência de LH durante o desenvolvimento de um folículo dominante anovulatório foi associada com redução nas concentrações do fluido folicular de estradiol, inibina-A, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Segundo os autores, houve alterações significativas na progesterona, androstenediona e ativina-A.

Uma cascata de eventos bioquímicos intrafoliculares precede o início do desvio e determina o futuro folículo dominante. O mecanismo envolvido nessa cascata funcional envolve a redução nas concentrações circulantes de FSH e obtenção de um estágio de desenvolvimento crítico pelo futuro folículo dominante, incluindo aumento de receptores de LH nas células da granulosa e, conseqüente, aumento da responsividade às gonadotropinas. Aparentemente, os futuros folículos subordinados não alcançam um estágio de desenvolvimento similar ao futuro folículo dominante e não são responsivos a baixas concentrações de gonadotropinas, resultando em diminuição na taxa de crescimento.

Alguns dos fatores intrafoliculares detectados envolvidos na capacidade de aumentar a resposta às gonadotropinas do futuro folículo dominante durante o desvio incluem o estradiol, o sistema IGF, inibina-A e ativina-A (GINTHER et al., 2004a). Quando o futuro folículo dominante atinge 22,5mm os folículos remanescentes (subordinados) começam a entrar em atresia (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2004a, b). Outros estudos têm demonstrado que em equinos, o crescimento folicular está associado com a diminuição nas concentrações de IGFBP-3 e aumento das concentrações de IGF-I, e que as mudanças nas concentrações de IGFBP-3 podem alterar as concentrações de IGF-I que estimula a mitose e a esteroidogênese no desenvolvimento folicular em éguas (CARNEIRO et al., 2000).

Uma característica do folículo selecionado é ter maior capacidade para produção de estradiol, que via circulação sistêmica promove, no hipotálamo, a inibição da secreção tônica de GnRH e o estímulo aos centros pré-ovulatórios (SENGER, 2003; BEG & GINTHER, 2006).

2.2. Ovulação

O ovário da égua possui estruturas peculiares comparado com outros animais, pois é extremamente grande e tem a posição invertida das camadas do córtex e da medula. De acordo com essa organização anatômica, os folículos só podem ovular através da fossa da ovulação (HIRANO et al., 2009).

A ovulação é a consequência de uma série de eventos bioquímicos, fisiológicos e mudanças morfológicas nos tecidos do folículo. As mudanças bioquímicas no folículo após a estimulação do LH são: aumento na produção de progesterona, ativação de enzimas proteolíticas, aumento na síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2) e $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), aumento na síntese de prostaciclina (PGI_2) e diminuição na produção de glicosaminoglicano

(PIERSON, 1992). A hiperemia do folículo pré-ovulatório e aumento na perfusão sanguínea são aparentemente o resultado da histamina e do aumento na PGE_2 , que está envolvida na remodelação das camadas foliculares. Juntamente com o aumento na perfusão sanguínea, os folículos dominantes produzem fatores angiogênicos (substâncias que promovem o crescimento de novos vasos sanguíneos). Os fatores angiogênicos têm sido encontrados no fluido folicular indicando que o folículo dominante pode potencialmente controlar sua própria perfusão sanguínea (SENGER, 2003).

Enzimas proteolíticas têm o papel principal na ruptura folicular. Há um aumento na secreção do ativador de plasminogênio que o converte em plasmina no fluido folicular em resposta ao estímulo do LH. A plasmina age diretamente no colágeno latente. A colagenase e a protease completam a proteólise do colágeno. Essa rede de efeitos serve para diminuir a resistência da parede do folículo em um ponto para que ocorra a ruptura (PIERSON, 1992).

A parede do folículo também contém notáveis quantidades de células musculares lisas. Investigações laparoscópicas demonstraram consideráveis contrações do folículo durante a ovulação, especialmente em sua base, o que facilita a ruptura folicular (PIERSON, 1992; HAFEZ, 2004).

Após o aumento do LH, a primeira alteração morfológica ocorre nos capilares que circundam o folículo pré-ovulatório, estes se tornam permeáveis e a teca interna torna-se edemaciada devido à efusão plasmática a partir desses vasos. O colágeno incluindo a teca externa e a túnica albugínea dissocia como o resultado do aumento da liberação de plasmina pelo ativador do plasminogênio a partir das células da granulosa e aumento na atividade da colagenase originada pelos fibroblastos da albugínea. Ocorre o enfraquecimento da parede folicular como um todo, porém, a ruptura acontece na fossa da ovulação. A parede do folículo não é destruída, mas reorganizada, facilitando a transformação em corpo lúteo (PIERSON, 1992).

A vasoconstrição e a redução da perfusão sanguínea que ocorrem no folículo, assim como a aproximação da ruptura do folículo são aparentemente mediadas pela $PGF_{2\alpha}$ (PIERSON, 1992; HAFEZ, 2004).

Pode-se estimar o momento da ovulação quando ocorre uma redução no tônus folicular 24 horas antes da ovulação, mudança na forma de esférico para irregular, redução no diâmetro do folículo, mudança na ecogenicidade do fluido folicular e ecotextura endometrial, redução do edema endometrial, espessamento da parede folicular, assim como o aumento da sensibilidade da égua à palpação ovariana levando à agitação (GINTHER, 1992; GINTHER, 1995; GASTAL et al., 1998). A flutuação do folículo pré-ovulatório e a

sensibilidade à manipulação refletem a degradação enzimática e inflamação que são associadas com o processo da ovulação (BERGFELT & ADAMS, 2007).

A ovulação pode ser detectada pela palpção transretal, através da palpção da depressão na superfície do ovário, ou ultrassonograficamente, pois a imagem de uma ovulação recente é caracterizada por uma área altamente ecogênica no lugar do folículo (PIERSON, 1992; GINTHER et al., 2004a).

A duração média do estro durante a estação ovulatória é de cinco a sete dias e a maioria das ovulações (69 a 78%) ocorre dois dias antes do final do estro e 10 a 14% ocorre posterior ao término do estro (GINTHER, 1992; McKINNON & VOSS, 1993). Segundo Davies Morel & O'Sullivan (2001), pode-se dizer que na égua há uma incidência similar entre as ovulações do lado direito (49,5%) ou esquerdo (50,5%). O índice de múltiplas ovulações aumenta com a idade e as éguas que apresentam múltiplas ovulações em um ciclo tem maior probabilidade desse evento se repetir no próximo ciclo.

Ginther & Utt (2004) apresentaram os princípios, técnicas e potência do ultrassom Doppler em relação à reprodução equina. É esperado que as mudanças diferenciais na perfusão vascular do folículo dominante possam ser quantificadas pelo número de pixels coloridos na imagem, podendo avaliar o tempo para predizer a ovulação.

Carnevale et al. (2002), avaliaram de duas em duas horas a ecogenicidade do local da ovulação até 14 horas pós-ovulação, observando diminuição da ecogenicidade nas primeiras quatro horas e um aumento oito horas pós-ovulação.

2.3. Formação do corpo lúteo

Após a ovulação e sob ação do LH, as células foliculares se luteinizam formando o CL do ciclo subsequente. As células que sofrem luteinização devem parar de dividir-se e começar a expressão de novas moléculas que permitirão que as células luteais sobrevivam em um ambiente hormonal diferente. O CL desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo estral e na manutenção da prenhez, e sua função depende basicamente da progesterona, que é o principal esteróide sintetizado por esta glândula endócrina transitória. A progesterona bloqueia o comportamento de estro e mantém o animal em estado não receptivo (STOCCO et al., 2007). A luteogênese (processo de luteinização do CL) envolve a transformação do folículo recentemente ovulado em uma estrutura altamente vascularizada e capaz de secretar grandes quantidades de progesterona

(NISWENDER et al., 2000). Caso o oócito não seja fertilizado, o CL regride, permitindo que um novo ciclo inicie.

O CL maturo é uma glândula heterogênea composta de dois tipos de células esteroidogênicas (células luteais grandes e pequenas) que se originam de uma fonte folicular, fibroblastos, células imunes (leucócitos, incluindo eosinófilos, linfócitos-T e macrófagos) e endoteliais. Essas células têm diferentes características morfológicas, endócrinas e bioquímicas (McCRACKEN et al., 1999; STOCCO et al., 2007).

Em diversas espécies, o CL é derivado de ambos os tipos de células foliculares: células da teca interna e da granulosa. Nos ruminantes, células luteais pequenas são originadas a partir da teca interna com um diâmetro de 12 a 20 μ m e contém grande quantidade de mitocôndrias e gotas lipídicas. Essas células têm receptores para LH, os quais ativam a proteína kinase A (PKA) através do sistema de segundo mensageiro para estimular a síntese e secreção de progesterona. Células luteais grandes (20 a 45 μ m de diâmetro) são originadas de células da granulosa, responsáveis por 80% da secreção de progesterona *in vivo* também pela PKA e contém grande quantidade de mitocôndrias (McKINNON & VOSS, 1993; SMITH et al., 1994; NISWENDER et al., 2000).

As células luteais grandes têm receptores para PGF_{2 α} e por isso pode ser responsável pela mediação da ação inicial luteolítica dessa prostaglandina. Na maioria das espécies, há uma mistura considerável de tipos de células luteais grandes e pequenas durante a reorganização do folículo recentemente ovulado em CL (STOCCO et al., 2007).

As células da granulosa, que tem aproximadamente 10 μ m de diâmetro na ovulação, aumentam para 15 μ m em 24h após a ovulação e sofrem mudanças citológicas características de luteinização. A hipertrofia e luteinização de células da granulosa iniciam-se 10h após a ovulação e o tamanho máximo (37 μ m) é alcançado posteriormente. O tecido luteal aumenta principalmente com a hipertrofia das células luteínicas (VAN NIEKERK et al., 1975). De acordo com Senger (2003), as células luteais grandes raramente se multiplicam após a ovulação e o número total de células da granulosa provenientes do folículo determina o número de células luteais grandes no CL em formação.

A reorganização celular, objetivando o preparo das células luteais para a síntese crescente de progesterona ao longo do ciclo estral, também foi caracterizada por uma diminuição na expressão das enzimas que convertem progesterona em 17 β -estradiol (P450 17 α -hidroxilase e P450 aromatase), por um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em progesterona (P450 clivadora de cadeia lateral (P450_{sc}))

e a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD)) e aumento da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) para o interior da membrana mitocondrial (FRASER et al., 1986).

Segundo Bruemmer et al. (2006), a expressão gênica de enzimas envolvidas no processo de esteroidogênese foi demonstrada no CL verificando-se diminuição da StAR e 3 β -HSD entre os dias 12 e 14, acompanhada pela diminuição nas concentrações de progesterona a partir dos dias 12 e 13 do ciclo estral. Embora a relação temporal destas enzimas tenha sido descrita durante a regressão do CL, estes autores não atribuem a diminuição das mesmas ao processo de luteólise.

Após a formação do corpo hemorrágico (CH), as células da teca interna e da granulosa se diferenciam em células luteais para formar o CL (SENGER, 2003). A luteinização envolve a morfogênese das células da granulosa secretoras de estrógeno para células luteais secretoras de progesterona em associação com uma neovascularização intensiva (BERGFELT & ADAMS, 2007). Este processo se completa a partir do terceiro dia após a ovulação, sendo caracterizado pelo crescimento das células luteinizadas até o nono dia (NISWENDER & NETT, 1993).

O processo de luteinização das células da granulosa que constituem a parede do folículo pré-ovulatório inicia-se antes da ovulação sendo mediado pelo LH, que tem um papel luteotrófico (FERREIRA-DIAS et al., 2006b). O aumento das concentrações de LH inicia-se ao redor do dia 17 do ciclo concomitante à remoção dos efeitos supressivos da progesterona e do estímulo positivo do estrógeno na frequência de liberação dos hormônios gonadotróficos. O maior aumento nas concentrações de LH ocorre aproximadamente dois dias após a ovulação diminuindo gradualmente, sendo caracterizado por uma meia-vida longa e atingindo concentrações basais 5 a 6 dias após a ovulação (GINTHER, 1992).

A hiperplasia das células da teca, hipertrofia das células da granulosa, proliferação de células fibroblásticas, angiogênese com migração e proliferação de células endoteliais também ocorrem durante o processo de luteinização (STOCCO et al., 2007).

2.3.1 Angiogênese

O desenvolvimento normal do CL e sua capacidade de produzir progesterona, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas são dependentes da vascularização, isto é, do suprimento sanguíneo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

Vasos sanguíneos invadem o espaço antral do folículo pré-ovulatório e uma ampla e densa rede capilar permite que células produtoras de hormônios obtenham oxigênio,

nutrientes e precursores hormonais, e fornece um mecanismo para uma produção rápida e eficiente de progesterona pelo CL. Essa rápida formação de suprimento vascular de camadas celulares a partir das células da granulosa pode estar relacionada à existência da atividade angiogênica do fluido folicular, que, aparentemente, é induzido pela lise da membrana basal folicular que separa as células da teca e granulosa durante o período peri-ovulatório (SCHAMS & BERISHA, 2004).

O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos no ovário, conhecido como angiogênese, é regulado pelos fatores de crescimento. Al-zi'abi et al. (2003), indicam um forte papel do VEGF na regulação da angiogênese no CL equino. Nesse estudo, a proliferação celular endotelial durante o início e o meio da fase luteal demonstrou intensa angiogênese. Observou-se também que o VEGF pode exercer um efeito parácrino na regulação do crescimento vascular sanguíneo e desenvolvimento no CL das éguas.

Fatores angiogênicos e esteróides ovarianos, assim como o VEGF, o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento endotelial e o fator de crescimento epidermal, são importantes moduladores da síntese de óxido nítrico (ON) (GRASSELLI et al., 2002; PINTO et al., 2002; ROBERTO DA COSTA et al., 2007). Essa molécula sinalizadora é um potente vasodilatador conhecido por desempenhar importante papel no sistema reprodutivo. É um mediador essencial na angiogênese e está envolvido na manutenção da função vascular, tônus e integridade (ROBERTO DA COSTA et al., 2008). Na égua, Pinto et al. (2002) demonstraram um atraso na ovulação quando administraram inibidores da síntese de ON quando comparados ao grupo controle.

Ferreira-Dias et al. (2006a) relataram a importância de fatores angiogênicos e da microvascularização no desenvolvimento do CL em éguas, demonstrando que o desenvolvimento do CL e sua função endócrina são intimamente dependentes da formação de novos capilares. Segundo os autores, a densidade microvascular aumenta no início e no meio da fase luteal, seguida pela queda dessa densidade na fase luteal tardia e diminuição adicional no CL. Mudanças na microvascularização das estruturas luteais cíclicas equina estiveram presentes durante toda a fase luteal, sugerindo que numerosos, mas ainda não definidos fatores angiogênicos, são produzidos pelo CL equino durante o desenvolvimento luteal. O estudo sugere que a $PGF_{2\alpha}$ pode ter um papel na regressão vascular do CL durante a fase luteal tardia, demonstrando que a angiogênese luteal e a regressão vascular na égua são coordenadas com o desenvolvimento de tecido não vascular e pode ser regulado por diferentes fatores.

Ginther et al. (2007b) demonstraram a relação temporal entre a perfusão sanguínea no CL e as concentrações de progesterona circulantes. Após completo desenvolvimento do CL indicado pela máxima concentração média de progesterona no dia 8 pós-ovulação e até o final do período pré-luteolítico (D14), não houve diferenças entre valores máximos de progesterona e área de perfusão do CL, exceto no dia 10, onde uma maior área de perfusão foi observada, ocorrendo dois dias após a determinação da máxima concentração de progesterona. Neste estudo, o processo de luteólise foi caracterizado por uma rápida diminuição nas concentrações de progesterona acompanhada por uma diminuição mais lenta da área de perfusão durante o período luteolítico (D15 a D17). No entanto, o estudo não demonstra aumento ou diminuição repentina na perfusão antecedendo a rápida diminuição nas concentrações de progesterona.

2.4. Manutenção do corpo lúteo e concentração de progesterona

A regulação da secreção de progesterona e manutenção da funcionalidade do CL depende do número e afinidade aos receptores de LH durante o período pós-ovulatório, sendo semelhante para os corpos lúteos originados a partir de múltiplas ovulações (ROSER & EVANS, 1983). Durante o ciclo reprodutivo da mulher, ovelha e porca, o número de receptores luteais para LH aumentam e diminuem concomitantemente com a maturação funcional e a regressão do CL (RAO et al., 1977; DIEKMAN et al., 1978; ZIECIK et al., 1980).

Na égua, as concentrações de LH são muito baixas durante o meio da fase luteal (GINTHER et al., 2005). Por isso, parece provável que qualquer mudança no número de receptores de LH e/ou na afinidade do receptor, controle a função luteal.

Em trabalho realizado por Watson et al. (2000), éguas foram tratadas com um antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no oitavo dia do diestro para testar o papel do LH na manutenção do CL. O comprimento do ciclo estral foi significativamente maior no grupo tratado do que no controle, demonstrando que o tratamento de éguas em diestro com antagonista do GnRH atenuou a secreção de progesterona, indicando o papel do LH no suporte do CL na égua, e atraso na ovulação, provavelmente devido à falta do suporte gonadotrófico. Os resultados indicam que a liberação de alta amplitude do LH está envolvida na manutenção da produção de progesterona pelo CL equino. O atraso no crescimento folicular e ovulação nas éguas

tratadas com antagonista do GnRH confirma o papel das gonadotrofinas no desenvolvimento do folículo pré-ovulatório.

Já Kanitz et al. (2006), investigaram o efeito da administração de um agonista do GnRH nas concentrações de progesterona e LH, no dia 10 após a ovulação. As concentrações de progesterona aumentaram continuamente do D0 ao D11 em ambos os grupos, não diferindo entre o grupo tratado e o controle.

De acordo com LeBlanc (2003), as concentrações de progesterona aumentam gradativamente após a ovulação atingindo 1,5 a 2,5ng/mL dentro de 24h e 2,5 a 5,0ng/mL em 48h após a ovulação. O pico dessas concentrações (8 a 20ng/mL) é atingido entre os dias 5 e 8 pós-ovulação mantendo-se alto até o início da luteólise ao redor dos dias 14 e 15, em resposta à liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio.

Segundo Nagy et al. (2004), as concentrações de progesterona plasmática são maiores após múltiplas ovulações quando comparadas a ovulações simples.

2.5. Síntese de progesterona e função do corpo lúteo

O CL produz progesterona, sendo esta sintetizada a partir do colesterol que é transportado para o interior da mitocôndria pela StAR e convertido em pregnenolona por meio da ação da enzima P450scc, sendo que a conversão de pregnenolona em progesterona ocorre por meio da enzima 3β -HSD presente no retículo endoplasmático liso (BELIN et al., 2000; NISWENDER, 2002).

O colesterol é transportado na forma de lipoproteínas para todos os tecidos esteroidogênicos, sendo que as principais fontes de colesterol disponíveis para a produção de hormônios esteróides são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL). O principal mecanismo de obtenção do LDL ocorre através da endocitose (CHRISTENSON & DEVOTO, 2003). O HDL extracelular encontra-se conjugado a proteínas do plasma que se liga à membrana celular fazendo o transporte do HDL para dentro da célula. Uma vez no interior da célula, as lipoproteínas são quebradas por enzimas do lisossomo e o colesterol disponível no citoplasma da célula é utilizado como substrato para a esteroidogênese (NISWENDER et al., 2000).

De acordo com Niswender (2002), a StAR e o receptor benzodiazepínico tipo periférico (PBR) estão envolvidos no transporte do colesterol para a membrana mitocondrial. A StAR se liga ao colesterol no citoplasma e faz o transporte para a membrana mitocondrial externa, onde o PBR está envolvido no transporte para a

membrana mitocondrial interna. Sendo assim, a StAR é o principal elemento transportador de colesterol. O transporte do colesterol para a membrana mitocondrial é dependente da fosforilação da proteína StAR. Essa proteína possui dois sítios de fosforilação, um fosforilado pela PKA, que estimula o transporte de colesterol e outro pela proteína kinase C (PKC), que pode inibir o processo. Nas células luteais pequenas a ligação do LH ao seu receptor ativa a PKA. A endozepina, um ligante natural do PBR, também parece estar envolvida no transporte do colesterol para a membrana mitocondrial interna. A endozepina muda a conformação do PBR capacitando-o para o transporte do colesterol ou facilitando a interação da StAR com o PBR na troca do colesterol.

O CL tem como função primordial produzir progesterona, sendo as células luteais esteroidogênicas as principais fontes desse hormônio (LeBLANC, 2003). Essa glândula tem um papel-chave na regulação do comprimento do ciclo ovariano na maior parte de mamíferos cíclicos, e a extensão da vida útil desse CL, assim como a secreção de progesterona é necessária para a manutenção da gestação (McCRACKEN et al., 1999). A progesterona estimula mudanças proliferativas no lúmen do epitélio uterino e nas glândulas endometriais preparando o endométrio para receber o embrião em caso de fertilização, sendo também responsável pelo comportamento de rejeição ao garanhão durante o diestro (LeBLANC, 2003).

2.6. Ultrassonografia luteal (modo-B)

É evidente a importância do CL durante o ciclo estral e a gestação. Porém, a presença e o estágio da glândula luteínica não podem ser avaliados prontamente durante o desenvolvimento e estágios de regressão pela palpação retal (GINTHER, 1998; HIRANO et al., 2009). As dosagens de progesterona representam um meio eficiente para indicar a atividade da glândula, porém não podem ser utilizadas para uma avaliação imediata. Contudo, a ultrassonografia (modo-B) pode ser empregada imediatamente para a detecção e avaliação do desenvolvimento tanto de folículos quanto de corpos lúteos os quais são reconhecidos ultrassonograficamente pelo tamanho, forma e características de ecogenicidade.

A visualização da densidade fornece informações úteis do estado da glândula. Escalas subjetivas de cinza, com notas que variam de 1 a 5, medem a densidade pela quantidade de brilho apresentada na tela do aparelho. A quantidade de tecido luteínico pode afetar a produtividade da glândula. Similarmente, a intensidade da ecogenicidade

luteínica pode refletir a qualidade hemodinâmica e a funcionalidade luteínica (GINTHER & PIERSON, 1984; PIERSON & GINTHER, 1985; TOWNSON & GINTHER, 1989a). Em estudo realizado por Townson & Ginther (1989b), imagens ultrassonográficas de CL equino foram avaliadas subjetivamente para determinar se a ecogenicidade é indicativo de função luteal. A ecogenicidade aumentou entre os dias 0 e 1 e diminuiu rapidamente entre os dias 2 e 4, alcançando valores mínimos no dia 8, seguido de um aumento progressivo até a ovulação, o que sugere que a ecogenicidade pode ser um indicativo de perfusão sanguínea luteal. Resultados semelhantes foram encontrados por Tom et al. (1998) com CL bovino.

Já Arruda et al. (2001), avaliaram a morfoecogenicidade (ME) e tamanho do CL do D0 (dia da ovulação) ao D9 e concluíram que houve uma tendência de os corpos lúteos apresentarem ME crescente. Não houve diferença na ME, no tamanho dos corpos lúteos, nem nas concentrações de progesterona circulante do D0 ao D9 em éguas que se tornaram gestantes ou não após a transferência de embriões. As concentrações de progesterona foram $<2,16\text{ng/mL}$ até o D3, com conseqüente elevação e manutenção em concentrações de diestro entre D4 e D9 ($3,41$ a $4,33\text{ng/mL}$). O aumento da ME média dos corpos lúteos avaliados por ultrassonografia foi acompanhado por aumento na concentração plasmática de progesterona, mas este evento parece não ser dependente do tamanho da glândula luteínica.

A exploração repetida durante o ciclo estral permite a observação, em tempo real, do aumento da área durante o desenvolvimento luteal e redução de área durante a luteólise em animais não prenhes (KÄHN, 1994).

2.7. Luteólise

Em muitas espécies de mamíferos não-primatas, a luteólise é causada pela secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina que nos bovinos atua localmente no CL por um mecanismo de contra-corrente. Na égua, ocorre via circulação sistêmica (GINTHER, 1998). A histerectomia nas espécies não-primatas causa a manutenção do CL, ao passo que em primatas, não influencia na regressão cíclica do CL. Em pequenos ruminantes, o mecanismo de interação entre a ocitocina, o $17\text{-}\beta$ estradiol e a progesterona já está bem esclarecido.

O estradiol induz a formação de receptores endometriais para ocitocina, porém esta ação é bloqueada pela progesterona durante a fase luteal, inibindo a ação estrogênica e

agindo diretamente alterando a conformação gênica dos receptores de ocitocina. Então o útero se torna refratário à ocitocina, porém a progesterona induz “*down regulation*” de seus próprios receptores, permitindo que o estradiol volte a estimular a expressão de receptores endometriais para ocitocina (McCRACKEN et al., 1999).

A ocitocina é um hormônio sintetizado no hipotálamo e secretado na hipófise para depois atingir a circulação. A fonte desse hormônio que participa do processo de luteólise não é totalmente esclarecida na espécie equina, porém já se sabe que o endométrio é uma das fontes, que já foi identificada também no seu CL (WATSON et al., 1999), assim como a neurohipófise é também uma fonte potencial (UTT et al., 2007).

A ocitocina parece ter um papel importante no início da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na égua e pode participar do feedback positivo com a $\text{PGF}_{2\alpha}$ para promover uma maior liberação do hormônio como descrito em ruminantes. No trabalho realizado por Utt et al. (2007), o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentou a secreção de ocitocina no D8 na égua, assim como ocorre em ovelhas e na vaca.

Tetzke et al. (1987) relataram altas concentrações sistêmicas de ocitocina no dia 15, perto da luteólise em éguas cíclicas. Além disso, Vanderwall et al. (1998) descreveram que pulsos de alta amplitude $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram associados com pulsos de ocitocina. Semelhante aos ruminantes, tratando-se éguas cíclicas com ocitocina durante o fim da fase luteal resulta em aumento nas concentrações do metabólito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM). No entanto, administração contínua de ocitocina dos dias 8 a 20 leva à prolongação da fase luteal (STOUT et al., 1999).

Estudos em outras espécies indicam que a luteólise é associada com a redução da perfusão sanguínea luteal (NISWENDER et al., 1976). A relação entre a diminuição das concentrações de progesterona durante a regressão luteal não parece ser devido à perda das células esteroideogênicas luteais, mas pela redução no fluxo sanguíneo e diminuição na atividade esteroideogênica dessas células, o que foi verificado por alterações na expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para 3β -HSD e StAR após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena (NISWENDER 2000; BOLLWEIN et al., 2002). Segundo Knickerbocker et al. (1988) não é claro se a diminuição da perfusão sanguínea é a causa ou a consequência da regressão luteal. Em estudo realizado em equinos por Ginther et al. (2008), baseado na dosagem de progesterona e avaliação da perfusão sanguínea a cada 12 horas, o início da diminuição na concentração de progesterona (luteólise) e a diminuição na perfusão

sanguínea ocorrem 36 e 24 horas, respectivamente, antes da progesterona atingir 2ng/mL, portanto uma diminuição na perfusão sanguínea não precede a diminuição da progesterona.

Ginther et al. (2007a), estudaram o efeito de uma única injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o meio do diestro (D8) sobre concentrações de progesterona, LH, FSH, estradiol, cortisol e a perfusão sanguínea no CL, sendo esta última avaliada pelo *color-Doppler*. Os exames e a colheita de sangue foram feitos as 0h e a cada 5 minutos até 1h, e em 1,5; 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72h. As concentrações de estradiol não se modificaram, mas a progesterona, LH, FSH e cortisol aumentaram significativamente dentro de 5 minutos. A progesterona aumentou significativamente dentro de 10 minutos depois das 0h e logo reduziu dentro de 40 minutos a concentrações abaixo das concentrações do grupo controle. Os resultados não sustentam a hipótese de que o aumento transitório pós- $\text{PGF}_{2\alpha}$ na progesterona foi associado com um aumento na perfusão sanguínea luteal. A luteólise indicada pela redução na progesterona começou bem antes do início da redução na perfusão sanguínea luteal.

Com o objetivo de determinar se o tratamento periovulatório com $\text{PGF}_{2\alpha}$ afeta o desenvolvimento do CL e se é prejudicial para o estabelecimento da prenhez, Troedsson et al. (2001), realizaram um estudo aplicando cloprostenol (análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$) nos dias 0, 1 e 2 pós-ovulação, concluindo que há um efeito prejudicial na função luteal inicial indicado pelas baixas taxas de prenhez quando comparadas ao grupo controle, assim como quando a droga é administrada somente no dia 2. Já Nie et al. (2003), compararam o efeito da administração pós-ovulatória de ocitocina com o cloprostenol nas taxas de prenhez e função luteal, afirmando que não há diferença entre os tratamentos, indicando o uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$ para éguas pós-cobertura, até 2 dias pós-ovulação.

O efeito agudo da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre as concentrações sistêmicas de progesterona e ocitocina foram avaliados no D8 e no D13 da fase luteal. O tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ resulta em um aumento imediato e bifásico nas concentrações de progesterona antes da queda esperada. O tratamento de éguas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D8 resultou em um maior aumento nas concentrações sistêmicas de ocitocina comparado com o tratamento no D13 e esse aumento no D8 também foi bifásico. O padrão bifásico consiste de uma fase aguda (aumento dentro de 1 minuto) seguido por uma fase estável (UTT et al., 2007).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo verificar se a aspiração de folículos $\geq 25\text{mm}$ permite a transformação de células foliculares em estruturas luteinizadas capazes de produzir progesterona em concentrações compatíveis com o período de diestro.

Determinar pela imagem ultrassonográfica e concentrações de progesterona a porcentagem de éguas com folículos aspirados $\geq 25\text{mm}$, $\geq 30\text{mm}$, $\geq 35\text{mm}$ e pré-ovulatório que formam uma estrutura semelhante a um corpo lúteo.

Através da dosagem da progesterona, determinar o tempo, em dias, necessário para o início do diestro (concentração de progesterona $> 2\text{ng/mL}$), o intervalo entre a aspiração e o início da luteólise, assim como da aspiração à ovulação. Verificar a concentração máxima de progesterona atingida durante o ciclo e o dia da detecção da concentração máxima de progesterona.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 29 ciclos estrais de 15 éguas mestiças, com idade entre quatro e 15 anos, peso entre 350 e 500kg, com histórico de atividade reprodutiva normal e ciclando regularmente, durante a estação ovulatória. Os animais foram mantidos durante o experimento em piquetes no Posto de Monta da Fazenda Lageado UNESP, Botucatu-SP (Latitude -22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"), sendo alimentados com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) duas vezes ao dia, ração comercial, suplementadas com sal mineral e com acesso livre a água.

4.2. Grupos experimentais

Cinco dias após a ovulação, as éguas foram avaliadas por ultrassonografia transretal, empregando-se o modelo Aloka SSD500 com transdutor linear de 5MHz para determinar o diâmetro dos três maiores folículos e a presença de corpo lúteo. Em seguida, as éguas receberam 7,5mg de Dinoprost-trometamina (PGF_{2α} – lutalyse – Pfizer), sendo distribuídas aleatoriamente em cinco grupos. Um único folículo ovariano foi aspirado, exceto quando uma co-dominância (diferença de 3mm entre eles) foi observada. Neste caso, ambos os folículos foram aspirados no mesmo momento quando atingiram o diâmetro esperado nos respectivos grupos: Grupo F ≥25mm, folículo ≥25mm (n = 6); Grupo F ≥30mm, folículo ≥30mm (n = 6); Grupo F ≥35mm, folículo ≥35mm (n = 6). O Grupo F pré-ovulatório (n = 6) foi submetido à aspiração do folículo pré-ovulatório de acordo com a detecção das características ultrassonográficas descritas por Gastal et al. (1998), como diâmetro >35mm, mudança na forma de esférico para irregular, espessamento da parede folicular, formação da parede dupla com aumento na ecogenicidade da camada granulosa tornando-a mais evidente. No grupo controle (n = 5), o folículo não foi submetido à aspiração, acompanhando-se as ovulações espontâneas.

4.3. Aspiração folicular

As éguas foram sedadas com 0,5mg/kg, IV de Xilazina a 10% (Sedazine[®] – Fortdodge) e 0,03mg/kg, IV Acepromazina (Acepran[®] - Vetnil). Para a obtenção do relaxamento retal foi utilizado 0,2mg/kg, IV de Hyoscina N-butyl bromide (Butylscopolamina – Sigma Pharma). Um folículo ou eventualmente dois, em caso de co-dominância, foram aspirados utilizando-se um monitor com transdutor convexo de 5MHz (Pie Medical modelo 240) com guia transvaginal contendo uma agulha de 18G (WTA Ltda), conectada a um sistema de vácuo, com pressão entre 180-200mmHg (Figura 1). A aspiração folicular foi iniciada a partir do momento em que se observou a ponta da agulha no antro folicular, por meio de pressão negativa exercida pela bomba a vácuo. Objetivando evitar o reenchimento do folículo com fluido folicular, foram realizadas três perfurações na parede de cada folículo aspirado. As éguas receberam duas doses 1mg/kg, IV de Flunixin meglumine (Banamine[®] - Schering-Plough), sendo a primeira administrada imediatamente antes do procedimento de aspiração e a segunda após 24 horas, visando analgesia e ação anti-inflamatória.

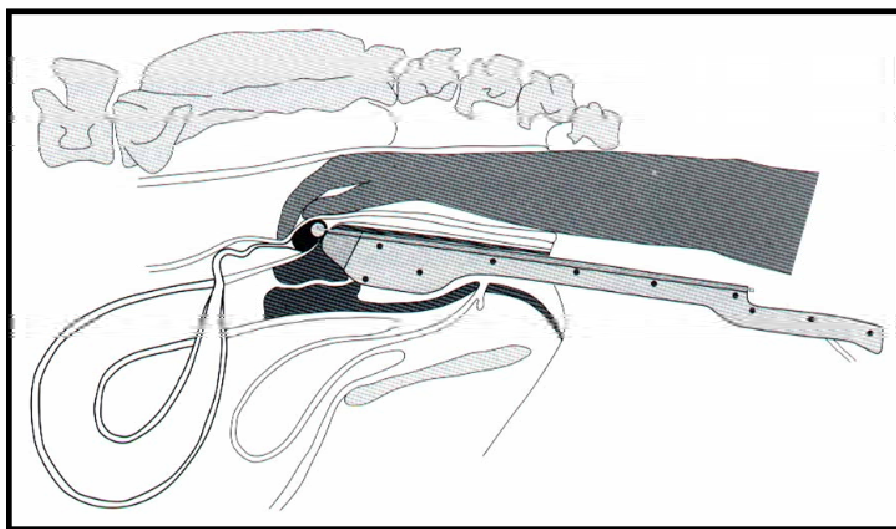


FIGURA 1: Esquema de aspiração folicular em bovino com transdutor convexo (Ginther, 1995).

4.4. Avaliação ultrassonográfica

A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada a cada 24 horas iniciando-se 48 horas antes da aspiração folicular, continuando até a ovulação subsequente. A mensuração do diâmetro folicular foi realizada através de exame ultrassonográfico (média dos valores referentes à largura e altura dos folículos em imagens congeladas). Quando o maior folículo atingiu diâmetro $\geq 25\text{mm}$, $\geq 30\text{mm}$, $\geq 35\text{mm}$ e pré-ovulatório, este foi aspirado (D0 = dia da aspiração folicular ou ovulação no grupo controle). Após a aspiração, a luteinização da estrutura originada foi caracterizada através dos aspectos ultrassonográficos, como ecogenicidade durante o desenvolvimento, formação de uma estrutura semelhante a um folículo hemorrágico, presença ou ausência de coágulo não ecogênico central, conforme descritos por Ginther (1992) durante a formação do corpo lúteo.

4.5. Colheita de sangue e ensaio hormonal

A colheita de sangue foi realizada por meio de punção da veia jugular em tubos vacutainer heparinizados, a cada 24 horas iniciando-se 48 horas antes da aspiração folicular continuando até a ovulação subsequente. O sangue foi centrifugado imediatamente após colheita a 3000rpm por 5 minutos sendo o plasma removido e armazenado a -20°C até a realização da análise hormonal.

A concentração plasmática de progesterona foi determinada por radioimunoensaio (RIA) utilizando-se kits comerciais Coat-a-Count, DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Para determinar a precisão de cada ensaio foi utilizado um *pool* de plasmas, o qual foi repetido por três vezes e em duplicata no mesmo ensaio. O erro intra ensaio e inter ensaio foi de 7,6% e 8,3%, respectivamente.

4.6. Análise estatística

Com o objetivo de comparar as médias da concentração de progesterona para os cinco grupos em seis dias diferentes (D1, D4, D7, D10, D13 e D16) e entre éguas, foi

utilizada a análise de variância de perfil seguida do método de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Para o intervalo entre o dia da aspiração ou ovulação e concentração plasmática de progesterona $>2\text{ng/mL}$; aspiração ou ovulação e concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$; aspiração ou ovulação e ovulação subsequente; concentrações máximas de progesterona e dia da detecção das concentrações máximas de progesterona, cujo interesse era comparar grupos, foi utilizada a análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso, seguida do método de Tukey, com o nível de significância de 5%.

O início do diestro foi caracterizado pela concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e a luteólise quando os níveis foram $<2\text{ng/mL}$ (GINTHER et al., 2008). Dessa forma, os animais que não atingiram as concentrações de 2ng/mL de progesterona, foram excluídos da análise aspiração ou ovulação ao início do diestro e aspiração ou ovulação à luteólise.

Foi utilizado o teste do qui-quadrado para estudo da associação entre as variáveis categóricas: (1) animais que responderam à aspiração folicular atingindo concentrações $>2\text{ng/mL}$ de progesterona; (2) presença ou ausência de estrutura lútea pela ultrassonografia.

5. RESULTADOS

Quando comparadas as médias das concentrações plasmáticas de progesterona entre dias, os grupos $F \geq 25\text{mm}$, $F \geq 30\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$ não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$). No grupo F pré-ovulatório, o D4, D7, D10, D13 e D16 foram semelhantes estatisticamente ($P > 0,05$). No entanto, o D1 foi semelhante ($P > 0,05$) ao D4 e D16. No controle, o D1 foi maior ($P < 0,05$) do que o D16 e ambos foram diferentes estatisticamente dos demais dias ($P < 0,05$). O D4, D7, D10 e D13 foram semelhantes ($P > 0,05$), como demonstrado na Tabela 1.

Quando comparadas as médias entre grupos, não houve diferença estatística ($P > 0,05$), exceto no D4 e D7 onde o grupo controle foi maior ($P < 0,05$) do que os demais grupos (Tabela 1).

Uma égua do grupo $F \geq 30\text{mm}$ apresentou uma ovulação de diestro 10 dias após a aspiração folicular e a colheita de sangue foi interrompida neste dia. Esse animal entrou para a análise de dados aspiração a concentração de progesterona $> 2\text{ng/mL}$ e foi excluído da aspiração a concentração de progesterona $< 2\text{ng/mL}$ (Tabela 2). Duas éguas do grupo $F \geq 30\text{mm}$ não atingiram as concentrações plasmática de 2ng/mL de progesterona após a aspiração folicular e ovularam 12 e 10 dias após a aspiração folicular, respectivamente, portanto foram excluídas das análises aspiração a concentração plasmática de progesterona $> 2\text{ng/mL}$ e aspiração a concentração plasmática de progesterona $< 2\text{ng/mL}$ (Tabela 2). Uma égua do $F \geq 25\text{mm}$ e uma do $F \geq 35\text{mm}$ não atingiram as concentrações plasmática de 2ng/mL de progesterona após a aspiração folicular e ovularam 11 e 7 dias, respectivamente, após a aspiração folicular. Esses animais, portanto, foram excluídos das análises aspiração a concentração plasmática de progesterona $> 2\text{ng/mL}$ e aspiração a concentração plasmática de progesterona $< 2\text{ng/mL}$ (Tabela 2).

Quanto ao intervalo de dias entre aspiração e concentração plasmática de progesterona $> 2\text{ng/mL}$, que indica o início do diestro, o grupo controle foi igual ($P > 0,05$) ao grupo F pré-ovulatório e menor ($P < 0,05$) do que os demais. O grupo F pré-ovulatório foi semelhante ($P > 0,05$) ao $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$, e menor ($P < 0,05$) do que $F \geq 30\text{mm}$ que foi semelhante a $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$ (Tabela 2).

Analisando-se o período entre aspiração e concentração plasmática de progesterona $> 2\text{ng/mL}$, aspiração e ovulação (Tabela 2) e dia da concentração plasmática máxima de progesterona (Tabela 3) não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$).

Na concentração máxima de progesterona (Tabela 3), o grupo controle foi igual ($P>0,05$) ao grupo F pré-ovulatório e $F \geq 35\text{mm}$, as quais foram maiores ($P<0,05$) do que $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 30\text{mm}$, porém não houve diferença estatística entre os grupos aspirados (Figura 2).

A porcentagem de animais que atingiram as concentrações plasmática de 2ng/mL de progesterona, assim como os animais que formaram uma estrutura semelhante a um CL, está demonstrada na tabela 4.

Pela imagem ultrassonográfica, no grupo $F \geq 25\text{mm}$, três éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea, uma formou uma estrutura semelhante a um folículo hemorrágico, uma formou uma estrutura hiperecogênica cavitária e uma formou uma pequena estrutura hiperecogênica, sendo que esta não alcançou a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$. No grupo $F \geq 30\text{mm}$, duas éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea, uma formou uma estrutura semelhante a um folículo hemorrágico, uma formou uma estrutura hiperecogênica cavitária, duas formaram uma pequena estrutura anecogênica com coágulo central hiperecogênico, sendo que estas duas não alcançaram a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$. No grupo $F \geq 35\text{mm}$, três éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea, duas formaram uma pequena estrutura anecogênica com coágulo central hiperecogênico, uma formou uma estrutura hiperecogênica cavitária, sendo que esta não alcançou a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$. No grupo F pré-ovulatório, três éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea e três formaram uma estrutura hiperecogênica cavitária.

Portanto, de 24 éguas que sofreram a aspiração folicular, 20 responderam a aspiração (concentração plasmática de progesterona $>2\text{ng/mL}$) e quatro não responderam. Sendo assim, através da ultrassonografia pode-se observar que as estruturas hiperecogênicas homogêneas, semelhantes a um folículo hemorrágico e hiperecogênicas cavitárias tiveram concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e as estruturas pequenas hiperecogênicas e anecogênicas com coágulo central hiperecogênico tiveram concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$.

TABELA 1 - Concentração de progesterona plasmática (ng/mL) nos dias 1, 4, 7, 10, 13 e 16 após a aspiração folicular ou ovulação (D0) em éguas.

Grupos	Dias após a aspiração folicular					
	1	4	7	10	13	16
F ≥25mm (n = 6)	0,15±0,04 ^{Aa}	1,54±1,10 ^{Ba}	4,34±2,33 ^{Ba}	5,86±2,11 ^{Aa}	6,32±1,52 ^{Aa}	6,12±1,82 ^{Aa}
F ≥30mm (n = 6)	0,13±0,05 ^{Aa}	0,22±0,06 ^{Ba}	2,47±0,89 ^{Ba}	4,94±1,86 ^{Aa}	8,81±2,65 ^{Aa}	5,97±1,28 ^{Aa}
F ≥35mm (n = 6)	0,24±0,13 ^{Aa}	1,38±0,48 ^{Ba}	4,11±1,01 ^{Ba}	8,27±1,40 ^{Aa}	7,66±1,57 ^{Aa}	6,77±1,52 ^{Aa}
F Pré-ovul. (n = 6)	0,11±0,04 ^{Ab}	2,70±0,53 ^{Bab}	9,01±1,45 ^{Ba}	8,95±1,52 ^{Aa}	8,37±1,62 ^{Aa}	2,04±1,05 ^{Aab}
Controle (n = 5)	2,54±1,50 ^{Ac}	12,09±2,52 ^{Aa}	16,28±3,45 ^{Aa}	13,90±3,38 ^{Aa}	8,08±2,90 ^{Aa}	0,11±0,01 ^{Ab}

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha
Pré-ovul. = Pré-ovulatório

TABELA 2 - Intervalo em dias, da aspiração folicular ou ovulação a concentração plasmática de progesterona $>2\text{ng/mL}$, da aspiração folicular ou ovulação a concentração plasmática de progesterona $<2\text{ng/mL}$ e da aspiração folicular ou ovulação a ovulação subsequente em éguas nos diferentes grupos.

Grupo	Aspiração ou ovulação a		Aspiração ou
	concentração de progesterona		ovulação a ovulação
	$>2\text{ng/mL}$	$<2\text{ng/mL}$	Dias
	Dias	Dias	
F $\geq 25\text{mm}$	$6,2 \pm 1,1^{\text{AB}}$ (n = 5)	$17,2 \pm 1,6^{\text{A}}$ (n = 5)	$20,5 \pm 3,1^{\text{A}}$ (n = 6)
F $\geq 30\text{mm}$	$7,3 \pm 0,5^{\text{A}}$ (n = 4)	$19,0 \pm 1,4^{\text{A}}$ (n = 3)	$17,2 \pm 2,8^{\text{A}}$ (n = 6)
F $\geq 35\text{mm}$	$5,4 \pm 0,6^{\text{AB}}$ (n = 5)	$18,8 \pm 1,6^{\text{A}}$ (n = 5)	$23,0 \pm 3,5^{\text{A}}$ (n = 6)
F Pré-ovul.	$4,0 \pm 0,4^{\text{BC}}$ (n = 6)	$16,0 \pm 0,5^{\text{A}}$ (n = 6)	$22,7 \pm 0,8^{\text{A}}$ (n = 6)
Controle	$1,6 \pm 0,4^{\text{C}}$ (n = 5)	$13,6 \pm 0,7^{\text{A}}$ (n = 5)	$22,0 \pm 1,0^{\text{A}}$ (n = 5)
P	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna

TABELA 3 - Concentração máxima de progesterona plasmática e dia da detecção da concentração máxima de progesterona plasmática (ng/mL) em éguas nos diferentes grupos.

Grupo	Concentração máxima de progesterona	
	(ng/mL)	(dias)
F $\geq 25\text{mm}$	$8,1 \pm 2,2^{\text{B}}$ (n = 6)	$11,3 \pm 4,6^{\text{A}}$ (n = 6)
F $\geq 30\text{mm}$	$6,4 \pm 2,6^{\text{B}}$ (n = 6)	$11,5 \pm 1,2^{\text{A}}$ (n = 6)
F $\geq 35\text{mm}$	$8,3 \pm 1,8^{\text{AB}}$ (n = 6)	$11,2 \pm 4,8^{\text{A}}$ (n = 6)
F Pré-ovulatório	$10,9 \pm 1,8^{\text{AB}}$ (n = 6)	$8,7 \pm 3,4^{\text{A}}$ (n = 6)
Controle	$20,4 \pm 4,7^{\text{A}}$ (n = 5)	$8,8 \pm 0,6^{\text{A}}$ (n = 5)
P	$<0,05$	$>0,05$

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna

TABELA 4 - Distribuição de frequências das éguas que atingiram a concentração plasmática de progesterona (P4) >2ng/mL após a aspiração folicular e porcentagem de éguas com presença ou ausência de estrutura lútea (EL) visualizada pela ultrassonografia.

Grupo	Éguas com concentração de P4		Éguas	
	>2ng/mL (%)	<2ng/mL (%)	presença EL (%)	ausência EL (%)
F ≥25mm (n=6)	83,3	16,7	66,7	33,3
F ≥30mm (n=6)	66,7	33,3	50,0	50,0
F ≥35mm (n=6)	83,3	16,7	83,3	16,7
F Pré-ovul. (n=6)	100,0	0,0	100,0	0,0
Controle (n=5)	100,0	0,0	100,0	0,0

$\chi^2=3,8$ $p=0,44$ (concentração de P4 > ou <2ng/mL)

$\chi^2=6,6$ $p=0,16$ (presença/ausência de EL)

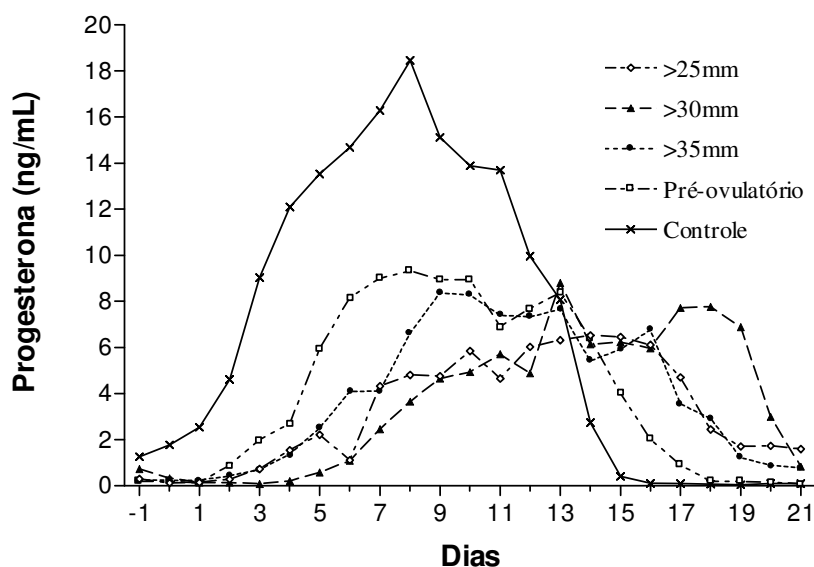


FIGURA 2 – Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona em éguas, iniciando a colheita de sangue no dia anterior a aspiração (D-1) ao D21, considerando-se D0 o dia da aspiração folicular.

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que a aspiração de folículos ovarianos $\geq 25\text{mm}$ em éguas leva à formação de uma estrutura luteinizada produtora de progesterona, a qual atinge concentrações compatíveis com o período do diestro ($>2\text{ng/mL}$) entre os dias 4 e 7 após a aspiração. No grupo F pré-ovulatório, observou-se as mesmas concentrações entre os dias 1 e 4. Porém, nos demais grupos a concentração plasmática de progesterona foi similar ao controle no D10 (Figura 2). Em trabalho realizado por Hayna et al. (2004), concentrações elevadas de progesterona sérica foram detectadas 5 dias após a aspiração, porém, no referido estudo, tecido luteal foi considerado presente quando as concentrações de progesterona foram $>1\text{ng/mL}$, assim como em outro estudo realizado por Hayna et al. (2006) onde 80% das éguas alcançaram estas concentrações de progesterona plasmática no D5 e os 20% restantes no D8. Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos estudos citados.

Diferentes concentrações de progesterona plasmática durante o ciclo estral em éguas têm sido relatadas. Segundo Ginther et al. (2006), entre os dias 1 e 2, a progesterona aumentou de $2,1\pm 0,3$ a $4,8\pm 0,5\text{ng/mL}$, valores semelhantes foram relatados por LeBlanc (2003), onde as concentrações de progesterona aumentaram gradativamente após a ovulação atingindo $1,5$ a $2,5\text{ng/mL}$ dentro de 24h e $2,5$ a $5,0\text{ng/mL}$ em 48h. Já Arruda et al. (2001), encontraram níveis significativamente mais baixos ($\leq 2,16\text{ng/mL}$) até o terceiro dia após a ovulação, a partir do qual a produção de progesterona se elevou e se manteve relativamente constante ($3,41$ a $4,33\text{ng/mL}$) até o último dia (D9) de observação. De acordo com Kanitz et al. (2006), a média das concentrações de progesterona aumentou continuamente do D0 ao D8 após a ovulação de $0,63\pm 0,68$ a $5,83\pm 0,68\text{ng/mL}$.

Comparando-se as concentrações plasmática de progesterona alcançadas nos grupos aspirados neste experimento, com as dosagens de éguas ovuladas encontradas na literatura dentro de 48h, os grupos após aspirados demoraram mais para chegar a níveis semelhantes de progesterona. Os resultados do presente trabalho foram similares aos previamente publicados que envolveram a aspiração folicular (HINRICHS et al., 1991; HAYNA et al., 2004, 2006). Segundo Niswender (2002), as concentrações séricas de progesterona dependem da quantidade de tecido esteroidogênico, perfusão sanguínea e capacidade do tecido esteroidogênico em sintetizar progesterona. A quantidade de tecido esteroidogênico é dependente do número e tamanho das células luteais, os quais aumentam durante o desenvolvimento luteal e a habilidade em responder ao LH aumenta durante o

desenvolvimento da fase luteal, o que pode ter sido mais lento nos grupos aspirados, além de uma suposta alteração na perfusão sanguínea devido à manipulação do ovário e procedimento de aspiração, uma vez que o desenvolvimento normal do CL e sua capacidade de produzir progesterona são dependentes do suprimento sanguíneo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

Na análise do intervalo entre aspiração e concentrações plasmáticas de progesterona $>2\text{ng/mL}$, o intervalo do grupo controle ($1,6\pm 0,4$ dias) se mostrou semelhante somente ao intervalo do grupo F pré-ovulatório ($4,0\pm 0,4$) e menor do que os demais, o que quer dizer que os grupos F $\geq 25\text{mm}$ ($6,2\pm 1,1$), F $\geq 30\text{mm}$ ($7,3\pm 0,5$) e F $\geq 35\text{mm}$ ($5,4\pm 0,6$) demoraram mais tempo para atingir a concentração $>2\text{ng/mL}$ de progesterona. O intervalo do grupo F $\geq 30\text{mm}$ mesmo demorando mais para alcançar as concentrações ideais de progesterona, não foi estatisticamente diferente do intervalo dos demais grupos. Segundo Ginther et al. (2006), a progesterona de éguas ovuladas espontaneamente foi de $2,1\pm 0,3\text{ng/mL}$ no D1 e Ginther et al. (2007b), encontraram valores $\geq 2\text{ng/mL}$ de progesterona entre os dias 1 e 2, resultado semelhante ao encontrado no grupo controle do presente trabalho. Essa variação da concentração de progesterona pode ser influenciada pelo intervalo de tempo entre a ovulação e a colheita de sangue, o que pode ter influenciado nos resultados encontrados no presente estudo, pois as aspirações foram realizadas em horários diferentes e a colheita de sangue foi realizada todos os dias no período da manhã.

Ginther et al. (2006), definem luteólise quando as concentrações de progesterona estão abaixo de 2ng/mL , o que aconteceu no dia $16\pm 0,7$, porém, segundo os autores, analisando-se o perfil da progesterona, o início da luteólise começa dois dias antes, o que seria dia 14. Na análise da aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$ deste trabalho, não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os grupos, variando entre $16,0\pm 0,5$ e $19,0\pm 1,4$ dias, porém o grupo controle sofreu luteólise no dia $13,6\pm 0,7$. Esse atraso da luteólise entre o grupo controle e os grupos aspirados, pode ser devido ao aumento inicial mais lento nas concentrações de progesterona, o que consequentemente levou a luteólise a demorar mais tempo para ocorrer.

No intervalo entre a aspiração e a ovulação subsequente também não houve diferença estatística entre os grupos, variando entre $17,2\pm 2,8$ e $23,0\pm 3,5$ dias, sendo que o grupo F $\geq 30\text{mm}$ o que teve o menor intervalo devido a ovulação de diestro que ocorreu em uma égua e a duas éguas que não atingiram a concentração de 2ng/mL após a aspiração e ovularam rapidamente. Segundo Ginther et al. (2006), o comprimento do intervalo

interovulatório em éguas ciclando naturalmente foi $23,7 \pm 0,6$ dias, o que é compatível com os resultados encontrados tanto para os grupos tratados quanto para o grupo controle.

O tempo que o grupo controle levou para atingir concentração máxima de progesterona ($18,4 \pm 4,3$ ng/mL) foi semelhante ao dos grupos F pré-ovulatório ($10,9 \pm 1,8$) e F ≥ 35 mm ($8,3 \pm 1,8$), e maior do que F ≥ 30 mm ($6,4 \pm 2,6$) e F ≥ 25 mm ($8,1 \pm 2,2$), mas não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos aspirados. Segundo Nagy et al. (2004), as concentrações de progesterona plasmática são maiores após múltiplas ovulações quando comparadas a ovulações simples. Neste experimento, as maiores concentrações de progesterona foram de éguas que tiveram dois ou três folículos aspirados, assim como em éguas do grupo controle que tiveram mais do que uma ovulação. O grupo F ≥ 30 mm foi o único que não teve co-dominância, portanto somente um folículo foi aspirado em cada égua e apresentou as menores médias de progesterona plasmática.

Na análise da variável dia da progesterona máxima, não houve diferença estatística entre os grupos, variando de $8,7 \pm 3,4$ a $11,5 \pm 1,2$ dias. Segundo Ginther et al. (2007a), o desenvolvimento completo do CL, indicado pelas concentrações máximas de progesterona ($12,8$ ng/mL), ocorreu no dia 8. LeBlanc (2003), relata que as maiores concentrações de progesterona (8 a 20 ng/mL) são atingidas entre os dias 5 e 8 pós-ovulação mantendo-se altas até o início da luteólise ao redor dos dias 14 e 15. Já Ginther et al. (2006), relataram que concentrações máximas foram alcançadas no dia 6, e diminuíram em torno de 37% entre o dia 6 e o início da luteólise no dia 14. O presente estudo se mostrou semelhante aos resultados encontrados na literatura.

Em relação à resposta hormonal à aspiração folicular, somente quatro éguas não atingiram as concentrações de 2 ng/mL de progesterona, sendo uma do grupo F ≥ 25 mm, duas do F ≥ 30 mm e uma do F ≥ 35 mm. Os grupos F ≥ 25 mm e F ≥ 35 mm tiveram 83,3% de resposta positiva, o F ≥ 30 mm teve a menor resposta que foi 66,7% e o grupo F pré-ovulatório apresentou 100%, portanto, no total 83,33% das éguas responderam hormonalmente a aspiração folicular e 16,66% não responderam. Esses dados foram semelhantes aos encontrados por Hayna et al. (2004), onde os resultados variaram entre 80% (aspiração de folículos entre 31 e 34mm) e 100% (aspiração de folículos entre 26 e 30mm).

Hayna et al. (2006), observaram que a aspiração de folículos < 25 mm não levou a formação de tecido luteal e que a aspiração de folículos > 25 mm produziu uma onda de LH a qual não é diferente do aumento observado no LH, um a dois dias após ovulações espontâneas, resultado semelhante ao encontrado por Gastal et al. (1999), onde

demonstraram um aumento no LH após a aspiração do maior folículo no início do desvio folicular. No presente estudo, não foi dosado LH, porém sabe-se que folículos a partir da divergência folicular passam a ser dependentes do LH para crescimento, maturação e ovulação (GASTAL et al., 1999), o que pode explicar a ausência de estrutura luteal após a aspiração folicular em alguns folículos dos grupos $F \geq 25\text{mm}$, $F \geq 30\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$, pelas células da granulosa não terem adquirido a capacidade de responder ao LH devido à expressão de receptores para LH ser observada nos estágios finais do desenvolvimento folicular e talvez por terem sido aspirados antes da completa maturação folicular.

Através do exame ultrassonográfico, pôde-se observar em muitos casos, estruturas semelhantes a um CL no dia seguinte após a aspiração, o que não foi compatível com a produção de progesterona plasmática nesse dia. Quando comparada a resposta à aspiração folicular com a presença de estrutura lútea, os grupos $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 30\text{mm}$ não foram compatíveis, pois no $F \geq 25\text{mm}$ a presença da estrutura foi de 66,7% e no $F \geq 30\text{mm}$ foi de 50%. Dessa forma, a ultrassonografia não deve ser utilizada como único parâmetro para avaliação de uma receptora antes de uma transferência de embrião, devendo-se avaliar também o tônus do útero e da cérvix, assim como deve-se observar a ausência de fluido e dobras endometriais.

Segundo Carnevale et al. (2000), éguas com excelente tônus uterino e cervical ou que foram consideradas aceitáveis durante o exame pré-transferência, tiveram melhores taxas de prenhez e menores perdas embrionárias do que receptoras consideradas médias ou com tônus uterino ruim. Em outro estudo realizado por McCue et al. (1999), concentrações de progesterona sérica foram comparadas entre éguas, 5 dias após a ovulação, relatando que houve uma correlação entre éguas com tônus uterino e/ou cervical reduzidos e baixa concentração de progesterona.

Durante o diestro, o CL pode ser visto através da ultrassonografia devido a sua intensa ecogenicidade contendo ou não um coágulo não ecogênico central. O desenvolvimento dessa área de fluido central não altera o comprimento do intervalo interovulatório, não é peculiaridade de algumas éguas ou de certo período ovulatório e não são funcionalmente importantes, pois são encontrados em 50% de todos os corpos lúteos, tampouco alteram o tempo de visualização ultrassonográfica durante o período interovulatório. A extensão das rupturas dos componentes vasculares na parede folicular durante a ovulação é que determina, ao acaso, a formação ou não do coágulo central. Não existem diferenças significativas nos níveis de progesterona produzida por corpos lúteos com centro não-ecogênico ou ecogênico (GINTHER & PIERSON, 1984; PIERSON &

GINTHER, 1985). Segundo Tom et al. (1998), o CL bovino pode apresentar dois tipos morfológicos distintos, os cavitários e os não cavitários, não havendo nenhuma diferença funcional entre eles. Kito et al. (1986) não encontraram diferenças nos níveis de progesterona para as fêmeas que apresentavam ou não as cavidades luteínicas e sugeriram que estas cavidades não causam nenhum efeito sobre a fertilidade. Assim como encontrado na literatura, dos folículos aspirados no presente trabalho, alguns formaram estruturas cavitárias e outros não, e aparentemente não interferiram na produção de progesterona.

Dessa forma, este estudo demonstra que a aspiração de folículos ≥ 25 mm leva à formação de uma estrutura luteinizada capaz de produzir progesterona em níveis compatíveis com o diestro dentro de sete dias após a aspiração, resultado semelhante aos publicados anteriormente (HINRICHS et al., 1991; HAYNA et al., 2004, 2006).

7. CONCLUSÕES

A aspiração de folículos ovarianos $\geq 25\text{mm}$ permite que as células foliculares se transformem em tecido luteal ativo produtor de progesterona, alcançando concentrações compatíveis com o diestro, no entanto, estudos são necessários para esclarecer se essas éguas podem ser utilizadas como receptoras de embrião, assim como em que dias o embrião pode ser inovulado.

A ausência de tecido luteal observada pela ultrassonografia não está necessariamente relacionada à baixa produção de progesterona.

8. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.637-642, 2004.

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.127-140, 2004.

AL-ZI'ABI, M.O.; WATSON, E.D.; FRASER, H.M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v.125, p.259-270, 2003.

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.233-239, 2001.

BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v.132, p.265-377, 2006.

BELIN, F.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1335-1343, 2000.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovulation and corpus luteum development. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. Hardcover: Saunders Elsevier, 2007. p.1-13.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.39, p.781-796, 1993.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.57, p.2129-38, 2002.

BRUEMMER, J.E.; SLOUGH, T.; CARNEVALE, E.M.; NISWENDER, G.D. Temporal in vivo gene expression in the developing and regressing equine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.94, p. 226-227, 2006.

CARNEIRO, G.F.; MUNRO, C.J.; LEUTENEGGER, C.M.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A.; LIU, I.K.M. Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vitro maturation of equine oocytes during follicular growth. **Theriogenology**, v.58, p.685-688, 2000.

CARNEVALE, E.M.; CHECURA, C.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Use of computer-assisted image analysis to determine the interval before and after ovulation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v.48, p.48-50, 2002.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

CHRISTENSON, L.K.; DEVOTO, L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-9, 2003.

DAVIES MOREL, M.C.G.; O'SULLIVAN, J.A.M. Ovulation rate and distribution in the thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.59-70, 2001.

DIEKMAN, M.A.; O'CALLAGHAN, P.O.; NETT, T.M.; NISWENDER, G.D. Validation of methods and quantification of luteal receptors for LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v.19, p.999-1009, 1978.

FERREIRA-DIAS, G.; BRAVO, P.P.; MATEUS, L.; REDMER, D.A.; MEDEIROS, J.A. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.30, p.247-259, 2006a.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A.S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; REDMER, D.A.; SKARZYNSKI, D.J. Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.57, suppl. 8, p.139-151, 2006b.

FRASER, H.M.; ABBOTT, M.; LAIRD, N.C. Effects of LH-releasing hormone antagonist on the secretion of LH, FSH, prolactin and ovarian steroids at different stages of the luteal phase in the stumptailed macaque (*Macaca arctoides*). **Journal of Endocrinology**, v.111, n.1, p.83-90, 1986.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1320-1327, 1997.

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.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 1025-1038, 1998.

GINTHER, O.J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. **Proceedings American Association Equine Practice**, v.44, p.73-104, 1998.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**. Cross Plaines: Equiservices Publishing, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.18-25, 1993.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction**: horses. Cross Plaines: Equiservices Publishing, 1995. 255p.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**, v.21, p.471-483, 1984.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v.1, p.45-63, 2004a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BERGFELT, D.R.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1195-1201, 2004b.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v.73, p.315-323, 2005.

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.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v.95, p. 144-150, 2006.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Effect of prostaglandin F_{2α} on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.315-328, 2007a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p. 213-220, 2007b.

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L.; FERREIRA, J.C.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.684-693, 2008.

GRASSELLI, F.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.362-368, 2002.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: _____. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004. p.69-82.

HAYNA, J.T.; MADILL, S.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of transvaginal follicular aspiration on corpus luteum formation in mares. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6., 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 2004. p.35.

HAYNA, J.T.; MADILL, S.; ROSER, J.F.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.355-356, 2006.

HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. **Biology of Reproduction**, v.44, p.292-298, 1991.

HIRANO, Y.; KIMURA, J.; NAMBO, Y.; YOKOTA, H.; NAKAMURA, S.; TAKEMOTO, S.; HIMENO, R.; MISHIMA, T.; MATSUI, M.; MIYAKE, Y.-I. Population of follicles and luteal structures during the oestrous cycle of mares detected by three-dimensional internal structure microscopy. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.38, p.214-218, 2009.

KÄHN, W. **Veterinary reproductive ultrasonography**. 2.ed. London: Mosby-Wolfe, 1994. 256p.

KANITZ, W.; SCHNEIDER, F.; HOPPEN, H-O.; UNGER, C.; NÜRNBERG, G.; BECKER, F. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.55-62, 2006.

KITO, S.; OKUDA, K.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Study on the appearance of the cavity in corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. **Theriogenology**, v.25, p.325-333, 1986.

KNICKERBOCKER, J.J.; WILTBANK, M.C.; NISWENDER, G.D. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. **Domestic Animal Endocrinology**, v.5, p.91-107, 1988.

LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. **Equine Veterinary Journal**, v.15 (Suppl), p.107-111, 1997.

LeBLANC, M. Equine stud farm medicine and surgery. In: KNOTTENBELT, D.C. (Ed.). **The mare**. Hardcover: Saunders, 2003. p.124.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v.79, p.263-304, 1999.

McCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; KEITH, S.L.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology**, v.5, p.267, 1999 (Abstract).

McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febizer, 1993. 1137p.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; HERMENET, M.J. Ovariectomized, steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology**, v.29, p.1055-1063, 1988.

NAGY, P.; HUSZENICZA, G.; REICZIGEL, J.; JUHÁSZ, J.; KULCSÁR, M.; ABAVÁRY, K.; GUILLAUME, D. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. **Theriogenology**, v.61, p.203-14, 2004.

NIE, G.J.; JOHNSON, K.E.; WENZEL, J.G.W.; BRADEN, T.D. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. **Theriogenology**, v.60, p.1111-1118, 2003.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v.123, p.333-339, 2002.

NISWENDER, D.; NETT, T.M. Luteal phase. In: VOSS, J.L.; McKINNON, A.O. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.172-175.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; McINTUSH, E.W. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v.80, p.1-29, 2000.

NISWENDER, G.D.; REIMERS, T.J.; DIEKMAN, M.A.; NETT, T.M. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of Reproduction**, v.14, p.64-81, 1976.

PINTO, C.R.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; SHORT, C.R.; GODKE, R.A. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovulation in hCG-stimulated mares. **Theriogenology**, v.58, p.1017-1026, 2002.

PIERSON, R.A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Malvern: Williams & Wilkins, 1992. p.172-175.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, v.23, p.795-806, 1985.

RAO, C.V.; GRIFFIN, L.P.; CARMAN, F.R. Gonadotropin receptors in human corpora lutea of the menstrual cycle and pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.128, p.146-153, 1977.

ROBERTO DA COSTA, R.P.; COSTA, A.S.; KORZEKWA, A.J.; PLATEK, R.; SIEMIENIUCH, M.; GALVÃO, A.; REDMER, D.A.; SILVA, J.R.; SKARZYNSKI, D.J.; FERREIRA-DIAS, G. Actions of a nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.674-683, 2008.

ROBERTO DA COSTA, R.P.; FERREIRA-DIAS, G.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; ANDRONOWSKA, A.; PLATEK, R.; SKARZYNSKI, D.J. Endometrial nitric oxide production and nitric oxide synthases in the equine endometrium: relationship with microvascular density during the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.287-302, 2007.

ROSER, J.F.; EVANS, J.W. Luteal luteinizing hormone receptors during the postovulatory period in the mare. **Biology of Reproduction**, v.29, p.499-510, 1983.

SAMPER, J.C. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v.70, p.445-447, 2008.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – An overview. **Reproduction Domestic Animal**, v.39, p.241-251, 2004.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2.ed. Washington: Current Conceptions Inc., 2003. 368p.

SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal Animal Science**, v.72, p.1857-1872, 1994.

SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.91-104, 1999.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

STOCCO, C.; TELLERIA, C; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v.28, p.117-149, 2007.

STOUT, T.A.E.; LAMMING, G.E.; ALLEN, W.R. Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.315-320, 1999.

TETZKE, T.A.; ISMAIL, S.; MIKUCKIS, G.; EVANS, J.W. Patterns of oxytocin secretion during the oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.35, p.245-252, 1987.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v.49, p.1345-1352, 1998.

TOWNSON, D.H.; GINTHER, O.J. Duration and pattern of follicular evacuation during ovulation in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.15, p.131-138, 1987.

TOWNSON, D.H.; GINTHER, O.J. Ultrasonic characterization of follicular evacuation during ovulation and fate of the discharged follicular fluid in mares. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.131-141, 1989a.

TOWNSON, D.H.; GINTHER, O.J. Ultrasonic echogenicity of developing corpora lutea in pony mares. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.143-153, 1989b.

TROEDSSON, M.H.T.; ABABNEH, M.M.; OHLGREN, A.F.; MADILL, S.; VETSCHER, N.; GREGAS, M. Effect of periovulatory prostaglandin $F_{2\alpha}$ on pregnancy rates and luteal function in the mare. **Theriogenology**, v.55, p.1891-1899, 2001.

UTT, M.D.; ACOSTA, T.J.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Acute effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on systemic oxytocin and progesterone concentrations during the mid- or late-luteal phase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.63-73, 2007.

VANDERWALL, D.K.; SILVIA, W.J.; FITZGERALD, B.P. Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13,4-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2α}. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.337-346, 1998.

VAN NIEKERK, C.H.; MORGENTHAL, J.C.; GERNEKE, W.H. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.23, p.171-175, 1975.

WATSON, E.D.; BUCKINGHAM, J.; BJÖRKSTÉN, T.S. Immunolocalisation of oxytocin in the equine ovary. **Equine Veterinary Journal**, v.31, p.174-175, 1999.

WATSON, E.D.; PEDERSEN, H.G.; THOMSON, S.R.M.; FRASER, H.M. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. **Theriogenology**, v.54, p.599-609, 2000.

ZIECIK, A.; SHAW, H.J.; FLINT, A.P.F. Luteal LH receptors during the oestrous cycle and early pregnancy in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.60, p.129-137, 1980.

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista “Veterinária e Zootecnia” (normas de publicação especificadas no Anexo 1).

EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA PLASMÁTICA EM ÉGUAS CÍCLICAS

Daniela Fernandez Montechiesi¹
Fernanda Saules Ignácio¹
Cássia Maria Barroso Orlandi¹
José Nicolau Prospero Puoli Filho²
Lídia Raquel de Carvalho³
Cezinande de Meira⁴

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da aspiração de folículos $\geq 25\text{mm}$ sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas. O crescimento folicular foi acompanhado diariamente e um único folículo ovariano foi aspirado, exceto quando uma co-dominância foi observada. Neste caso, ambos os folículos foram aspirados no mesmo momento quando atingiram o diâmetro esperado nos respectivos grupos: F $\geq 25\text{mm}$ (n = 6), F $\geq 30\text{mm}$ (n = 6), F $\geq 35\text{mm}$ (n = 6), F pré-ovulatório (n = 6). O Grupo controle (n = 5) não foi submetido à aspiração, acompanhando-se as ovulações espontâneas. A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada a cada 24 horas iniciando-se 48 horas antes da aspiração folicular (D0 = dia da aspiração), continuando até a ovulação subsequente. A concentração de progesterona foi $>2\text{ng/mL}$, entre os dias $4,0 \pm 0,4$ e $7,3 \pm 0,5$ após a aspiração. O intervalo entre a aspiração e a luteólise foi de $16,0 \pm 0,5$ a $19,0 \pm 1,4$ dias e entre a aspiração e a ovulação foi de $17,2 \pm 2,8$ a $23 \pm 0,5$ dias. A concentração máxima de progesterona alcançada variou entre $6,4 \pm 2,6$ e $10,9 \pm 1,8\text{ng/mL}$ e ocorreu entre os dias $8,7 \pm 3,4$ e $11,5 \pm 1,2$. A aspiração folicular em todos os grupos permitiu que as células foliculares se transformassem em estrutura hormonalmente ativa, produtora de progesterona em níveis compatíveis com o diestro.

¹ Pós-graduanda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – SP. E-mail: dani.montechiesi@terra.com.br, nandasauls@gmail.com, caorlandi@hotmail.com

² Docente do Departamento de Produção e Exploração Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu. Rubião Junior, Cep 18618000 - Botucatu, SP - Caixa-Postal: 560

³ Docente do Instituto de Biociências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – SP. E-mail: lidiarc@fmvz.unesp.br

⁴ Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – SP. E-mail: meira@fmvz.unesp.br

FOLLICULAR ABLATION EFFECT ON PLASMATIC PROGESTERONE CONCENTRATION IN CYCLING MARES

ABSTRACT

The present study aims to verify the follicles ≥ 25 mm ablation effect on plasmatic progesterone concentration in mares. Follicular growth was daily accompanied and only one follicle was ablated, excepted when codominance was observed. At this case, both follicles were ablated at the same moment when achieved the expected diameter for the following groups: F ≥ 25 mm (n = 6), F ≥ 30 mm (n = 6), F ≥ 35 mm (n = 6), F pre-ovulatory (n = 6). Control group (n = 5) was not submitted by ablation and the spontaneous ovulations were followed. Ultrasound evaluation of the ovaries was done every 24h beginning 48h after follicular ablations (D0 = day of ablation), continuing until subsequent ovulation. Interval between aspiration and luteolysis varied from $16,0 \pm 0,5$ to $19,0 \pm 1,4$ days and between ablation and next ovulation varied from $17,2 \pm 2,8$ to $23 \pm 0,5$ days. Maximum concentration of progesterone varied from $6,4 \pm 2,6$ and $10,9 \pm 1,8$ ng/mL and occurred between days $8,7 \pm 3,4$ and $11,5 \pm 1,2$. In all groups, follicular ablation allowed follicular cells to become an active hormonal structure, which produced progesterone in concentrations similar to diestrous.

Key-words: follicular ablation; corpus luteum; mares; progesterone; ultrasonographic.

EFEECTO DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR EN LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PROGESTERONA EN YEGUAS CÍCLICAS

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la aspiración de folículos $\geq 25\text{mm}$ en la concentración plasmática de progesterona en yeguas. El crecimiento folicular se vigila día y un solo folículo ovárico fue aspirado, excepto cuando un compañero de posición dominante se observó. En este caso, tanto los folículos fueron aspirados, al mismo tiempo, cuando llegaron a la espera de diámetro en sus grupos: F $\geq 25\text{mm}$ (n = 6), F $\geq 30\text{mm}$ (n = 6), F $\geq 3\text{ mm}$ (n = 6), F pre-ovulatoria (n = 6). El grupo control (n = 5) no se presentó a la aspiración, sufriendo ovulación espontánea. La evaluación de ultrasonido de los ovarios se realizó cada 24 horas puesta en marcha de 48 horas antes de la aspiración folicular (D0 = día de la aspiración), continuando hasta la posterior ovulación. La concentración de progesterona fue $>2\text{ng/mL}$, entre los días $4,0\pm 0,4$ y $7,3\pm 0,5$ después de la aspiración. El intervalo entre las aspiraciones y luteólisis fue $16,0\pm 0,5$ a $19,0\pm 1,4$ días y entre la aspiración y la ovulación fue de $17,2\pm 2,8$ a $23\pm 0,5$ días. La concentración máxima de progesterona alcanzada varió de $6,4\pm 2,6$ y $10,9\pm 1,8$ ng/mL y produjo entre los días $8,7\pm 3,4$ y $11,5\pm 1,2$. La aspiración folicular en todos los grupos permitió a los de las células foliculares de inflexión en la estructura hormonalmente activos, la producción de progesterona en niveles compatibles con el diestro.

Palabras-clave: aspiración folicular, cuerpo luteo, yeguas, progesterona, ultrasonido.

INTRODUÇÃO

O sucesso de um programa de transferência de embriões depende de vários fatores, dentre eles, a utilização de éguas receptoras com boa condição uterina e capazes de produzir progesterona pelos corpos lúteos em quantidades adequadas no primeiro terço da gestação. O manejo das éguas receptoras é provavelmente um dos fatores mais críticos que afeta as taxas de prenhez por necessitar da sincronização entre doadoras e receptoras, uma grande quantidade de receptoras é necessária para assegurar uma sincronização segura. Porém, essa condição, além de ser cara, consome tempo. Métodos alternativos que facilitam as técnicas de manejo têm sido descritos, como o uso de hormônios para induzir o estro e a ovulação, associação de estrógeno e progesterona para manutenção da gestação em receptoras acíclicas (1), assim como em éguas ovariectomizadas (2).

A aspiração transvaginal de folículos com diâmetro $\geq 25\text{mm}$ visando originar uma estrutura luteinizada capaz de produzir progesterona em concentrações compatíveis com o período de diestro, pode ser uma alternativa como um método para a preparação de receptoras de embriões (3, 4) por ser prático e minimamente invasivo. A aspiração de folículos maduros em éguas cíclicas pode resultar na formação de tecido luteal (5), no entanto são necessários estudos que caracterizem o tempo necessário para o início do diestro (concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$), o intervalo entre a aspiração e o início da luteólise, assim como da aspiração à ovulação, a concentração máxima de progesterona atingida durante o ciclo e o dia da detecção da concentração máxima de progesterona, o que é o objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 29 ciclos estrais de 15 éguas mestiças, com idade entre quatro e 15 anos, peso entre 350 e 500kg, com histórico de atividade reprodutiva normal. Os animais foram mantidos em piquetes no Posto de Monta da Fazenda Lageado UNESP, Botucatu-SP (Latitude -22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"), sendo alimentados com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) duas vezes ao dia, ração comercial, suplementadas com sal mineral e com acesso livre a água.

Grupos experimentais

Cinco dias após a ovulação, as éguas foram avaliadas pelo ultrassom transretal modelo Aloka SSD500 com transdutor linear de 5MHz para determinar o diâmetro dos três maiores folículos e a presença de corpo lúteo. Em seguida, as éguas receberam 7,5mg de Dinoprost-trometamina (PGF_{2α} – lutalyse – Pfizer), sendo distribuídas aleatoriamente em cinco grupos. Um único folículo ovariano foi aspirado, exceto quando uma co-dominância (diferença de 3mm entre eles) foi observada. Neste caso, ambos os folículos foram aspirados no mesmo momento quando atingiram o diâmetro esperado nos respectivos grupos: Grupo F ≥25mm, folículo ≥25mm (n = 6); Grupo F ≥30mm, folículo ≥30mm (n = 6); Grupo F ≥35mm, folículo ≥35mm (n = 6). O Grupo F pré-ovulatório (n = 6) foi submetido à aspiração do folículo pré-ovulatório de acordo com a detecção das características ultrassonográficas, como diâmetro >35mm, mudança na forma de esférico para irregular, espessamento da parede folicular, formação da parede dupla com aumento

na ecogenicidade da camada granulosa tornando-a mais evidente. No grupo controle (n = 5), o folículo não foi submetido à aspiração, acompanhando-se as ovulações espontâneas (6).

Aspiração folicular

As éguas foram sedadas com 0,5mg/kg, IV de Xilazina a 10% (Sedazine[®] – Fortdodge) e 0,03mg/kg, IV Acepromazina (Acepran[®] - Vetnil). Para a obtenção do relaxamento retal foi utilizado 0,2mg/kg, IV de Hyoscina N-butyl bromide (Butylscopolamina – Sigma Pharma). Um folículo ou eventualmente dois, em caso de co-dominância, foram aspirados utilizando-se monitor com transdutor convexo de 5MHz (Pie Medical modelo 240) com guia transvaginal contendo uma agulha de 18G (WTA Ltda), conectada a um sistema de vácuo, com pressão entre 180-200mmHg. A aspiração folicular foi iniciada a partir do momento em que se observou a ponta da agulha no antro folicular, por meio de pressão negativa. Objetivando evitar o reenchimento do folículo com fluido folicular, foram realizadas três perfurações na parede de cada folículo aspirado.

Avaliação ultrassonográfica

A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada a cada 24 horas iniciando-se 48 horas antes da aspiração folicular, continuando até a ovulação subsequente. A mensuração do diâmetro folicular foi realizada através de exame ultrassonográfico (média dos valores referentes à largura e altura dos folículos em imagens congeladas). Quando o maior folículo atingiu diâmetro $\geq 25\text{mm}$, $\geq 30\text{mm}$, $\geq 35\text{mm}$ e pré-ovulatório este foi aspirado (D0 = dia da aspiração folicular ou ovulação no grupo controle). Após a aspiração, a

luteinização da estrutura originada foi caracterizada através dos aspectos ultrassonográficos, como ecogenicidade durante o desenvolvimento, formação de uma estrutura semelhante a um folículo hemorrágico, presença ou ausência de coágulo não ecogênico central (7).

Colheita de sangue e ensaio hormonal

A colheita de sangue foi realizada por meio de punção da veia jugular em tubos vacutainer heparinizados, a cada 24 horas iniciando-se 48 horas antes da aspiração folicular continuando até a ovulação subsequente. O sangue foi centrifugado imediatamente após colheita a 3000rpm por 5 minutos sendo o plasma removido e armazenado a -20°C até a realização da análise hormonal.

A concentração plasmática de progesterona foi determinada por radioimunoensaio (RIA) utilizando-se kits comerciais Coat-a-Count, DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Para determinar a precisão de cada ensaio foi utilizado um pool de plasmas, o qual foi repetido por três vezes e em duplicata no mesmo ensaio. O erro intra ensaio e inter ensaio foi de 7,6% e 8,3%, respectivamente.

Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância de perfil seguida do método de Tukey com nível de significância de 5% para todas as variáveis, exceto: (1) animais que responderam à

aspiração folicular atingindo concentrações de 2ng/mL de progesterona; (2) presença ou ausência de estrutura lútea visualizada pela ultrassonografia, o qual foi utilizado o teste do qui-quadrado.

O início do diestro foi caracterizado pela concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e a luteólise quando os níveis foram $<2\text{ng/mL}$ (8). Dessa forma, os animais que não atingiram as concentrações de 2ng/mL de progesterona, foram excluídos da análise aspiração à concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e aspiração à concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$.

RESULTADOS

Quando comparadas as médias das concentrações plasmáticas de progesterona entre dias, os grupos $F \geq 25\text{mm}$, $F \geq 30\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$ não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$). No grupo F pré-ovulatório, os dias 4, 7, 10, 13 e 16 foram semelhantes estatisticamente ($P>0,05$). No entanto, o D1 foi semelhante ($P>0,05$) ao D4 e D16. No controle, o D1 foi maior ($P<0,05$) do que o D16 e ambos foram diferentes estatisticamente dos demais dias ($P<0,05$). Os dias 4, 7, 10 e 13 foram semelhantes ($P>0,05$), como demonstrado na Tabela 1. Quando comparadas as médias entre grupos, não houve diferença estatística ($P>0,05$), exceto no D4 e D7 onde o grupo controle foi maior ($P<0,05$) do que os demais grupos (Tabela 1).

Uma égua do grupo $F \geq 30\text{mm}$ apresentou uma ovulação de diestro 10 dias após a aspiração folicular e a colheita de sangue foi interrompida neste dia. Esse animal entrou para a análise de dados aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e foi excluído da aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$ (Tabela 2). Duas éguas do grupo $F \geq 30\text{mm}$ não atingiram as concentrações de 2ng/mL de progesterona

após a aspiração folicular e ovularam 12 e 10 dias após a aspiração folicular, respectivamente, portanto foram excluídas das análises aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$ (Tabela 2). Uma égua do $F \geq 25\text{mm}$ e uma do $F \geq 35\text{mm}$ não atingiram as concentrações de 2ng/mL de progesterona após a aspiração folicular e ovularam 11 e 7 dias, respectivamente, após a aspiração folicular. Esses animais, portanto, foram excluídos das análises aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$ e aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$ (Tabela 2).

Quanto ao intervalo de dias entre aspiração ou ovulação e concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$, que indica o início do diestro, o grupo controle foi igual ($P>0,05$) ao grupo F pré-ovulatório e menor ($P<0,05$) do que os demais. O grupo F pré-ovulatório foi semelhante ($P>0,05$) ao $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$, e menor ($P<0,05$) do que $F \geq 30\text{mm}$ que foi semelhante a $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 35\text{mm}$ (Tabela 2).

Analisando-se o período entre aspiração ou ovulação e concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$, aspiração ou ovulação e ovulação (Tabela 2) e dia da concentração máxima de progesterona (Tabela 3) não houve diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).

Na concentração máxima de progesterona (Tabela 3), o grupo controle foi igual ($P>0,05$) ao grupo F pré-ovulatório e $F \geq 35\text{mm}$, as quais foram maiores ($P<0,05$) do que $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 30\text{mm}$, porém não houve diferença estatística entre os grupos aspirados.

A porcentagem de animais que atingiram as concentrações de 2ng/mL de progesterona, assim como os animais que formaram uma estrutura semelhante a um CL, está demonstrada na tabela 4.

Pela imagem ultrassonográfica, no grupo $F \geq 25\text{mm}$, três éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea, uma formou uma estrutura semelhante a um folículo

hemorrágico, uma formou uma estrutura hiperecogênica cavitária e uma formou uma pequena estrutura hiperecogênica, sendo que esta não alcançou a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$. No grupo F $\geq 30\text{mm}$, duas éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea, uma formou uma estrutura semelhante a um folículo hemorrágico, uma formou uma estrutura hiperecogênica cavitária, duas formaram uma pequena estrutura anecogênica com coágulo central hiperecogênico, sendo que estas duas não alcançaram a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$. No grupo F $\geq 35\text{mm}$, três éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea, duas formaram uma pequena estrutura anecogênica com coágulo central hiperecogênico, uma formou uma estrutura hiperecogênica cavitária, sendo que esta não alcançou a concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$. No grupo F pré-ovulatório, três éguas formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea e três formaram uma estrutura hiperecogênica cavitária. Portanto, de 24 éguas que sofreram a aspiração folicular, 20 responderam a aspiração (concentração de progesterona $>2\text{ng/mL}$) e quatro não responderam dentro de sete dias após a aspiração.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que a aspiração de folículos ovarianos $\geq 25\text{mm}$ em éguas leva à formação de uma estrutura luteinizada produtora de progesterona, a qual atinge concentrações compatíveis com o período do diestro ($>2\text{ng/mL}$) entre os dias 4 e 7 após a aspiração. No grupo F pré-ovulatório, observou-se as mesmas concentrações entre os dias 1 e 4. Porém, nos demais grupos a concentração de progesterona foi similar ao controle no D10. Em trabalho realizado por Hayna et al. (4), concentrações elevadas de progesterona sérica foram detectadas 5 dias após a aspiração, porém, no referido estudo, tecido luteal foi considerado presente quando as concentrações de progesterona foram $>1\text{ng/mL}$, assim

como em outro estudo realizado por Hayna et al. (3) onde 80% das éguas alcançaram estas concentrações de progesterona plasmática no D5 e os 20% restantes no D8. Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos estudos citados.

Diferentes concentrações de progesterona plasmática durante o ciclo estral em éguas têm sido relatadas. Entre os dias 1 e 2, a progesterona aumentou de $2,1 \pm 0,3$ a $4,8 \pm 0,5$ ng/mL (9). Outros autores encontraram níveis significativamente mais baixos ($\leq 2,16$ ng/mL) até o terceiro dia após a ovulação, a partir do qual a produção de progesterona se elevou e se manteve relativamente constante ($3,41$ a $4,33$ ng/mL) até o último dia (D9) de observação (10).

Comparando-se as concentrações de progesterona alcançadas nos grupos aspirados neste experimento, com as dosagens encontradas na literatura dentro de 48h, os grupos aspirados tenderam a demorar mais para chegar a níveis semelhantes de progesterona. Os resultados do presente trabalho foram similares aos previamente publicados que envolveram a aspiração folicular (3, 4, 5). As concentrações séricas de progesterona dependem da quantidade de tecido esteroideogênico, perfusão sanguínea e capacidade do tecido esteroideogênico em sintetizar progesterona. A quantidade de tecido esteroideogênico é dependente do número e tamanho das células luteais, as quais aumentam durante o desenvolvimento luteal e a habilidade em responder ao LH aumenta durante o desenvolvimento da fase luteal (11), o que pode ter sido mais lento nos grupos aspirados, além de uma suposta alteração na perfusão sanguínea devido à manipulação do ovário e procedimento de aspiração, uma vez que o desenvolvimento normal do CL e sua capacidade de produzir progesterona são dependentes do suprimento sanguíneo.

Na análise do intervalo entre aspiração ou ovulação e concentrações de progesterona >2 ng/mL, o grupo controle ($1,6 \pm 0,4$ dias) se mostrou igual estatisticamente somente ao grupo F pré-ovulatório ($4,0 \pm 0,4$) e menor do que os demais, o que quer dizer

que os grupos $F \geq 25\text{mm}$ ($6,2 \pm 1,1$), $F \geq 30\text{mm}$ ($7,3 \pm 0,5$) e $F \geq 35\text{mm}$ ($5,4 \pm 0,6$) demoraram mais tempo para atingir a concentração $>2\text{ng/mL}$ de progesterona. O grupo $F \geq 30\text{mm}$ mesmo demorando mais para alcançar as concentrações ideais de progesterona, não foi estatisticamente diferente dos demais grupos. A progesterona de éguas ovuladas espontaneamente foi de $2,1 \pm 0,3\text{ng/mL}$ no D1 (9) outros autores encontraram valores $\geq 2\text{ng/mL}$ de progesterona entre os dias 1 e 2 (12), resultado semelhante ao encontrado no grupo controle do presente trabalho. Essa variação da concentração de progesterona pode ser influenciada pelo intervalo de tempo entre a ovulação e a colheita de sangue, o que pode ter influenciado nos resultados encontrados no presente estudo, pois as aspirações foram realizadas em horários diferentes e a colheita de sangue foi realizada todos os dias no período da manhã.

Ginther et al. (9), definem luteólise quando as concentrações de progesterona estão abaixo de 2ng/mL , o que aconteceu no dia $16 \pm 0,7$. Na análise da aspiração ou ovulação a concentração de progesterona $<2\text{ng/mL}$ deste trabalho, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos, variando entre $16,0 \pm 0,5$ e $19,0 \pm 1,4$ dias, porém o grupo controle sofreu luteólise no dia $13,6 \pm 0,7$. Esse atraso da luteólise entre o grupo controle e os grupos aspirados, pode ser devido ao aumento inicial mais lento nas concentrações de progesterona, o que conseqüentemente levou a luteólise a demorar mais tempo para ocorrer.

Da aspiração ou ovulação a ovulação também não houve diferença estatística entre os grupos, variando entre $17,2 \pm 2,8$ e $23,0 \pm 3,5$ dias, sendo que o grupo $F \geq 30\text{mm}$ o que teve o menor intervalo devido a ovulação de diestro que ocorreu em uma égua e a duas éguas que não atingiram a concentração de 2ng/mL após a aspiração e ovularam rapidamente. Segundo Ginther et al. (9), o comprimento do intervalo interovulatório em

éguas ciclando naturalmente foi $23,7 \pm 0,6$ dias, o que é compatível com os resultados encontrados tanto para os grupos tratados quanto para o grupo controle.

O grupo controle atingiu concentração máxima de progesterona ($18,4 \pm 4,3$ ng/mL) semelhante estatisticamente aos grupos F pré-ovulatório ($10,9 \pm 1,8$) e F ≥ 35 mm ($8,3 \pm 1,8$), e maior do que F ≥ 30 mm ($6,4 \pm 2,6$) e F ≥ 25 mm ($8,1 \pm 2,2$), mas não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos aspirados. As concentrações de progesterona plasmática são maiores após múltiplas ovulações quando comparadas a ovulações simples (13). Neste experimento, as maiores concentrações de progesterona foram de éguas que tiveram dois ou três folículos aspirados, assim como em éguas do grupo controle que tiveram mais do que uma ovulação.

Na análise dia da progesterona máxima, não houve diferença estatística entre os grupos, variando de $8,7 \pm 3,4$ a $11,5 \pm 1,2$ dias. O desenvolvimento completo do CL, indicado pelas concentrações máximas de progesterona ($12,8$ ng/mL), ocorre no dia 8 (14). O presente estudo se mostrou semelhante aos resultados encontrados na literatura.

Hayna et al. (3), observaram que a aspiração de folículos < 25 mm não levou a formação de tecido luteal e que a aspiração de folículos > 25 mm produziu uma onda de LH a qual não é diferente do aumento observado no LH, um a dois dias após ovulações espontâneas, resultado semelhante ao encontrado por Gastal et al. (15), onde demonstraram um aumento no LH após a aspiração do maior folículo no início do desvio folicular. No presente estudo, não foi dosado LH, porém sabe-se que folículos a partir da divergência folicular passam a ser dependentes do LH para crescimento, maturação e ovulação (15), o que pode explicar a ausência de estrutura luteal após a aspiração folicular em alguns folículos dos grupos F ≥ 25 mm, F ≥ 30 mm e F ≥ 35 mm, pelas células da granulosa não terem adquirido a capacidade de responder ao LH devido à expressão de receptores para

LH ser observada nos estágios finais do desenvolvimento folicular e talvez por terem sido aspirados antes da completa maturação folicular.

Através do exame ultrassonográfico, pôde-se observar em muitos casos, estruturas semelhantes a um CL no dia seguinte após a aspiração, o que não foi compatível com a produção de progesterona plasmática nesse dia. Quando comparada a resposta à aspiração folicular com a presença de estrutura lútea, os grupos $F \geq 25\text{mm}$ e $F \geq 30\text{mm}$ não foram compatíveis, pois no $F \geq 25\text{mm}$ a presença da estrutura foi de 66,7% e no $F \geq 30\text{mm}$ foi de 50%. Dessa forma, a ultrassonografia não deve ser utilizada como único parâmetro para avaliação de uma receptora antes de uma transferência de embrião, devendo-se avaliar também o tônus do útero e da cérvix, assim como deve-se observar a ausência de fluido e dobras endometriais.

Éguas com excelente tônus uterino e cervical ou que foram consideradas aceitáveis durante o exame pré-transferência, tiveram melhores taxas de prenhez e menores perdas embrionárias do que receptoras consideradas médias ou com tônus uterino ruim (16). Concentrações de progesterona sérica foram comparadas entre éguas, 5 dias após a ovulação, relatando que houve uma correlação entre éguas com tônus uterino e/ou cervical reduzidos e baixa concentração de progesterona (17).

Durante o diestro, o CL pode ser visto através da ultrassonografia devido a sua intensa ecogenicidade contendo ou não um coágulo não ecogênico central. O desenvolvimento dessa área de fluido central não altera o comprimento do intervalo interovulatório, não é peculiaridade de algumas éguas ou de certo período ovulatório e não são funcionalmente importantes, pois são encontrados em 50% de todos os corpos lúteos, tampouco alteram o tempo de visualização ultrassonográfica durante o período interovulatório. A extensão das rupturas dos componentes vasculares na parede folicular durante a ovulação é que determina, ao acaso, a formação ou não do coágulo central. Não

existem diferenças significativas nos níveis de progesterona produzida por corpos lúteos com centro não-ecogênico ou ecogênico (18, 19).

Dessa forma, este estudo demonstra que a aspiração de folículos ≥ 25 mm leva à formação de uma estrutura luteinizada capaz de produzir progesterona em níveis compatíveis com o diestro dentro de sete dias após a aspiração, resultado semelhante aos publicados anteriormente (3, 4, 5).

CONCLUSÕES

A aspiração de folículos ovarianos ≥ 25 mm permite que as células foliculares se transformem em tecido luteal ativo produtor de progesterona, alcançando concentrações compatíveis com o diestro, no entanto, estudos são necessários para esclarecer se essas éguas podem ser utilizadas como receptoras de embrião, assim como em que dias podem ser utilizadas.

A ausência de tecido luteal observada pela ultrassonografia não está necessariamente relacionada à baixa produção de progesterona.

REFERÊNCIAS

(1) LAGNEAUX D, PALMER E. Embryo transfer in anestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine Veterinary*. 1997;15 (Suppl):107-111.

(2) McKINNON AO, SQUIRES EL, CARNEVALE EM, HERMENET MJ. Ovariectomized, steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*. 1988;29:1055-1063.

- (3) HAYNA JT, MADILL S, ROSER JF, TROEDSSON MHT. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. *Animal Reproduction Science*. 2006;94:355-356.
- (4) HAYNA JT, MADILL S, TROEDSSON MHT. The effect of transvaginal follicular aspiration on corpus luteum formation in mares. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER*, 6., 2004, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro, 2004. p.35.
- (5) HINRICHS K, RAND WM, PALMER E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. *Biology of Reproduction*. 1991;44:292-298.
- (6) GASTAL EL, GASTAL, MO, GINTHER, OJ. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology*. 1998;50:1025-1038.
- (7) GINTHER OJ. *Reproductive biology of the mare*. Cross Plaines: Equiservices Publishing, 1992. 642p.
- (8) GINTHER OJ, RODRIGUES BL, FERREIRA, JC, ARAUJO RR, BEG MA. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reproduction, Fertility and Development*. 2008;20:684-693.
- (9) GINTHER OJ, UTT MD, BERGFELT DR, BEG MA. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science*. 2006;95:144-150.
- (10) ARRUDA RP, VISINTIN JA, FLEURY JJ, GARCIA AR, MADUREIRA EH, et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2001;38:233-239.

- (11) NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVA PJ, ROLLYSON MK, McINTUSH EW. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*. 2000;80:1-29.
- (12) GINTHER OJ, GASTAL EL, GASTAL MO, UTT MD, BEG MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*. 2007; 99:213-220.
- (13) NAGY P, HUSZENICZA G, REICZIGEL J, JUHÁSZ J, KULCSÁR M, ABAVÁRY K, GUILLAUME D. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology*. 2004;61:203-14.
- (14) GINTHER OJ, GASTAL EL, GASTAL MO, BEG MA. Effect of prostaglandin F_{2α} on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domestic Animal Endocrinology*. 2007;32:315-328.
- (15) GASTAL EL, GASTAL MO, GINTHER OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biology of Reproduction*. 1999;61:724-730.
- (16) CARNEVALE EM, RAMIREZ RJ, SQUIRES EL, ALVARENGA MA, VANDERWALL DK, MCCUE PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*. 2000;54:965-979.
- (17) MCCUE PM, VANDERWALL DK, KEITH SL, SQUIRES EL. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. *Theriogenology*. 1999;5:267 (Abstract).
- (18) GINTHER OJ, PIERSON RA. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. *Theriogenology*. 1984;21:471-483.
- (19) PIERSON RA, GINTHER OJ. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. *Theriogenology*. 1985;23:795-806.

TABELA 1 - Concentração de progesterona (ng/mL) nos dias 1, 4, 7, 10, 13 e 16 após a aspiração folicular ou ovulação (D0).

Dias após a aspiração folicular						
Grupos	1	4	7	10	13	16
F \geq25mm (n = 6)	0,15 \pm 0,04 ^{Aa}	1,54 \pm 1,10 ^{Ba}	4,34 \pm 2,33 ^{Ba}	5,86 \pm 2,11 ^{Aa}	6,32 \pm 1,52 ^{Aa}	6,12 \pm 1,82 ^{Aa}
F \geq30mm (n = 6)	0,13 \pm 0,05 ^{Aa}	0,22 \pm 0,06 ^{Ba}	2,47 \pm 0,89 ^{Ba}	4,94 \pm 1,86 ^{Aa}	8,81 \pm 2,65 ^{Aa}	5,97 \pm 1,28 ^{Aa}
F \geq35mm (n = 6)	0,24 \pm 0,13 ^{Aa}	1,38 \pm 0,48 ^{Ba}	4,11 \pm 1,01 ^{Ba}	8,27 \pm 1,40 ^{Aa}	7,66 \pm 1,57 ^{Aa}	6,77 \pm 1,52 ^{Aa}
F P.O. (n = 6)	0,11 \pm 0,04 ^{Ab}	2,70 \pm 0,53 ^{Bab}	9,01 \pm 1,45 ^{Ba}	8,95 \pm 1,52 ^{Aa}	8,37 \pm 1,62 ^{Aa}	2,04 \pm 1,05 ^{Aab}
Controle (n = 5)	2,54 \pm 1,50 ^{Ac}	12,09 \pm 2,52 ^{Aa}	16,28 \pm 3,45 ^{Aa}	13,90 \pm 3,38 ^{Aa}	8,08 \pm 2,90 ^{Aa}	0,11 \pm 0,01 ^{Ab}

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas (P<0,05), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha
P.O. = Pré-ovulatório

TABELA 2 - Intervalo em dias, da aspiração folicular ou ovulação a concentração de progesterona >2ng/mL, da aspiração folicular ou ovulação a concentração de progesterona <2ng/mL e da aspiração folicular ou ovulação a ovulação nos diferentes grupos.

Grupo	Aspiração ou ovulação a concentração de progesterona		Aspiração ou ovulação a ovulação
	>2ng/mL	<2ng/mL	Dias
	Dias	Dias	
F ≥25mm	6,2±1,1 ^{AB} (n = 5)	17,2±1,6 ^A (n = 5)	20,5±3,1 ^A (n = 6)
F ≥30mm	7,3±0,5 ^A (n = 4)	19,0±1,4 ^A (n = 3)	17,2±2,8 ^A (n = 6)
F ≥35mm	5,4±0,6 ^{AB} (n = 5)	18,8±1,6 ^A (n = 5)	23,0±3,5 ^A (n = 6)
F Pré-ovul.	4,0±0,4 ^{BC} (n = 6)	16,0±0,5 ^A (n = 6)	22,7±0,8 ^A (n = 6)
Controle	1,6±0,4 ^C (n = 5)	13,6±0,7 ^A (n = 5)	22,0±1,0 ^A (n = 5)
P	<0,05	>0,05	>0,05

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas (P<0,05), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna

TABELA 3 - Concentração máxima de progesterona e dia da detecção da concentração máxima progesterona (ng/mL) nos diferentes grupos.

Grupo	Concentração máxima de progesterona	
	(ng/mL)	(dias)
F ≥25mm	8,1±2,2 ^B (n = 6)	11,3±4,6 ^A (n = 6)
F ≥30mm	6,4±2,6 ^B (n = 6)	11,5±1,2 ^A (n = 6)
F ≥35mm	8,3±1,8 ^{AB} (n = 6)	11,2±4,8 ^A (n = 6)
F Pré-ovulatório	10,9±1,8 ^{AB} (n = 6)	8,7±3,4 ^A (n = 6)
Controle	20,4±4,7 ^A (n = 5)	8,8±0,6 ^A (n = 5)
P	<0,05	>0,05

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas (P<0,05), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna

TABELA 4 - Distribuição de frequências das éguas que atingiram a concentração de progesterona (P4) >2ng/mL após a aspiração folicular e porcentagem de éguas com presença ou ausência de estrutura lútea (EL) visualizada pela ultrassonografia.

Grupo	Éguas com concentração de P4		Éguas	
	>2ng/mL	<2ng/mL	presença EL	ausência EL
	(%)	(%)	(%)	(%)
F ≥25mm (n=6)	83,3	16,7	66,7	33,3
F ≥30mm (n=6)	66,7	33,3	50,0	50,0
F ≥35mm (n=6)	83,3	16,7	83,3	16,7
F Pré-ovul. (n=6)	100,0	0,0	100,0	0,0
Controle (n=5)	100,0	0,0	100,0	0,0

$\chi^2=3,8$ $p=0,44$ (concentração de P4 > ou <2ng/mL)

$\chi^2=6,6$ $p=0,16$ (presença/ausência de EL)

Anexo

Anexo 1

Normas de Publicação da revista
“Veterinária e Zootecnia”