UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES DEGENERATIVAS ENDOMETRIAIS E DA IDADE NA HEMODINÂMICA DO TRATO REPRODUTIVO DE ÉGUAS APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E DURANTE AS FASES INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

JAIR CAMARGO FERREIRA

BOTUCATU - SP
Janeiro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES DEGENERATIVAS ENDOMETRIAIS E DA IDADE NA HEMODINÂMICA DO TRATO REPRODUTIVO DE ÉGUAS APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E DURANTE AS FASES INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

JAIR CAMARGO FERREIRA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp campus Botucatu como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em medicina veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira

BOTUCATU - SP
Janeiro de 2012

Nome do autor: Jair Camargo Ferreira

Título: INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES DEGENERATIVAS ENDOMETRIAIS E DA IDADE NA HEMODINÂMICA DO TRATO REPRODUTIVO DE ÉGUAS APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E DURANTE AS FASES INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Dr. Cezinande de Meira
Presidente e orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ - Unesp – Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ - Unesp – Botucatu

Prof. Adj. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ - Unesp – Botucatu

Prof. Dr. Luciano Andrade de Silva
Membro
Curso de Medicina Veterinária
FZEA - USP – Pirassununga

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ - USP – Pirassununga

Data: 23 de Janeiro de 2012.

" Nenhuma grande vitória é possível sem ser precedida por pequenas vitórias sobre nós mesmos "

L.M. Leanov

" Sempre faço o que não consigo fazer para aprender o que não sei "

P. Picasso

" O grande desafio não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê "

A. Schopenhauer

Dedico este trabalho a aquele que sempre me apoiou e serviu como exemplo de caráter e retidão ao longo de minha vida. Ao meu pai, Jair Candido Ferreira, agradeço por todo o apoio nesta jornada. Dedico também às minhas irmãs, Jan e Jor, que mesmo distantes sempre me incentivaram e me ajudaram em tudo o que era necessário.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Cezinande de Meira pela oportunidade ofertada, confiança depositada, além de todo o apoio e compreensão nos momentos de dificuldade. Aproveito para também agradecer à sua esposa, Yvone, pelas palavras de incentivo e carinho compartilhado nestes anos.

A todos os amigos integrantes da “Equipe Meira”, com quais tive a grata chance de trabalhar: Fernanda Ignácio, Daniela Montechiese, Cassia Orlandi, Gustavo Araújo, Rafael Romano, Heloísa Canesin, Luiz Fernando Novaes, Angélica Gimenis e Elisa Sant’Anna. Tenho muito orgulho de poder falar que faço parte deste grupo.

Ao Dr. O.J. Ginther e todos os colegas da Eutheria Foundation, Wisconsin-EUA, onde trabalhei entre os anos de 2006 e 2007. Todo o conhecimento adquirido neste período foi fundamental para a realização do presente estudo. Em especial, agradeço ao Reno Roldi, Bernardo Rodrigues e Miller Palhão. Mais do que colegas de trabalho ou amigos, verdadeiros irmãos.

Aos professores Rubens Arruda, Sony Bicudo e Gilson Toniollo pela participação no processo de transferência de nível de mestrado para doutorado direto, por todas as considerações feitas e que tanto enriqueceram o projeto a ser realizado.

À professora Eunice Oba por disponibilizar laboratório e equipamentos necessários para mensuração hormonal.

À professora Noeme Sousa Rocha por realizar a avaliação morfológica das amostras de biópsia uterina necessária para distribuição dos animais dentro dos grupos experimentais.

À Juliana Gadun de Lalla meus sinceros agradecimentos pelo auxílio na análise estatística. Muito obrigado pela atenção dispensada e por estar sempre disposta a me ajudar, mesmo em dias e horários importunos.

Aos professores do Departamento de Reprodução, todos fundamentais para meu crescimento profissional. A vida é a soma de todas as suas escolhas. Hoje sou grato a Deus por me ajudar na decisão de fazer doutorado em Botucatu. Não tenho dúvida ao afirmar que nenhum lugar foi tão enriquecedor para meu aprendizado como a FMVZ, Unesp Botucatu.

Aos muitos estagiários que me ajudaram durante a árdua etapa de coleta de dados deste estudo.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu-SP. Em especial agradeço aos funcionários José Roberto de Lalla Junior e Miguel Alves. A ajuda de vocês foi fundamental para a conclusão da minha pós-graduação.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu – SP, por disponibilizar a estrutura necessária para a realização deste estudo.

Ao Médico Veterinário Marcelo Pessoa por conceder animais necessários para a realização dos experimentos.

À FAPESP pelo suporte financeiro (processo 2008/54929-2) concedido para a realização do presente estudo e pela bolsa de mestrado (processo 2008/52558-7) e doutorado (processo 2009/52575-1).

À Manca, Rosa, TA e demais éguas que fizeram parte deste estudo. Nada disso seria possível sem a contribuição dessa bela criação de Deus. Delas dependo e para elas trabalho.

Aos meus amigos pós-graduandos da Unesp Botucatu meus sinceros agradecimentos. Foram muitos momentos de alegrias compartilhados que ficarão na lembrança pelo resto da minha vida. Desculpo-me pelo agradecimento generalizado, mas não gostaria de cometer nenhuma injustiça ao deixar de citar alguém.

Aos meus amigos de república Gabriel, Daniel, Leandro, Natalia e Stephane pelos bons momentos compartilhados nestes anos em Botucatu.

À minha família pelo incentivo ininterrupto e apoio incondicional. O que seria de mim sem vocês?

À Cristiane Piacitelli. As mais belas palavras não seriam suficientes para descrever o quão importante você tem sido até aqui.

A Deus. Por tornar tudo isso possível e me proteger até este momento, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... xi

LISTA DE TABELAS..... xxii

Resumo..... xxvi

Abstract..... xxvii

1. INTRODUÇÃO..... 29

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 32

2.1 Resposta uterina à infusão de sêmen..... 33

2.2 Reconhecimento maternal da gestação..... 34

2.3 Idade da égua e eficiência reprodutiva..... 36

2.4 Ultrassonografia Doppler..... 39

2.4.1 Produção de Imagem ultrassonográfica colorida..... 39

2.4.2 Modos de ação Doppler..... 40

2.5 Biópsia uterina e alterações degenerativas endometriais..... 44

2.5.1 Obtenção, fixação e coloração de amostras endometriais..... 46

2.5.2 Avaliação e classificação histopatológica..... 48

3. OBJETIVOS e HIPÓTESES..... 51

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 53

4.1 Animais e seleção de acordo com a idade e classificação histológica uterina..... 54

4.2 Ultrassonografia modo-B e Doppler..... 55

4.3 Acompanhamento do desenvolvimento folicular, detecção da ovulação e inseminação artificial..... 56

4.4 Grupos experimentais..... 57

4.4.1 Experimento 1: Hemodinâmica e contratilidade uterina no período pós-cobertura de éguas com idades distintas e diferentes graus de degeneração endometrial..... 57

4.4.2 Experimento 2: Influência das características endometriais e idade sobre o desenvolvimento embrionário, perfusão sanguínea uterina e características luteais durante a fase inicial da gestação.... 57

4.5 Parâmetros a serem avaliados..... 58

4.5.1 Perfusão sanguínea uterina..... 58

4.5.2 Contratilidade uterina..... 59

4.5.3 Fluxo sanguíneo mesometrial..... 60

4.5.4 Área mesometrial..... 60

4.5.5 Velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial e índices Doppler uterino..... 60

4.5.6 Mobilidade Embrionária..... 61

4.5.7 Desenvolvimento embrionário..... 61

4.5.8 Concentração de progesterona e características de corpo lúteo..... 61

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 62

6. RESULTADOS..... 63

6.1 Experimento 1..... 64

6.2 Experimento 2..... 72

7. DISCUSSÃO..... 112

7.1 Experimento 1..... 116

7.2 Experimento 2..... 122

8. CONCLUSÕES..... 130

9. REFERÊNCIAS……. 132

10. Artigo submetido..... 149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de cistos (número total e área cistica) em éguas nulíparas (n= 34 éguas com cistos uterinos detectados por ultrassonografia). Útero foi dividido em três porções (extremidade, intermediária e junção corpo-cornual) e cada porção consistia de três segmentos uterinos. Frequências ou médias com diferentes letras na mesma coluna são diferentes (*P*>0,05). Adaptado de Ferreira et al. (2008)……..... 38

Figura2. Seleção de imagens representativas do Princípio do Efeito Doppler. A frequência de ondas emitidas por um objeto em repouso (V_{fonte} = 0) em relação ao observador é constante, concentrica e igualmente espaçada. Caso o pulso seja emitido durante movimento relativo entre a fonte e observador, as frentes de ondas deixam de ser concentricas. Durante movimentos de aproximação e afastamento ($V_{fonte} < V_{som}$), a frequência de onda dos ecos aumente e diminui, respectivamente.. 40

Figura 3. Imagens esquemáticas da alteração na Frequência Doppler durante o exame ultrassonográfico colorido. A Frequência Doppler varia conforme a movimentação das hemácias em relação ao transdutor. (A e B) A frequência de ecos emitidos e recebidos é igual em situações de ausência de movimento ou em movimentação perpendicular, o que resulta na ausência de sinais coloridos. (C) Durante um movimento de aproximação, a frequência recebida é maior do que a emitida gerando sinais positivos. (D) A frequência recebida é menor do que a emitida quando as hemácias deslocam-se em movimento de afastamento em relação ao transdutor, produzindo sinal doppler negativo..... 41

Figura 4. Seleção de imagens ultrassonográficas do trato reprodutivo de égua nos modos-B, Power-flow, Color-flow e Espectral (A, B, C e D, respectivamente). (A e B) Corte transversal de corno uterino não gestante em diestro durante exame ultrassonográfico modos B e Power-flow. (C) Avaliação colorida Doppler modo Color-flow de folículo pré-ovulatório. (B e C) A presença de pontos coloridos no tecido uterino (endométrio e miométrio) e parede folicular indicam o deslocamento de hemácias e permitem estimar a vascularidade tecidual. (D) Gráfico espectral

formado pelos valores de velocidades máximas do fluxo sanguíneo em artéria localizada no mesométrio uterino.....……..……. 42

Figura 5. Avaliação ultrassonográfica Doppler modo-Espectral. O cursor (amarelo) é posicionado sobre uma artéria mesometrial (vermelho) para a captura de dados de velocidade de fluxo sanguíneo e geração de gráfico de velocidade espectral. Velocidades de pico sistólico (PSV) e diastólica final (EDV) são, respectivamente, as velocidades de fluxo sanguíneo máxima e final dentro de um ciclo cardíaco. TAMV é a média das velocidades máximas de um espectro. O equipamento doppler calcula automaticamente os Índices de Pulsatilidade e de Resistência (PI e RI, respectivamente) levando em consideração os valores de PSV, EDV e TAMV... 43

Figura 6. Valores de cosseno do Ângulo Doppler (cosϴ) e relação entre o Ângulo Doppler e acurácia na mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo. A determinação das velocidades de fluxo sanguineo varia de acordo com a Frêquencia Doppler (FD), onde FD = 2 ft. v. cosϴ /c. Quando o movimento das hemácias em relação ao transdutor é perpendicular (90°), o valor de cosϴ é zero e o equipamento não captura sinais Doppler. O valor de Cosϴ é próximo à 1 quando 0° < Ângulo Doppler < 60°, não influenciando a mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo.....……..…..…… 43

Figura 7. Seleção de imagens ultrassonográficas modos-B, Color e Power-flow do corpo lúteo equino. Demonstração da maior sensibilidade do modo Power-flow para a captura de sinais Doppler de fluxos sanguíneos fracos e lentos, como os presentes no trato reprodutivo de éguas. Sonogramas na mesma linha foram obtidos simultâneamente. Dia da ovulação foi considerado dia zero do ciclo estral (D=0). Quantidade e intensidade de pontos coloridos Doppler presentes no interior e periferia do CL indicam a perfusão sanguínea luteal. Em um mesmo momento, a quantidade e intensidade de pixels coloridos no modo Power-flow é maior do que a visualizada no modo Color-flow. Fonte: Adaptado de Ginther (2007)……..……. 46

Figura 8. Seleção de imagens de amostras de biópsia uterina (a, b e c) com diferentes intensidades de alterações degenerativas endometriais. (a) Processo inflamatório crônico caracterizado por infiltrado inflamatório de leucócitos mononuclear no estrato esponjoso. (b) Dilatação cistica e severa fibrose periglandular. (c) Serevas dilatações cisticas e fibrose periglandular difusa. Adaptado de Ginther (1992)……..... 48

Figura 9. Diagrama de útero e mesométrio equino com imagens representativas da avaliação ultrassonográfica convencional e colorida Doppler do útero, corpo lúteo e artéria mesometrial. Imagens ultrassonográficas Doppler função Power-flow de corte transversal de corno uterino não gravídico e gravídico (A e B, respectivamente). (C) Imagem ultrassonográfica modo-B de corpo lúteo cavitário para mensuração de área e volume e identificação anatômica para posterior avaliação da hemodinâmica luteal. (D) Avaliação subjetiva da vascularidade luteal através de exame Doppler função Power-flow. Perfusão vascular uterina (A e B) e luteal (D) foram estimados levando em consideração a quantidade e intensidade de sinais coloridos Doppler sobrepostos sobre imagem do correspondente tecido em modo-B. (E) Cursor (verde) posicionado sobre artéria mesometrial e grafico de velocidade espectral. Através da avaliação Doppler modo-Espectral foram determinadas as velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial e índices Doppler uterinos.....……..…….... 56

Figura 10. Diagrama de útero equino com imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão sanguínea utilizando ultrassonografia Doppler. Posição e direção de movimento do transdutor sobre o útero (seta branca) durante o exame são apresentadas. Imagens do corte transversal do corno uterino no modo Doppler Power-flow (A, B e C). Segmentos distintos de um mesmo corno uterino podem apresentar escores perfusão sanguínea diferentes, variando entre baixa (A) a alta (B e C) vascularidade. Ao avaliar a perfusão sanguínea uterina, os três segmentos (base, intermediária e extremidade) e todas as camadas (endométrio e miométrio) dos cornos úterinos devem ser considerados..... 59

Figura 11. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas (n=18) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à h0 são indicados por asterisco..... 65

Figura 12. Média para perfusão sanguínea do útero (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos endometriais(Grupos GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina de éguas GII em relação à h0 são indicados por asterisco. (a, b) Letras diferentes indicam diferença estatisca (*P*<0,05) entre momentos para éguas GIII..... 65

Figura 13. Média±E.P.M para perfusão sanguínea do útero (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de éguas classificadas de acordo com idade (Grupo Jovem e Velho; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à h0 em éguas do grupo Velho são indicados por asterisco..... 69

Figura 14. Média para contratilidade uterina de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos endometriais (Grupos GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (*P*<0,05) na contratilidade uterina em relação à h0 nos três grupos experimentais são indicados por asterisco..... 71

Figura 15. Média±E.P.M para contratilidade uterina de éguas classificadas de acordo com idade (Grupo Jovem e Velho; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (*P*<0,05) na contratilidade uterina em relação à h0 em ambos os grupos experimentais são indicados por asterisco..... 71

Figura 16. Média± E.P.M para perfusão sanguínea do útero (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de éguas gestantes e não gestantes (n=18 e 7 éguas/grupo, respectivamente) durante os 12 primeiros dias pós-ovulação. Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 em éguas do grupo Velho são indicados por asterisco. Aumento siginificativo (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D9 é indicado por letras diferentes (a,b)..... 73

Figura 17. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas jovens (idade ≤6 anos; n=6 éguas) durante os 20 primeiros dias de gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 75

Figura 18. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas adultas (8 anos ≤idade ≤12 anos; n=6 éguas) durante os 20 primeiros dias de gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 76

Figura 19. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas velhas (idade ≥15 anos; n=6 éguas) durante os 20 primeiros dias de gestação. Experimento 2. Não foi detectada diferença estatistica (*P*>0,05) para a vascularidade uterina de éguas velhas entre D0 e D20..... 76

Figura 20. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas durante os 20 primeiros dias de gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 81

Figura 21. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas classificadas histologicamente como Grau I durante os 20 primeiros dias de gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 82

Figura 22. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas classificadas histologicamente como Grau II durante os 20 primeiros dias de gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 82

Figura 23. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas classificadas histologicamente como Grau III durante os 20 primeiros dias de gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 83

Figura 24. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (*P*<0,05) entre cornos uterinos no momento..... 86

Figura 25. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valores médios de PI significativamente menores (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 88

Figura 26. Média± E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas entre o 12º e 20º dia da

gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valores médios de RI significativamente menores (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 88

Figura 27. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos endometriais como Grau I entre o 12º e 20º dia da gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatistica (*P*<0,05) entre cornos uterinos no momento..... 89

Figura 28. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos endometriais como Grau II entre o 12º e 20º dia da gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (*P*<0,05) entre cornos uterinos no momento..... 90

Figura 29. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos endometriais como Grau III entre o 12º e 20º dia da gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatistica (*P*<0,05) entre cornos uterinos no momento..... 90

Figura 30. Média± E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do corno ipsi-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos (GI, GII e GIII; n=6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferença significativa no momento (*P*<0,05) para vascularidade uterina entre GI e GIII são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (*P*<0,05) entre os Grupos GI e GII..... 91

Figura 31. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do corno contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos (GI, GII e GIII; n=6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferença significativa no momento (*P*<0,05) para vascularidade uterina entre GI e GIII são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (*P*<0,05) entre os Grupos GI e GII..... 91

Figura 32. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GI entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de PI significativamente menor (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 92

Figura 33. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de PI significativamente menor (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 93

Figura 34. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GIII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de PI significativamente menor (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 93

Figura 35. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GI entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de RI significativamente menor (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 94

Figura 36. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GII entre o 12º e 20º dia da

gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de RI significativamente menor (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião..... 94

Figura 37. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GIII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O valor médio para RI dos cornos ipsi- e contra-lateral ao embrião foi semelhante (*P*>0,05)..... 95

Figura 38. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas jovens (idade ≤6 anos; n= 6 éguas/grupo) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatistica entre os cornos uterinos no momento..... 97

Figura 39. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas adultas (8 anos ≤ idade ≤12 anos; n= 6 éguas/grupo) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferenças significativas (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicadas por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística entre os cornos uterinos no momento..... 97

Figura 40. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas velhas (idade ≥15 anos; n= 6 éguas/grupo) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferenças significativas (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicadas por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística entre os cornos uterinos no momento..... 98

Figura 41. Média para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) dos cornos uterinos ipsi-lateral ao embrião de éguas com idades distintas

(grupos Jovem, Adulto e Velho) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. A vascularidade uterina média do corno unterino ipsi-lateral ao embrião dos grupos Jovem e Velho foi estatisticamente maior (P<0,05) do que no grupo Adulto..... 98

Figura 42. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas com idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. A vascularidade uterina média do corno unterino contra-lateral ao embrião dos grupos Jovem e Velho foi estatisticamente maior (P<0,05) do que no grupo Adulto..... 99

Figura 43. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas jovens (idade ≤6 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de pulsatilidade médio do corno uterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (*P*<0,05) do que no corno contra-lateral em éguas jovens..... 100

Figura 44. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas adultas (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de pulsatilidade médio do corno unterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente semelhante (*P*>0,05) do que no corno contra-lateral em éguas adultas..... 100

Figura 45. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas velhas (idade ≥15 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de pulsatilidade médio do corno unterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (*P*<0,05) do que no corno contra-lateral em éguas velhas..... 101

Figura 46. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas jovens (idade ≤6 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de resistência médio do corno uterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (*P*<0,05) do que no

corno contra-lateral em éguas jovens..... 101

Figura 47. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas adulto (6< anos idade <15 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de resistência médio dos cornos uterinos ipsi- e contra-lateral ao embrião foi estatisticamente semelhante (*P*>0,05)..... 102

Figura 48. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas velhas (idade ≥15 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de resistência médio dos cornos uterinos ipsi- e contra-lateral ao embrião foi estatisticamente semelhante (*P*>0,05)..... 102

Figura 49. Média±E.P.M para contratilidade uterina de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na contratilidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 104

Figura 50. Média para contratilidade uterina de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos (grupos GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na contratilidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco..... 105

Figura 51. Média para contratilidade uterina de éguas de idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Valores estatisticamente maiores (*P*<0,05) para contratilidade uterina de éguas jovens em relação à éguas velhas são indicados por asterisco..... 106

Figura 52. Média±E.P.M para concentração plasmática de progesterona de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na concentração sérica de progesterona em relação à D0 são indicados por asterisco..... 107

Figura 53. Média para concentração plasmática de progesterona de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos (grupos GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. A concentração média de progesterona entre DO-20 foi estatisticamente maior (*P*<0,05) no grupo GI do que nos grupos GII e GIII..... 107

Figura 54. Média para concentração plasmática de progesterona de éguas de idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Os valores médios de progesterona entre D0-20 foram estatisticamente semelhantes (*P*>0,1) nos três grupos experimentais..... 108

Figura 55. Média±E.P.M para perfusão sanguínea luteal de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade luteal em relação à D0 são indicados por asterisco..... 109

Figura 56. Média para perfusão sanguínea luteal de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos (grupos GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. A vascularidade luteal média entre DO-20 de éguas gestantes GI foi estatisticaemente maior e menor do em éguas GIII e GII, respectivamente..... 109

Figura 57. Média para perfusão sanguínea luteal de éguas de idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Os valores médios de vascularidade luteal de éguas jovens foi estatisticamente maior (*P*>0,05) do que em éguas adultas e velhas..... 110

Figura 58. Média±E.P.M para área luteal de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na área luteal em relação à D0 são indicados por asterisco..... 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média±E.P.M para a relação entre a frequencia, número de cistos e idade em 76 éguas. Adaptado de Ferreira et al. (2008)..... 38

Tabela 2. Indicações para biópsia uterina em éguas*..... 45

Tabela 3. Classificação do útero de éguas de acordo com a intensidade de degeneração endometrial. Baseado em Kenney & Doig (1986)..... 49

Tabela 4. Média±E.P.M de perfusão sanguínea média (1-4) de ambos os cornos uterinos de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (n= 6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1..... 66

Tabela 5. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (n= 6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1..... 67

Tabela 6. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (n= 6 éguas / grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1..... 68

TABELA 7 Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) mesometrial de éguas (n= 18 e 7 / grupo, respectivamente) durante os 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1..... 70

Tabela 8. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade e resistência (PI e RI, respectivamente) mesometrial de éguas classificadas de acordo com a idade (grupo Jovem e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os 12 primeiros dias pós-ovulação. Experimento 2..... 74

Tabela 9. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (1-4) do corno uterino ipsi-lateral à ovulação de éguas gestantes com idades distintas (Grupos Jovem, Adulto e Velho; n=6 éguas/grupo) durante os 12 primeiros dias da gestação. Experimento 2..... 77

Tabela 10. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (1-4) dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulução de éguas gestantes jovens e velhas (n=6 éguas/grupo) entre os dias 12 e 20 da gestação. Experimento 2..... 78

Tabela 11. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de éguas gestantes com idades distintas (Grupos Jovem, Adulto e Velho; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2..... 79

Tabela 12. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de éguas gestantes com idades distintas (Grupos Jovem, Adulto e Velho; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2..... 80

Tabela 13. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de éguas gestantes com diferentes graus de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2..... 84

Tabela 14. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade uterina de éguas gestantes com diferentes graus de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2..... 85

Tabela 15. Média±E.P.M para os índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) mesometriais dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas gestantes (n= 18 éguas) entre os dias 12 e 20 da gestação. Experimento 2..... 87

Tabela 16. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2..... 95

Tabela 17. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2..... 96

Tabela 18. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas classificadas de acordo com idade (jovem, adulta e velha; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2..... 103

Tabela 19. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas com idades distintas (jovem, adulto e velho; n=6 éguas/grupo). Experimento 2..... 103

Tabela 20. Média± E.P.M para diâmetro da vesícula embrionária entre os dias 10 e 20 da gestação (n= 18 éguas). Experimento 2..... 111

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre a intensidade de alterações degenerativas endometriais e da idade com a hemodinâmica uterina durante o período posterior à infusão de sêmen (Experimento 1) e durante a fase inicial da gestação (Experimento 2). Vascularidade, contratilidade e índices Doppler do útero foram mensurados durante as 12 primeiras horas pós-inseminação artificial (IA) no experimento1. Não foi observado (P>0,1) efeito da posição do folículo pré-ovulatório sobre a hemodinâmica e contratilidade uterina. Um aumento na vascularidade foi detectado (P<0,001) em éguas velhas e com degeneração endometrial moderada (GII) e intensa (GIII) nas duas primeiras horas pós-IA. Índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) uterina mantiveram-se constante durante as 12 horas pós-IA em éguas dos grupos GII, jovens e velhas (P>0,05). Um aumento na atividade contrátil do útero foi detectado (P<0,0001) nas horas 1 e 2, independente do grupo experimental (P>0,05). No experimento 2, os parâmetros citados acima, além de características luteais (área e vascularidade) e diâmetro da vesícula embrionária foram avaliados diariamente em éguas gestantes e não gestantes. Aumento e diminuição, respectivamente, na vascularidade e índices Doppler uterinos foram detectados (P<0,05) em D4 (D0=dia da ovulação) em éguas gestantes e não gestantes. Um aumento progressivo na perfusão sanguínea com pronunciada vascularidade no corno ipsi-lateral ao embrião foi observado em éguas gestantes a partir de D12 (P<0,001). Efeito da idade e da intensidade das alterações degenerativas endometriais sobre a vascularidade e índices Doppler do útero gravídico foram detectados (P<0,01). A contratilidade uterina foi máxima (P<0,001) entre D10 e D17 da gestação independente da classificação histológica do útero e idade das éguas (P>0,05). A vascularidade luteal média e a concentração sérica de progesterona de éguas GIII foram menores (P<0,05) do que em éguas com útero sadio (GI). Os resultados demonstraram, pela primeira vez, o efeito da idade e das características endometriais sobre a hemodinâmica uterina de éguas durante o período pós-IA e na fase inicial da gestação.

Palavras chave: Égua; ultrassonografia Doppler; hemodinâmica; útero; corpo lúteo idade; degeneração endometrial

Abstract

The overall purpose of the present study was to evaluate the relationship between endometrial degenerative changes and age on the uterine hemodynamics of mares during the post-breeding (Experiment 1) and early gestation phases (Experiment 2). Vascularity, contractility and Doppler indices from the uterus were measured hourly during the first 12 hours post-artificial insemination (AI) in experiment 1. Hemodynamics and contractility of the uterus did not change (*P*>0.1) by pre-ovulatory follicle position. Increased uterine vascularity was observed (*P*<0,001) on hours 1 and 2 in older and moderate (GII) and intense (GIII) endometrial degeneration mares. Pulsatility and resistance indices (PI and RI, respectively) did not change (*P*>0.05) through the experiment 1 age groups (younger and older mares) mares with moderate endometrial degeneration. Independently of the age and endometrial degenerative changes, increased uterine contractility was observed (P<0,0001) in the first two hours post-AI. In experiment 2, the same end points were measured every day. Additionally, luteal vascularity and embryonic vesicle diameter were evaluated. On D4 (D0 = day of ovulation), increased vascularity and decreased Doppler indices were detected (P <0.05) in pregnant and nonpregnant mares. A progressive increase on the uterine vascular perfusion and greater vascularity in the horn with embryo were observed in pregnant mares from D12 (*P* <0.001). Effect of age and intensity of endometrial degenerative changes on the vascularity and Doppler indices of the gravidic uterus were detected (*P*<0.01). Uterine contractility was greater (*P*<0.001) between days 10 and 17 of pregnancy regardless of the uterine histological classification and age of mares (P> 0.05). Mean luteal vascularity and plasmatic progesterone concentrations of GIII mares were lower (*P*<0.05) than in mares with healthy uterus (GI). Our results demonstrated for the first time the effect of age and the intensity of endometrial degenerative changes on the uterine hemodynamics during the post-IA and early gestation phases in mares.

Key words: Mare, Doppler ultrasonography, uterus, corpus luteum, age, endometrial degeneration

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O advento da ultrassonografia Doppler na reprodução equina tem possibilitado reavaliar conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução. Esta téc nica demonstrou ser efetiva e prática para avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão sanguínea do trato reprodutivo de animais de grande porte. Em éguas, o Doppler é a única técnica atualmente disponível para o estudo *in vivo de* alterações imediatas da perfusão vascular uterina e ovariana. Estas informações podem ser utilizadas para a avaliação de diferentes fenômenos fisiológicos e patológicos do sistema reprodutivo, como o potencial ovulatório de folículos, predição de ovulação, estatus funcional do corpo lúteo, reconhecimento maternal da gestação, entre outros.

A resposta uterina deve ser caracterizada por uma resposta inflamatória aguda e transitória durante a qual se observa o influxo de polimorfonucleares em direção ao lúmen uterino com o intuito de eliminar possíveis agentes contaminantes e restos celulares. A partir da interação entre neutrófilos e espermatozoides ocorre a síntese de diferentes prostaglandinas e óxido nítrico, que apresentam conhecida propriedade vasodilatadora. Desta forma, alterações na perfusão sanguínea ao longo das primeiras horas pós-inseminação artificial possivelmente são detectáveis através da ultrassonografia Doppler, tornando esta uma tecnologia importante para a avaliação do ambiente uterino nos períodos prévio e posterior à cobertura.

Durante a fase inicial da gestação, uma íntima interação entre o concepto e o endométrio ao longo de toda a extensão do útero é necessária para o adequado reconhecimento maternal da gestação e inibição da regressão prematura do corpo lúteo. Alterações endometriais degenerativas são achados patológicos comuns em úteros de éguas. Estudos prévios relacionaram a presença destes processos com alterações na perfusão sanguínea endometrial, sugerindo distúrbios vasculares como potencial causa adicional para estas patologias. Sabe-se da correlação existente entre alterações degenerativas endometriais com menores taxas de fertilidade na espécie equina. Desta forma, uma melhor compreensão da interação embrio-maternal e dos possíveis efeitos de processos degenerativos endometriais sobre o desenvolvimento inicial do embrião podem ser obtidos através da tecnologia Doppler. A idade do animal também está intimamente relacionada com a queda na eficiência reprodutiva. Éguas com idade

avançada apresentam menores taxas de concepção e um aumento gradativo na taxa de morte embrionária precoce. Assim como a fibrose periglandular, disfunções vasculares são achados frequentes no útero de éguas velhas. Entretanto, até o momento não existem estudos *in vivo* demostrando de que forma a idade das éguas afeta a hemodinâmica uterina.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta uterina à infusão de sêmen

Após a deposição do sêmen no útero da égua, o espermatozóide é transportado para o oviduto, onde deve manter-se viável até a fertilização do oócito. Além da motilidade espermática, as contrações miometriais são imprescindíveis para o transporte dos espermatozóides até o sítio de fertilização (TROEDSSON et al., 1998). Em éguas férteis, duas horas após a inseminação já é possível encontrar espermatozóides viáveis no oviduto. Entretanto, a concentração dos mesmos no sítio de fertilização é máxima somente quatro horas pós-infusão (BRISKO et al., 1990). Vale ressaltar que éguas com histórico de susceptibilidade a infecção uterina pós-cobertura tendem a apresentar menor concentração de espermatozóides viáveis na porção caudal do útero e tuba uterina quando comparadas a éguas normais (SCOTT et al., 1995).

A resposta uterina pós-cobertura leva ao estabelecimento de um processo inflamatório fisiológico e transitório que tem como objetivo eliminar do trato reprodutivo feminino o excedente de sêmen, debris celulares e possíveis agentes contaminantes (TROEDSSON, 1999). Esta resposta fisiológica é caracterizada pelo influxo de polimorfonucleares (PMN) para o lúmen uterino em até uma hora após a inseminação (KOTILAINEN et al., 1994; KATILA, 1995; TROEDSSON, 1999; TROEDSSON et al., 2001). Acredita-se que a ação fagocitária dos PMN sobre bactérias e/ou espermatozóides resulte na liberação de $PGF_{2\alpha}$, o que estimularia contrações peristálticas miometriais, fenômeno este essencial para a limpeza do útero logo após a deposição do sêmen (TROEDSSON et al. 2001). Além disso, estudos experimentais em ovelhas e ratos descreveram um aumento localizado no útero de prostaglandina E_2 (PGE_2) e óxido nítrico, dois potentes vasodilatadores, em casos de processos inflamatórios endometriais (FANG et al., 1999; STILL & GREISS, 1978).

Estudo em éguas avaliadas por eletromiografia demonstrou um aumento na atividade miometrial a partir de 30 minutos pós-inseminação com sêmen fresco (TROEDSSON et al., 1998). Adicionalmente, uma segunda onda de atividade mioelétrica foi observada entre 4 e 12 horas pós-cobertura. Como a primeira onda de contrações uterinas é direcionada da cérvix em direção aos cornos uterinos, acredita-se que a mesma esteja relacionada com o transporte dos

espermatozóides para o oviduto. Já a segunda onda de contrações uterinas dá-se em sentido oposto, sendo provavelmente responsável pela eliminação dos restos celulares e possíveis patógenos do útero (TROEDSSON et al., 1998). Adicionalmente, Bollwein et al. (2003a) relataram um aumento na velocidade máxima média (TAMV) do fluxo sanguíneo das artérias uterinas 1 hora após a infusão tanto de sêmen fresco como somente de plasma seminal em éguas avaliadas por ultrassonografia Doppler. Este achado é sugestivo de que, assim como o aumento no influxo de PMN, um aumento do fluxo sanguíneo do útero também ocorre na primeira hora após a cobertura. Entretanto, parâmetros diretos do órgão alvo, como perfusão vascular uterina e índices Doppler mesometriais, não foram mensurados no estudo em questão.

2.2 Reconhecimento maternal da gestação

O Reconhecimento maternal da gestação é o evento através do qual o organismo da fêmea gestante previne a regressão do corpo lúteo (CL) na presença do embrião (GINTHER, 1992). O contato direto entre o concepto e endométrio ao longo de toda extensão do útero nos primeiros dias de gestação é necessário para prevenção da luteólise precoce.

O embrião equino entra no útero entre 144 e 156 horas pós-ovulação (BATTUT et al., 1997). Entretanto, a vesícula embrionária é detectada através da ultrassonografia somente entre nove e 13 dias pós-ovulação, sendo que em aproximadamente 60% dos casos o concepto é observado pela primeira vez no corpo do útero nove ou 10 dias após a ovulação (GINTHER, 1983a; LEITH & GINTHER 1984). Sabe-se que a vesícula embrionária secreta $PGF_{2\alpha}$ e PGE_2 (STOUT & ALLEN, 2002), fenômeno provavelmente responsável pelo estímulo contrátil peristáltico local do miométrio necessário para o deslocamento da vesícula ao longo do lúmen uterino durante as duas primeiras semanas de gestação (Allen 2001). Além da contratilidade, a presença do embrião afeta positivamente a turgidez uterina.

Estudos sugerem que a mobilidade embrionária ao longo do útero minimiza a produção endometrial de $PGF_{2\alpha}$ e conseqüentemente inibe a luteólise durante a fase inicial da gestação em éguas (GINTHER, 1992). É provável que a interação concepto-endométrio seja a responsável pela baixa concentração de receptores endometriais de oxitocina durante as primeiras semanas da gestação, e

secundariamente pela menor secreção de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero grávidico (SHARP et al. 1997; STARBUCK et al., 1998). A mobilidade embrionária intra-uterina aumenta progressivamente alcançando valores máximos entre 12 e 14 dias pós-ovulação, período no qual se desloca por todo o útero 10 a 20 vezes por dia (GINTHER, 1995). Esta mobilidade está ainda associada ao aumento da contratilidade uterina (CROSS & GINTHER, 1988; SILVA & GINTHER, 2006). Entretanto, o cessar da mobilidade embrionária é um fenômeno mecânico resultante do aumento nas dimensões da vesícula embrionária e do tônus uterino associado à diminuição em diâmetro do lúmen do útero (GINTHER, 1992; GINTHER 1995).

Mudanças na hemodinâmica do sistema reprodutivo durante a fase inicial da gestação foram descritas tanto em seres humanos como em equinos. Em humanos, a receptividade do endométrio, a implantação e o desenvolvimento do embrião são dependentes da adequada perfusão sanguínea do útero (STERZIK et al., 1989; CHIEN et al., 2004). Já durante a fase de mobilidade embrionária em éguas, alterações na perfusão vascular do endométrio ocorrem de forma localizada em associação com mudanças da posição do concepto. De acordo com Silva et al. (2005), éguas gestantes e não-gestantes apresentam similar e baixa vascularidade endometrial nos oito primeiros dias pós-ovulação. Entretanto, um aumento da perfusão sanguínea é notado a partir do dia 11 no endométrio de ambos os cornos uterinos de éguas gestantes. Um pronunciado aumento no corno que contém a vesícula, quando comparado com o corno contra-lateral, também é observado. Este aumento é ainda mais acentuado no tecido endometrial que está em contato direto com a vesícula embrionária quando comparado a segmentos adjacentes (SILVA et al., 2005). Lefranc & Allen (2007), ao estudarem a morfologia e densidade das glândulas endometriais de éguas gestantes, observaram hiperemia e menor densidade glandular na região da interação embrio-maternal. Por apresentarem propriedades vasoestimuladoras, estrógenos de origem embrionária podem estar relacionados com estas alterações na hemodinâmica uterina (LEWIS, 1989; WATSON & SERTICH, 1989; STOUT & ALLEN , 2002).

Diversos autores sugerem uma importante relação entre cistos uterinos e fertilidade em éguas. Em estudo utilizando histeroscopia e ecografia ultrassônica, éguas com cistos uterinos apresentaram um histórico de distúrbios de fertilidade

10% superior ao de éguas sem cistos uterinos (LEIDL et al., 1987). Tannus e Thun (1995) relataram que a taxa de prenhes no 14º e 40º dia de gestação é significativamente menor em éguas com cistos uterinos (77,6% e 71,4%, respectivamente) quando comparadas com éguas sem cistos uterinos (91,5% e 88,0%). Estudos baseados em exame histopatológico endometrial de éguas sugeriram a correlação negativa entre a taxa de concepção e a severidade das alterações degenerativas endometriais (DOIG et al., 1981, de la CONCHA-BERMEJILLO & KENNEDY, 1982). Entretanto, o histórico reprodutivo e o manejo dos animais podem ter influenciado o resultado. Estudos sugerindo o efeito negativo de patologias endometriais na gestação inicial foram previamente relatados. Porém nenhum trabalho específico em éguas foi realizado até o momento para avaliar a forma como a interação materno-fetal pode ser afetada.

Sabe-se que a vesícula embrionária apresenta a capacidade de deslocar-se sobre uma área cística (GINTHER & PIERSON, 1984). Entretanto, ainda é desconhecida a forma como uma extensa área cística pode afetar a fase de mobilidade vesicular e, consequentemente, a manutenção da gestação.

O cessar de movimento da vesícula embrionária é denominada fixação. Este fenômeno ocorre normalmente na base de um dos cornos uterinos entre os dias 15 a 17 dias pós-ovulação e se deve ao aumento do tônus uterino e ao aumento do diâmetro e volume vesicular (GINTHER, 1983b). A junção corpo-cornual é a principal região uterina a ser afetada por cistos (FERREIRA et al., 2008). Todavia, nenhum estudo foi realizado até o momento com o intuito de avaliar o efeito dos cistos e das degenerações histológicas uterinas na fixação e no desenvolvimento vesicular pós-fixação.

2.3 Idade da égua e eficiência reprodutiva

Na espécie equina, um declínio gradativo na capacidade reprodutiva é observado com o avançar da idade. A subfertilidade/infertilidade de éguas idosas pode dever-se à diminuição nas taxas de concepção ou ao aumento na taxa de morte embrionária precoce e abortamento. Quando comparado a animais jovens, éguas com idade ≥ 15 anos, apresentam uma maior taxa de perda embrionária, conforme o relatos de Carnevale *et al.* (2000) e Yang e Cho (2007). Muitos são os fatores relacionados com a queda na eficiência reprodutiva de éguas com idade superior a 15 anos, como por exemplo, o comprometimento da qualidade

oocitária, número de parições, distúrbios endócrinos, deficiência nutricional e anomalias anatômicas adquiridas do trato reprodutivo, entre outros (MCKINNON & VOSS, 1993; LEBLANC, 1997; CARNEVALE, 2008).

De acordo com Kupesic et al. (2003) mulheres idosas apresentam um número reduzido de folículos antrais e uma menor vascularidade ovariana quando comparados a indivíduos jovens. De forma semelhante, éguas velhas apresentam uma menor população folicular do que éguas jovens. Adicionalmente, estudos em éguas relatam uma irregularidade recorrente na ciclicidade estral de acordo com a idade (VANDERWALL et al., 1993a; CARNEVALE & GINTHER,1992). Segundo Ginther et al. (2008), uma deficiência na concentração sérica de LH é observado em éguas com idade > 20 anos, o que pode interferir no intervalo ovulatório destes animais. Éguas idosas apresentam uma menor taxa de crescimento folicular, além destes apresentarem diâmetro final progressivamente menor com o avançar da idade (MOREL et al., 2010). Outro fator ovariano que pode acarretar na diminuição da eficiência reprodutiva de equinos com idade avançada é o comprometimento da qualidade oocitária (BRINSKO et al., 1995). Estudos recentes demonstraram que oócitos oriundos de éguas idosas apresentam frequentes distúrbios na divisão meiótica e na maturação final (MOREL et al., 2010; LOSINNO, 2006).

Além de fatores ovarianos, o adequado ambiente uterino é essencial para a concepção e manutenção da gestação. Éguas velhas comumente são afetadas por distúrbios uterinos que podem interferir em sua eficiência reprodutiva. De acordo com LeBlanc (1997), éguas com idade avançada apresentam menor contratilidade uterina, baixa capacidade fagocitária e, consequentemente, menor eficiência na limpeza uterina via cervical e linfática, o que acarreta em um maior acúmulo de fluído intrauterino no período pós-cobertura e no aumento na incidência e intensidade de endometrites crônicas. Como já mencionado anteriormente, alterações degenerativas endometriais são mais intensas em éguas velhas com histórico reprodutivo de grande número de parições (GRÜNINGER et al., 1998). Este processo degenerativo, caracterizado pela intensificação das disfunções vasculares uterinas e aumento na severidade de fibrose endometrial e periglandular, provavelmente deve-se a grande distensão uterina ao longo da gestação e regressão pós-parto. Entretanto, de acordo com Ferreira et al. (2008), éguas nulíparas apresentam um aumento progressivo na

incidência de cistos uterinos de acordo com a idade (Tabela 1). Os cistos endometriais localizam-se principalmente na base dos cornos uterinos, o que possivelmente compromete o contato entre embrião e endométrio após o cessar da mobilidade embrionária e, posteriormente, o adequado desenvolvimento do concepto (Figura 1).

TABELA 1. Média±E.P.M. para a relação entre a frequencia, número de cistos e idade em 76 éguas. Adaptado de Ferreira et al. (2008).

	Grupos		
Parâmetro	**Cístico**	**Não-cístico**	**Probabilidade**
Número de éguas (%)	34 (44,7)	42 (55,3)	NS
Idade (anos)	14±0,9	10±0,7	*P*<0,0002
Frequência de éguas/idade (%)			
< 7 anos	2 (5,9)[a]	8 (19,0)[a]	*P*<0,008
7 – 14 anos	12 (35,3)[b]	23 (54,8)[b]	*P*<0,009
> 14 anos	20 (58,8)[c]	11 (26,2)[a]	*P*<0,03

[a,b,c] Letras diferentes na mesma coluna são diferentes (*P*<0,05).

FIGURA 1. Distribuição de cistos (número total e área cistica) em éguas nulíparas (n= 34 éguas com cistos uterinos detectados por ultrassonografia). Útero foi dividido em três porções (extremidade, intermediária e junção corpo-cornual) e cada porção consistia de três segmentos uterinos. Frequências ou médias com diferentes letras na mesma coluna são diferentes (*P*>0,05). Adaptado de Ferreira et al. (2008).

Regiões:	Cistos/égua	Área cistica/égua (mm²)
Total	12,5±2,1	497,6±118,2
Extremidade	1,6±0,3[a]	60,7±21,9[a]
Intermediária	5,4±0,9[b]	205,3±54,2[b]
Junções	5,5±0,9[b]	231,6±56,5[b]

2.4 Ultrassonografia doppler

A ultrassonografia Doppler é uma técnica não invasiva recentemente utilizada para a avaliação transretal do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo de animais de grande porte e é considerada como sendo uma das melhores técnicas disponíveis para o estudo *in vivo* da hemodinâmica uterina em éguas (GINTHER, 2007). O advento desta tecnologia nas pesquisas atuais tem possibilitado reavaliar conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução, assim como o aperfeiçoamento no diagnóstico e monitoramento da teriogenologia equina (FERREIRA & MEIRA, 2011).

Por fornecer detalhes anatômicos e informações imediatas sobre o fluxo sanguíneo de tecidos e órgãos, o exame doppler permite a avaliação de folículos, corpo lúteo, útero e concepto, além de ser uma técnica auxiliar para o diagnóstico de distúrbios na hemodinâmica do sistema reprodutivo. Entretando, apesar da comprovada aplicabilidade da tecnologia doppler como técnica auxiliar na reprodução assistida de equinos, novos estudos visando a determinar padrões de normalidade e posterior caracterização de distúrbios de fluxo sanguíneo de trato reprodutivo ainda se fazem necessários.

2.4.1 Produção de Imagem ultrassonográfica colorida

A produção de imagens ultrassonográficas colorida baseia-se no princípio do Efeito Doppler que propõe a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto em movimento em relação a um observador (GINTHER & UTT, 2004). A frequência de onda é constante quando observador e o objeto estão estáticos. Entretanto, em casos de movimento de aproximação e afastamento entre os mesmos, a frequência de ecos refletidos pelo objeto aumenta e diminui, respectivamente (Figura 2). Atualmente, o Princípio Doppler é rotineiramente utilizado para a mensuração de diferentes parâmetros, como temperatura e velocidade. Especificamente na ultrassonografia, este princípio pode ser utilizado para a avaliação objetiva e/ou subjetiva da perfusão sanguínea tecidual, sendo que a fonte de ondas ultrassônicas e o objeto estacionário são, respectivamente, as hemácias e o transdutor. Desta forma, alterações na velocidade e direção das hemácias são representadas por imagens ultrassonográficas com específicas cores e tonalidades (FERREIRA et al., 2011).

Frequência Doppler é a diferença entre a frequência de ecos recebidos e transmitidos pelo transdutor (Figura 3). A frequência emitida pelo transdutor é constante, enquanto que frequência de retorno dos ecos refletidos varia de acordo com o Princípio do Efeito Doppler. Desta forma, quando a fonte da onda (glóbulos vermelhos) está imóvel ou move-se paralelamente em relação ao transdutor não existe diferença entre as frequências transmitidas e de retorno e sinais coloridos Doppler não são detectados. Quando o fluxo sanguíneo move-se em direção ao transdutor a frequência de retorno é maior do que a transmitida, o que resulta em uma frequência Doppler positiva. Um sinal Doppler negativo é produzido quando a frequência de retorno é menor do que a frequência transmitida, ou seja, quando as hemácias movem-se em sentido oposto ao transdutor (GINTHER, 2007). Por convenção, sinais Doppler positivos e negativos são representados por pontos nas cores vermelha e azul, respectivamente.

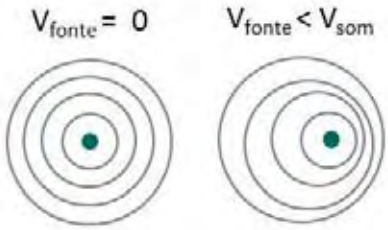

FIGURA 2. Seleção de imagens representativas do Princípio do Efeito Doppler. A frequência de ondas emitidas por um objeto em repouso ($V_{fonte} = 0$) em relação ao observador é constante, concentrica e igualmente espaçada. Caso o pulso seja emitido durante movimento relativo entre a fonte e observador, as frentes de ondas deixam de ser concentricas. Durante movimentos de aproximação e afastamento ($V_{fonte} < V_{som}$), a frequência de onda dos ecos aumente e diminui, respectivamente.

2.4.2 Modos de ação Doppler

Os atuais equipamentos ultrassonográficos Doppler apresentam três modos de ação distintos (Figura 4). O modo-B age de forma semelhante à ultrassonografia convencional ao utilizar imagens bidimensionais em escalas de cinza para a identificação anatômica de estruturas a serem posteriormente

avaliadas através dos modos coloridos, ou seja, Doppler e Espectral. O modo Doppler, subdividido em funções *Color e Power-flow*, baseia-se na sobreposição de pontos coloridos sobre uma imagem em modo-B e permite estimar a perfusão sanguínea tecidual, enquanto que o modo espectral fornece valores exatos de velocidades de fluxo sanguíneo e índices Doppler vasculares e teciduais (GINTHER & UTT, 2004).

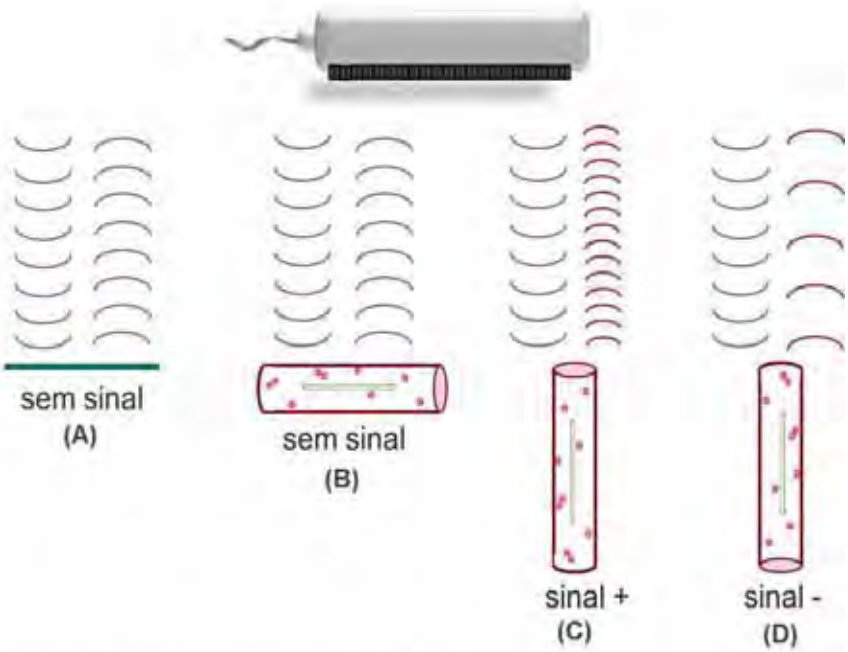

FIGURA 3. Imagens esquemáticas da alteração na Frequência Doppler durante o exame ultrassonográfico colorido. A Frequência Doppler varia conforme a movimentação das hemácias em relação ao transdutor. (A e B) A frequência de ecos emitidos e recebidos é igual em situações de ausência de movimento ou em movimentação perpendicular, o que resulta na ausência de sinais coloridos. (C) Durante um movimento de aproximação, a frequência recebida é maior do que a emitida gerando sinais positivos. (D) A frequência recebida é menor do que a emitida quando as hemácias deslocam-se em movimento de afastamento em relação ao transdutor, produzindo sinal doppler negativo.

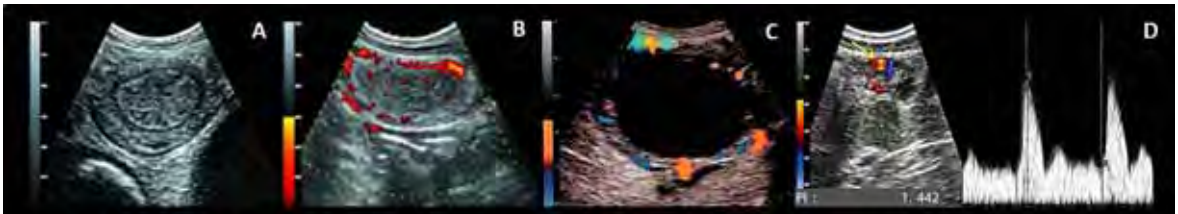

FIGURA 4. Seleção de imagens ultrassonográficas do trato reprodutivo de égua nos modos-B, Power-flow, Color-flow e Espectral (A, B, C e D, respectivamente). (A e B) Corte transversal de corno uterino não gestante em diestro durante exame ultrassonográfico modos B e Power-flow. (C) Avaliação colorida Doppler modo Color-flow de folículo pré-ovulatório. (B e C) A presença de pontos coloridos no tecido uterino (endométrio e miométrio) e parede folicular indicam o deslocamento de hemácias e permitem estimar a vascularidade tecidual. (D) Gráfico espectral formado pelos valores de velocidades máximas do fluxo sanguíneo em artéria localizada no mesométrio uterino.

Por meio da ultrassonografia Doppler modo Espectral é possível realizar um exame quantitativo da hemodinâmica do trato reprodutivo de éguas. No modo Espectral, variações nas velocidades do fluxo sanguíneo são representadas na forma de um gráfico de velocidade denominado espectro (Figura 5). O gráfico espectral fornece valores exatos de velocidade máxima do fluxo sanguíneo de uma artéria específica, dentre elas, velocidade de pico sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV) e velocidade máxima média (TAMV). PSV é o valor máximo ao longo do gráfico espectral, enquanto que EDV representa a velocidade final de um ciclo cardíaco. Já o TAMV é a média de todas as velocidades máximas de um ciclo cardíaco (GINTHER, 2007). Adicionalmente, utilizando os valores de velocidade de fluxo sanguíneo é possível determinar os índices Doppler vasculares (Índice de Resistência e Índice de Pulsatilidade), que são bons indicadores da perfusão vascular tecidual.

Ângulo Doppler ou ângulo de insonância é o ângulo de intersecção do pulso ultrassonográfico com a direção de movimento das hemácias. Para mensurar as velocidades de fluxo sanguíneo, inicialmente o equipamento ultrassonográfico determina a Frequência Doppler (FD). O Ângulo Doppler tem influência direta sobre a Frequência Doppler e, consequentemente, sobre a mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo (Figura 6).

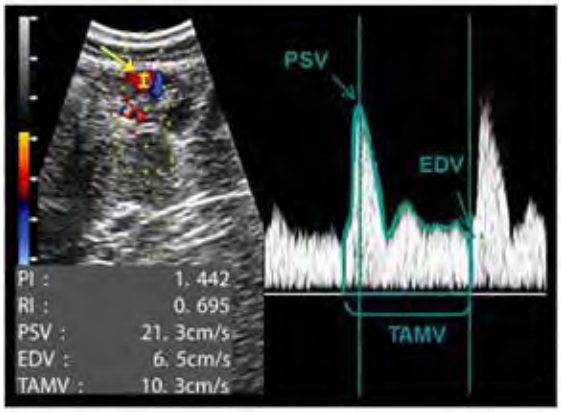

FIGURA 5. Avaliação ultrassonográfica Doppler modo-Espectral. O cursor (amarelo) é posicionado sobre uma artéria mesometrial (vermelho) para a captura de dados de velocidade de fluxo sanguíneo e geração de gráfico de velocidade espectral. Velocidades de pico sistólico (PSV) e diastólica final (EDV) são, respectivamente, as velocidades de fluxo sanguíneo máxima e final dentro de um ciclo cardíaco. TAMV é a média das velocidades máximas de um espectro. O equipamento doppler calcula automaticamente os Índices de Pulsatilidade e de Resistência (PI e RI, respectivamente) levando em consideração os valores de PSV, EDV e TAMV.

.

O modo Color-flow possibilita a avaliação qualitativa e em tempo-real do fluxo sanguíneo de diferentes tecidos e órgãos. Neste tipo de exame, a vascularidade de uma determinada estrutura é estimada subjetivamente considerando a extensão de tecido com pontos coloridos doppler sobrepostos sobre a imagem da mesma em modo-B durante um exame contínuo e em tempo real. Diferente do modo Espectral, este método de avaliação é simples, rápido e prático (FERREIRA & MEIRA, 2011).

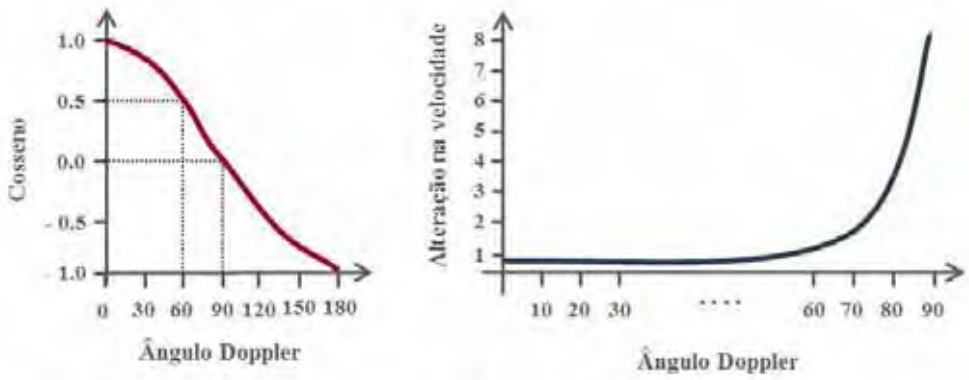

Figura 6. Valores de cosseno do Ângulo Doppler (cosΘ) e relação entre o Ângulo Doppler e acurácia na mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo. A determinação das velocidades de fluxo sanguineo varia de acordo com a Frêquencia Doppler (FD), onde FD = 2 ft. v. cosΘ /c. Quando o movimento das hemácias em relação ao transdutor é perpendicular (90°), o valor de cosΘ é zero e o equipamento não captura sinais Doppler. O valor de CosΘ é próximo à 1 quando 0° < Ângulo Doppler < 60°, não influenciando a mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo.

O modo Color-flow é subdividido em duas funções: *Color-flow e Power-flow*. A função faz uso de duas cores distintas, normalmente variações de azul e vermelho, para representar a movimentação das hemácias e, consequentemente, a perfusão sanguínea de uma estrutura. Além disso, as cores do pixel colorido indicam a direção das hemácias em relação ao transdutor. Por convenção, a cor vermelha indica fluxo sanguíneo deslocando-se em direção ao transdutor, enquanto que pontos azuis representam a movimentação de afastamento das glóbulos vermelhos em relação à probe. Adicionalmente, a intensidade das cores azul e vermelha sugere a velocidade do fluxo sanguíneo. Tonalidades escuras e claras indicam, respectivamente, velocidades lentas e rápidas (GINTHER &UTT, 2004).

Recentemente, a função *Power-flow* tem sido utilizado para a avaliação da vascularidade uterina e ovariana de animais de grande porte (SILVA & GINTHER, 2006; FERREIRA et al., 2008; GINTHER et al., 2008). Especificamente nesta função, a movimentação do fluxo sanguíneo é processada utilizando apenas uma cor e a intensidade dos pontos coloridos variam de acordo com a força dos sinais Doppler (número de hemácias movendo-se numa específica velocidade). A ultrassonografia Doppler modo *Power-flow* apresenta diversas vantagens em relação ao Doppler convencional tipo *Color-flow*. De acordo com Ginther (2007), o modo *Power-flow* apresenta maior sensibilidade à fluxos sanguíneos fracos e é independe do Ângulo Doppler (Figura 7). Além disso, imagens coloridas tipo *Power-flow* não são afetadas por artefatos do tipo aliasing. Desta forma, o modo *Power-flow* apresenta potencial para melhorar a avaliação de vasos de pequeno diâmetro e fluxo sanguíneo baixo, como os presentes no útero (mesométrio, endométrio e miométrio) e ovários (mesovario, CL e parede folicular) de éguas (GINTHER, 2007).

2.5 Biópsia uterina e alterações degenerativas endometriais

Lesões degenerativas do útero são associadas com subfertilidade e infertilidade em éguas (OIKAMA et al., 1993; NAMBO et al., 1995). Dentre as diversas técnicas para o estudo da causa de queda na fertilidade em éguas, a biópsia uterina possui destacada relevância por permitir a avaliação de forma simples e rápida de anomalias endometriais visíveis somente através de microscopia (KENNEY, 1978). A biópsia uterina em éguas seguida do exame

histopatológico tem como principal objetivo avaliar a futura habilidade de um útero em prover ambiente e nutrição adequados para a sobrevivência e desenvolvimento do potro desde a concepção até o parto. Além de ser uma técnica auxiliar para o diagnóstico de alterações patológicas associadas com a subfertilidade em éguas, a biópsia pode ainda ser utilizada para o monitoramento da resposta do útero a terapias especificas (KENNEY, 1977). Esta tem sido uma ferramenta de grande importância no meio científico da reprodução equina nas últimas quatro décadas e embora o tipo de informação obtida através do exame histopatológico seja limitado, ele ainda é considerado um exame fundamental para a avaliação da saúde do endométrio. Desta forma, a biópsia uterina seguida do exame histopatológico é indicada para a investigação detalhada de anormalidades uterinas potencialmente prejudiciais ao normal funcionamento do endométrio (Tabela 2).

TABELA 2. Indicações para biópsia uterina em éguas*.

Indicações
Infertilidade
Repetição de cio
Anormalidades macroscópicas do trato genital
Anestro durante a estação de monta
Piometra ou mucometra
Morte embrionária/fetal precoce e recente
Receptoras de embriões de alto valor genético
Pesquisas experimentais

* Adaptado de Snider et al. (2011).

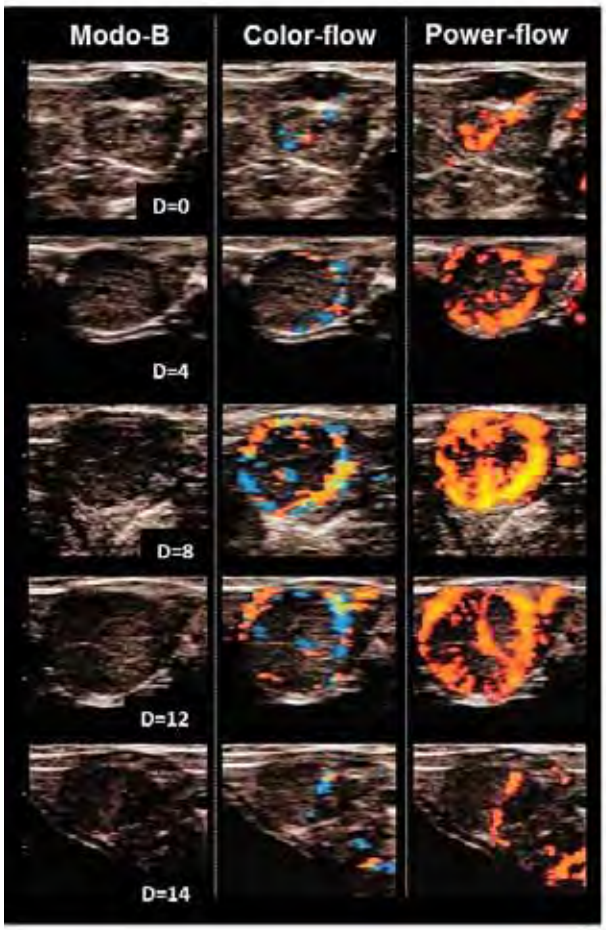

Figura 7. Seleção de imagens ultrassonográficas modos-B, Color e Power-flow do corpo lúteo equino. Demonstração da maior sensibilidade do modo Power-flow para a captura de sinais Doppler de fluxos sanguíneos fracos e lentos, como os presentes no trato reprodutivo de éguas. Sonogramas na mesma linha foram obtidos simultâneamente. Dia da ovulação foi considerado dia zero do ciclo estral (D=0). Quantidade e intensidade de pontos coloridos Doppler presentes no interior e periferia do CL indicam a perfusão sanguínea luteal. Em um mesmo momento, a quantidade e intensidade de pixels coloridos no modo Power-flow é maior do que a visualizada no modo Color-flow. Fonte: Adaptado de Ginther (2007).

2.5.1 Obtenção, fixação e coloração de amostras endometriais

O procedimento para obtenção de amostras endometriais através da técnica de biópsia uterina é de fácil execução, segura e não afeta da eficiência reprodutiva da égua desde que sejam tomadas medidas adequadas de higiene (WATSON, 1992). A técnica foi descrita de forma minuciosa na literatura (BRACHER et al., 1992; KENNEY & DOIG, 1986; RICKETTS, 1975). A coleta do material deve ser precedida pelo exame físico do animal, além da palpação transretal e exame ultrassonográfico do trato reprodutivo. Em seguida, deve-se realizar a adequada higienização da genitália externa, assim como o esvaziamento do reto para facilitar a manipulação do útero por via transretal. Amostras de endométrio são coletadas com o auxilio de uma pinça de biópsia que deve ser introduzida no útero por via transcervical e guiada manualmente por via transretal. Caso anormalidades macroscópicas não sejam detectadas por palpação e exame ultrassonográfica, recomenda-se realizar o procedimento na

região dorsal da junção entre os cornos e corpo uterino. Entretanto, amostras da região ventral do útero são igualmente satisfatórias (KENNEY & DOIG, 1986). Por ser um procedimento rápido e indolor, a sedação do animal não se faz necessária.

Além dos cuidados ao realizar a coleta da amostra endometrial, o tipo de fixador e método de inclusão do material obtido são fundamentais para o sucesso da análise histopatológica. Entretanto, a literatura ainda diverge quanto ao melhor procedimento para fixação e preservação de amostras endometriais.

Autores consagrados na literatura específica sobre o assunto recomendam a fixação de fragmentos endometriais em solução de Bouin por crerem que este propicie um maior enrijecimento tecidual e melhor preservação dos detalhes anatômicos endometriais (KENNEY & DOIG, 1986; RIKETTS, 1975, VAN CAMP, 1988). Porém, os autores atuais tendem a utilizar soluções de formalina 10% para fixação de amostras uterinas devido à preocupação crescente com os cuidados ao utilizar materiais danosos a saúde (SNIDER et al., 2011). Ao comparar o efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias de endométrio equino, Amaral et al. (2004) observaram grau mais acentuado de retração do epitélio de revestimento nas amostras fixadas em Bouin, enquanto que a fixação em formalina resultou em menor produção de artefatos e melhor resolução das células ao microscópio de luz, permitindo um estudo citológico mais acurado do endométrio eqüino.

Por ser um fixador não coagulante, a fixação com formalina resulta em ligações cruzadas entre moléculas do fixador e macromoléculas teciduais de forma a preservar uma maior quantidade de moléculas de água ligadas ao tecido e macromoleculares tissulares e, consequentemente, maior estabilidade estrutural e melhor preservação histológica (FOX et al., 1985; SESSO, 1998). Fixadores coagulantes como a solução de Bouin causam a despolarização das proteínas tissulares o que acarreta na perda de homogeneidade celular, o que dificulta a visualização de detalhes histológicos (COLE & SYKES, 1974; LOCQUIN & LANGERON, 1983).

Por prover contraste de cores e riqueza de detalhes anatómicos suficientes para a avaliação histopatológica, a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) é rotineiramente utilizada (KENNEY & DOIG, 1986). Porém, outras colorações

podem ser utilizadas, como por exemplo o Tricomero de Masson e ácido periódico-Schiff (PAS), entre outros (SNIDER et al., 2011).

2.5.2 Avaliação e classificação histopatológica

A fibrose degenerativa endometrial é um processo patológico progressivo e irreversível caracterizado pelo fibrosamento periglandular e/ou do estroma endometrial, o que acarreta no comprometimento da funcionalidade glandular e, posteriormente, na capacidade do útero em manter a gestação (Figura 8; Hoffman et al., 2003). A idade avançada em éguas pode ser acompanhada por aumento na severidade de fibrose endometrial e intensificação das disfunções vasculares uterinas (DOIG et al., 1981, OIKAWA et al., 1993, NAMBO et al., 1995; GRÜNINGER et al., 1998, SCHOON et al., 1999). Entretanto, estes estudos não levaram em consideração o efeito do histórico reprodutivo das éguas. Estudo retrospectivo de 3,804 biópsias uterinas em éguas demonstrou a íntima relação entre a severidade das alterações degenerativas endometriais e idade do animal (RICKETTS & ALONSO, 1991). Ao estudarem a morfologia de vasos sanguíneos endometriais de éguas por meio da histologia, Grüninger *et al.* (1998) demonstraram que o endométrio de éguas velhas são frequentemente afetados por alterações angioescleróticas e que a incidência e a severidade de alterações vasculares uterinas apresentam correlação com a idade e o número prévio de gestações.

FIGURA 8. Seleção de imagens de amostras de biópsia uterina (a, b e c) com diferentes intensidades de alterações degenerativas endometriais. (a) Processo inflamatório crônico caracterizado por infiltrado inflamatório de leucócitos mononuclear no estrato esponjoso. (b) Dilatação cistica e severa fibrose periglandular. (c) Serevas dilatações cisticas e fibrose periglandular difusa. Adaptado de Ginther (1992).

Estudo recente em éguas relatou que animais subférteis/inférteis apresentam elastose vascular uterina mais intensa do que éguas férteis (ESTELLER-VICO et al., 2010). Adicionalmente, Ferreira et al. (2008) descreveram uma reduzida perfusão vascular uterina em éguas de acordo com a presença de cistos uterinos. É possível que o comprometimento da vascularidade uterina comprometa o desenvolvimento das glândulas endometriais, a contratilidade uterina, a resposta inflamatória pós-cobertura e o desenvolvimento do concepto.

O endométrio equino é formado pelo epitélio luminal e pela lâmina própria. O epitélio luminal é constituído por células secretoras e ciliadas, enquanto que a lâmina própria é formada por tecido conjuntivo, glândulas endometriais, vasos sanguíneos e linfáticos. O epitélio luminal reveste internamente o lumen uterino, já a lâmina própria estende-se da membrana basal ao miométrio (KENNEY, 1978). A classificação do grau de alterações degenerativas é realizada através do exame histopatológico de amostras endometriais obtidas através de biópsia uterina como descrito anteriormente por Kenney & Doig (1986) e leva em consideração a morfologia das alterações adquiridas e a extensão das mesmas (Tabela 3).

TABELA 3. Classificação do útero de éguas de acordo com a intensidade de degeneração endometrial. Baseado em Kenney & Doig (1986).

Categoria	Principais achados histológicos	Eficiência reprodutiva (%)
I	- Essencialmente normal - Inflamação e fibrose discretos e dispersos	80-90
IIA	- Inflamação leve e dispersa; - fibrose leve	50-80
IIB	- Inflamação moderada e dispersa - Fibrose moderada	10-50
III	- Inflamação e fibrose severa - alterações endometriais irreversíveis	10

Acredita-se que uma amostra de biópsia uterina represente entre somente 0,1-0,2% da área total da superfície endometrial (KENNEY & DOIG, 1986; KENNEY, 1975). De acordo com autores diversos (RICKETTS, 1975; KENNEY, 1978; BLANCHARD et al.,1987) esta pequena amostra obtida na região de junção entre o corpo e cornos uterinos é representativa para a classificação do grau de degeneração endometrial do órgão como um todo. Entretanto, estudo recente (FIALA et al., 2010a) relatou uma maior variedade na intensidade de fibrose endometrial em regiões distintas de um mesmo útero e sugere a classificação do grau de degeneração endometrial a partir de múltiplas amostras.

Objetivos e Hipóteses

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

O presente trabalho foi desenvolvido na forma de dois experimentos com o objetivo principal de avaliar, através da ultrassonografia modo-B e Doppler, a relação entre a presença de degenerações endometriais com a hemodinâmica uterina de éguas durante o período posterior à infusão de sêmen por meio da inseminação artificial e durante a fase inicial da gestação. Adicionalmente, o efeito da idade das éguas nos mesmos fenômenos também foi analisado. Os objetivos específicos do **Experimento 1** foram testar as seguintes hipóteses: a) a perfusão sanguínea e a contratilidade uterina de éguas aumentam em resposta a infusão de sêmen, b) a perfusão sanguínea e contratilidade uterina após a inseminação artificial são menores em éguas com degeneração endometrial moderada ou severa quando comparadas a éguas com úteros com ausência de alterações degenerativas, c) após a infusão de sêmen, úteros categoria I apresentam menor índice de resist6encia mesometrial e maiores velocidades de fluxo sanguíneo do que úteros das categorias IIA, IIB e III, e d) a idade do animal apresenta correlação negativa com a atividade contrátil e perfusão sanguínea do útero no período pós-inseminação artificial (IA). Já no **Experimento 2**, as hipótese testadas foram: a) o útero gestante e não gestante apresentam perfusão sanguínea semelhantes durante os primeiros 10 dias pós-ovulação, b) a idade apresenta efeito negativo sobre a hemodinâmica do útero gravídico, c) quanto maior a severidade das alterações histológicas endometriais menor será a perfusão sanguínea do útero gravídico, d) o útero gestante e com alto comprometimento endometrial apresenta maior índice de resistência mesometrial e menor perfusão sanguínea uterina do que o útero gestante com ausência de alterações degenerativas, e) a mobilidade e o desenvolvimento embrionário são afetados negativamente pela presença de severas degenerações endometriais, f) a inadequada interação embrio-maternal acarreta na regressão do CL durante a fase da gestação.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e seleção de acordo com a idade e classificação histológica uterina

No estudo em questão foram utilizados 72 éguas com idade entre 5 a 25 anos em bom estado corpóreo. As éguas foram mantidas no CERBEQ, Centro de Reprodução Equina do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Unesp campus Botucatu-SP. Os animais foram alimentados com feno Coast-Cross (*Cynodon Dactylon*), concentrado, suplementação mineral e água *ad libidum*. Somente éguas cíclicas e com temperamento dócil foram utilizadas.

Características de dentição foram usadas para determinar a idades das éguas (American Association of Equine Practitioners Manual 2002). Posteriormente, esta classificação foi utilizada para formação dos grupos experimentais (jovem, adulto e velho) e, consequentemente, na avaliação do efeito da idade sobre cada parâmetro.

Previamente ao início do estudo uma biópsia uterina foi coletada de cada égua para classificação histológica do útero de acordo com a intensidade de processos degenerativos endometriais. As amostras endometriais foram obtidas na região de junção entre os cornos e corpo uterino com o auxílio de uma pinça de biópsia (modelo Botupharma) de forma semelhante ao descrito anteriormente por Kenney & Doig (1986). Após a coleta, as amostras foram fixadas em formalina 10% durante 24 horas, conservadas em álcool 70º GL, desidratadas em série crescente de álcoois e incluídas em resina plástica à base de glicol metacrilato (AMARAL et al., 2004).

Uma vez processadas, as amostras uterinas foram avaliadas e classificadas de acordo as alterações histológicas (Tabela 3) em uma das quatro categorias previamente descritas por Kenney & Doig (1986). Categoria: I (endométrio essencialmente normal; inflamação e fibrose discretas e dispersas), IIA (presença de inflamação leve e dispersa; fibrose leve), IIB (presença de infiltrado inflamatório moderado e difuso e de fibrose periglandular moderada), ou III (presença de severo infiltrado inflamatório e severa fibrose periglandular).

4.2 Ultrassonografia modo-B e Doppler

As éguas foram avaliadas através de ultrassonografia modo-B e modo-color Doppler utilizando equipamento ultrassonográfico colorido SONOACE PICO (Medison) equipado com transdutor multi-frequencial (5 a 9 Mhz) linear endocavitário de banda larga (LV5-9CDn, 60mm). O exame ultrassonográfico em modo-B do trato reprodutivo baseou-se nos princípios, técnicas e interpretação descritos por Ginther (1995). Brilho e contraste do monitor foram mantidos constantes ao longo de todo o estudo (GASTAL et al., 1998a).

Imagens ultrassônicas em modo-B do útero e ovário foram utilizadas para a identificação anatômica das estruturas para posterior avaliação através de exame ultrassonográfico colorido. Além disso, a ultrassonografia convencional foi utilizada para realizar o diagnóstico de ovulação e gestação e para avaliação de parâmetros diversos, como contratilidade uterina, área luteal e diâmetro da vesícula embrionária (Figura 9).

Ultrassonografia Doppler função *Power-flow* foi utilizada para a avaliação qualitativa do fluxo sanguíneo uterino e luteal (Figura 9). Pulse range velocity, ganho Doppler e filtro foram mantidos foram constantes durante a coleta de dados (Ginther, 2007). Adicionalmente, esta função foi utilizada para obter um corte transversal do mesométrio uterino, o que possibilitou a posterior avaliação quantitativa do fluxo sanguíneo do útero através da ultrassonografia Doppler modo Espectral (Figura 9). Para a obtenção do corte transversal do mesométrio, o transdutor foi posicionado dorso-caudal e a 1 cm da superfície da base de ambos os cornos, direcionado cranialmente, e levemente rotacionado em seu eixo vertical (SILVA et al., 2005).

O útero das éguas gestantes foi dividido em nove segmentos virtuais de tamanho semelhante (Figura 10), como previamente descrito por Ginther (1995): corno esquerdo anterior (CEA), corno esquerdo médio (CEM), corno esquerdo posterior (CEP), corno direito anterior (CDA), corno direito médio (CDM), corno direito posterior (CDP), corpo uterino anterior (UA), corpo uterino médio (UM), e corpo uterino posterior (UP). Os nove segmentos uterinos foram utilizados para identificar três porções uterinas distintas, como proposto por Ferreira *et al*. (2008): extremidades uterinas (CEA, CDA, e UP), segmentos centrais (CEM, CDM, e UM) e junção corpo-cornual (CEP, CDP, e UA). Segmentos e porções uterinas foram utilizados para avaliar a mobilidade vesicular no segundo experimento.

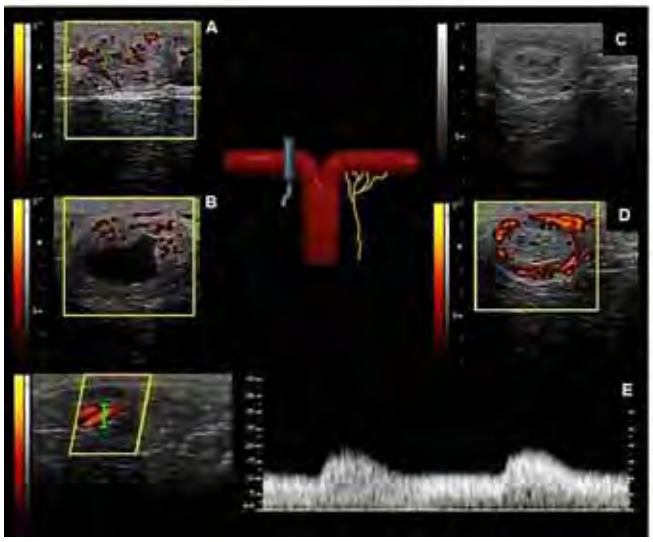

FIGURA 9. Diagrama de útero e mesométrio equino com imagens representativas da avaliação ultrassonográfica convencional e colorida Doppler do útero, corpo lúteo e artéria mesometrial. Imagens ultrassonográficas Doppler função Power-flow de corte transversal de corno uterino não gravídico e gravídico (A e B, respectivamente). (C) Imagem ultrassonográfica modo-B de corpo lúteo cavitário para mensuração de área e volume e identificação anatômica para posterior avaliação da hemodinâmica luteal. (D) Avaliação subjetiva da vascularidade luteal através de exame Doppler função Power-flow. Perfusão vascular uterina (A e B) e luteal (D) foram estimados levando em consideração a quantidade e intensidade de sinais coloridos Doppler sobrepostos sobre imagem do correspondente tecido em modo-B. (E) Cursor (verde) posicionado sobre artéria mesometrial e grafico de velocidade espectral. Através da avaliação Doppler modo-Espectral foram determinadas as velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial e índices Doppler uterinos.

4.3 Acompanhamento do desenvolvimento folicular, detecção da ovulação e inseminação artificial

Todas as éguas foram examinadas diariamente por meio da ultrassonografia modo-B para o controle do desenvolvimento folicular e detecção da ovulação (D0). A inseminação artificial foi realizada em dias alternados a partir do dia de detecção ultrassonográfica de edema uterino associado à folículo com diâmetro superior a 35 mm e com indícios da iminência de ovulação, como proeminência da banda anecóica, perda do formato esférico, edema uterino evidente, entre outros (GASTAL et al., 1998a). Éguas do Experimento 2 foram tratadas com 2500 UI de hCG 24 horas antes da inseminação artificial.

Para ambos os experimentos foi utilizado sêmen oriundo de um único garanhão com fertilidade conhecida. A coleta de sêmen foi realizada entre 12 e 15 horas antes da inseminação artificial utilizando vagina artificial (modelo Botupharma) à 42ºC. O eaculado foi filtrado para retirada da fração seminal pobre, composta por gel oriundo das vesículas seminais. Posteriormente, a fração rica do sêmen foi diluída (relação 2:1 ou 3:1) em meio próprio para transporte (BotuSÊMEN; Botupharma) e refrigerado em container comercial (BotuBOX; Botupharma) à 15ºC. A concentração espermática do ejaculado a ser utilizada foi de 50 x 10^6/ml com 50 a 70% de motilidade espermática progressiva em um volume total de 20-30mL.

4.4 Grupos experimentais

4.4.1 Experimento 1: Hemodinâmica e contratilidade uterina no período pós-IA de éguas com idades distintas e diferentes graus de degeneração endometrial

Para estudar os efeitos das alterações degenerativas endometriais sobre a hemodinâmica e contratilidade uterina após a inseminação artificial foram utilizadas 18 éguas classificadas de acordo com as alterações degenerativas endometriais visualizadas por exame histopatológico, como descrito anteriormente. Uma vez classificados, os animais foram distribuídas dentro de três grupos experimentais (n = 6 éguas/grupo): GI (endométrio categoria I), GII (endométrio categoria IIA e IIB), e GIII (endométrio categoria III).

Para verificar o efeito da idade sobre as mesmas variáveis foram utilizadas 12 éguas, divididas em dois grupos experimentais (n=6 éguas/grupo) de acordo com a idade: Grupo Jovem e Grupo Velho. O Grupo Jovem foi composto por éguas com idade ≤ seis anos, enquanto que éguas ≥ 15 anos formaram o Grupo Velho.

4.4.2 Experimento 2: Influência das características endometriais e idade sobre o desenvolvimento embrionário, perfusão sanguínea uterina e características luteais durante a fase inicial da gestação

No segundo experimento foi avaliado o efeito de anormalidades histológicas e da idade dos animais sobre a hemodinâmica uterina durante os primeiros 20 dias pós-ovulação.

Inicialmente, avaliou-se o efeito da concepção e inicio da gestação sobre a hemodinâmica uterina independente da idade e achados histopatológicos endometriais. Para tanto, 25 éguas previamente inseminadas artificialmente foram distribuídas em dois grupos experimentais de forma retrospectiva de acordo com a visualização da vesícula embrionária: Grupo Gestante e Grupo Não Gestante (n=18 e 7 éguas/grupo, respectivamente). Foram consideradas éguas não gestantes aquelas nas quais a vesícula embrionária não foi visualizada através de exame ultrassonográfica até D12 (Dia da ovulação = D0).

Com o objetivo de avaliar o efeito das alterações degenerativas do endométrio sobre a hemodinâmica uterina ao longo dos 20 primeiros dias da gestação, 18 éguas foram distribuídas de acordo com a classificação histológica

do endométrio, em três grupos experimentais (n= 6 éguas/grupo): Grupo 1 (categoria I), Grupo 2 (categoria IIA e IIB) e Grupo 3 (categoria III).

Por fim, visando determinar o efeito da idade sobre a hemodinâmica uterina no período inicial da gestação, 17 éguas foram distribuídas em três grupos experimentais de acordo com a idade dos animais: Grupo Jovem (idade ≤ 6 anos; n=6 éguas/grupo), Grupo Adulto (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos; n=6 éguas/grupo) e Grupo Velho (idade ≥ 15 anos; n=5 éguas/grupo).

4.5 Parâmetros avaliados

Para todos os animais do Experimento 1 foram avaliados os seguintes parâmetros: perfusão sanguínea e contratilidade uterina, fluxo sanguíneo mesometrial, área mesometrial, velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial e índices Doppler mesometriais. Já no Experimento 2, além dos parâmetros avaliados no primeiro experimento, outros quatro novos foram aferidos: desenvolvimento da vesícula embrionária, concentração sérica de progesterona, dimensão (área e volume) e perfusão sanguínea luteal. A coleta de dados foi realizada sem o conhecimento prévio da idade e classificação histológica dos animais. Desta forma evitou-se um possível efeito do operador sobre valores de parâmetros qualitativos, como perfusão sanguínea e contratilidade uterina.

No experimento 1 a coleta de dados teve inicio entre 6:00 AM e 7:00 AM. Já no segundo experimento a avaliação dos animais foi realizada sempre no período da manhã, ou seja, entre 6:00AM e 12:00PM.

4.5.1 Perfusão sanguínea uterina

A perfusão sanguínea do utero foi avaliada inicialmente de forma subjetiva, através de ultrassonografia Doppler função *Power-flow*, levando em consideração a extensão de tecido uterino (endométrio e miométrio) com pontos coloridos Doppler durante exame contínuo e em tempo real de no mínimo um minuto. O procedimento foi realizado em ambos os cornos uterinos. A perfusão sanguínea uterina foi classificada de 1 a 4 (mínima a máxima, respectivamente). Os três segmentos distintos de cada corno uterino (anterior, médio e posterior) eram avaliados e o maior escore observado foi utilizado para classificar a perfusão sanguínea (Figura 10). Todos os exames ultrassonográficos foram gravados e transferidos para computador portátil através do programa Adobe Premiere Pro

1.5 (TIFF format; Adobe Systems, San Jose, CA) para possível análise objetiva da perfusão sanguínea uterina de forma semelhante ao descrito recentemente por Silva & Ginther (2010).

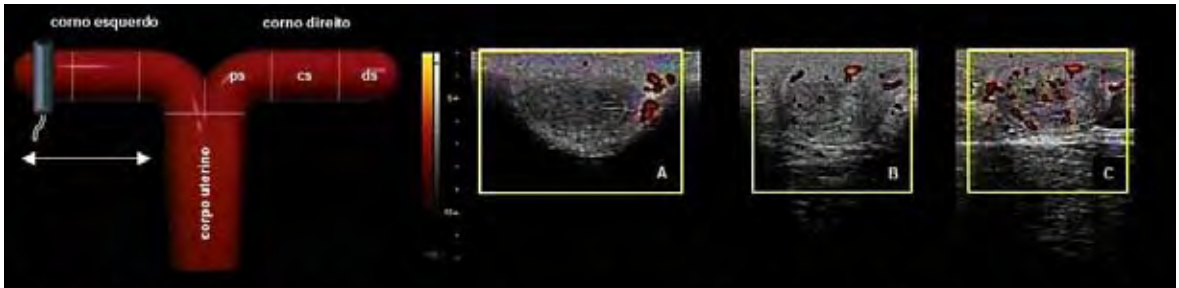

FIGURA 10. Diagrama de útero equino com imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão sanguínea utilizando ultrassonografia Doppler. Ambos os cornos uterinos foram divididos em três segmentos semelhantes: porções proximal, central e distal (ps, cs e ds, respectivamente). Posição e direção de movimento do transdutor sobre o útero (seta branca) durante o exame são apresentadas. Imagens do corte transversal do corno uterino no modo Doppler função Power-flow (A, B e C). Segmentos distintos de um mesmo corno uterino podem apresentar escores perfusão sanguínea diferentes, variando entre baixa (A) a alta (B e C) vascularidade. Ao avaliar a perfusão sanguínea, os três segmentos de cada corno (ps, cs e ds) e todas as camadas (endométrio e miométrio) do útero devem ser considerados.

No experimento 1, a perfusão sanguínea dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao folículo ovulatório foi coletado imediatamente antes (h0) da inseminação artificial e a cada hora durante as 12 primeiras horas pós-IA (h1-12). No Experimento 2, o mesmo parâmetro foi avaliado uma vez ao dia a partir do dia da ovulação (D0) até o vigésimo dia da gestação (D20). Especificamente no Grupo Não Gestante a avaliação da perfusão sanguínea do útero foi realizada durante os 12 primeiros dias pós-ovulação.

4.5.2 Contratilidade uterina

A contratilidade uterina foi classificada de 1 (mínimo) a 4 (máximo) através de exame ultrassonográfico modo-B durante exame em tempo real e contínuo de no mínimo um minuto em vista longitudinal do corpo uterino, como descrito anteriormente por Cross & Ginther (1988). No Experimento 1, o parâmetro foi estimado imediatamente após cada avaliação da perfusão vascular uterina, totalizando 13 avaliações (h0-12). Já no Experimento 2, a avaliação foi feita diariamente entre D0 e D20 em éguas gestantes e entre D0 e D12 em éguas não gestantes.

4.5.3 Fluxo sanguíneo mesometrial

O fluxo sanguíneo mesometrial de ambos os cornos uterinos foi avaliado através ultrassonografia Doppler função *Power-flow* e classificado de 1 (vascularidade mínima) a 4 (vascularidade máxima) como descrito por Ferreira et al. (2008). No Experimento 1, o parâmetro foi estimado imediatamente após a avaliação da contratilidade uterina. No segundo experimento, o exame foi realizado a cada 24 horas a partir de D0 até D20 no Grupo Gestante. No Grupo Não Gestante a vascularidade mesometrial foi estimada entre D0 e D12.

4.5.4 Área mesometrial

Para mensuração da área mesometrial (cm^2), os mesométrios de ambos os cornos uterinos foram avaliados através de ultrassonografia modo-B. As duas maiores imagens congeladas do corte transversal de cada mesométrio foram utilizadas para a mensuração da área mesometrial e a média foi utilizada para a análise estatística (FERREIRA et al., 2008). Em ambos os experimentos o parâmetro foi coletado imediatamente depois da avaliação do fluxo sanguíneo mesometrial.

4.5.5 Velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial e índices Doppler uterino

Os valores de velocidade de fluxo sanguíneo mesometrial e índices Doppler uterino foram coletados em artérias do mesométrio de ambos os cornos uterinos por meio de ultrassonografia Doppler modo-Espectral. Foram mensurados: índice de resistência (RI), índice de pulsatilidade (PI), velocidade de pico sistólico (PSV) e velocidade diastólica final (EDV). Inicialmente, o mesométrio uterino era identificado através da ultrassonografia modo-B. Em seguida as artérias mesometriais eram visualizadas utilizando a ultrassonografia Doppler função *Power-flow*. Um gráfico de velocidade espectral com no mínimo três ciclos cardíacos semelhantes era gerado e um destes ciclos foi utilizado para mensuração dos parâmetros citados anteriormente. O procedimento era repetido mais duas vezes e a média das três mensurações foi utilizada para a análise estatística como descrito por Silva et al. (2005) e Ferreira et al. (2008).

No experimento 1, os parâmetros espectrais foram mensurados imediatamente antes e cada hora após a inseminação artificial. No segundo

experimento, a coleta de dados foi realizada a cada 24 horas a partir de D0 até D12 (éguas não gestantes) ou D20 (éguas gestantes).

4.5.6 Mobilidade Embrionária

A mobilidade embrionária foi avaliada para determinar o dia de cessar da vesícula embrionária. Para tanto, o útero foi dividido em nove segmentos imaginários como citado anteriormente. Após a detecção da vesícula embrionária, sua mobilidade foi monitorada diariamente a cada cinco minutos e por um intervalo de duas horas até o dia de término da fase de mobilidade embrionária (LEITH & GINTHER, 1985, SILVA et al., 2005). O cessar da mobilidade embrionária foi considerado como sendo o primeiro dia em que a vesícula permanecia no mesmo segmento uterino durante um exame diário completo de duas horas consecutivas (GINTHER, 1983). Adicionalmente, o cessar da mobilidade embrionária era confirmado no dia subsequente pela a presença da vesícula no mesmo segmento uterino do dia anterior.

4.5.7 Desenvolvimento embrionário

Durante a avaliação do desenvolvimento embrionário, diâmetro (mm^2) e volume (mm^3) da vesícula embrionária eram mensurados uma vez ao dia a partir do dia de sua visualização até o D20. O acompanhamento do desenvolvimento embrionário foi realizado fazendo uso da ultrassonografia modo-B. Diâmetro e volume foram obtidos pela média das mensurações de duas imagens distintas congeladas. O exame foi realizado imediatamente antes da avaliação diária da mobilidade embrionária.

4.5.8 Concentração de progesterona e características de corpo lúteo

A determinação da concentração plasmática de progesterona (P4) foi realizada visando verificar a ocorrência da uma possível luteólise funcional durante a fase inicial da gestação e sua correlação com a perfusão sanguínea do corpo lúteo. A luteólise foi considerada completa como sendo o dia em que a concentração plasmática de progesterona era menor que 2ng/mL (GINTHER et al., 2006). Para a análise da concentração plasmática de P4, amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular em tubos heparinizados, a cada 24 horas a partir de D0 até D20 nas éguas gestantes e até D12 em éguas não

gestantes. Após a coleta e centrifugação (2000 rpm/10 min), o plasma era estocado (-20º C) para posterior análise. Os ensaios de P4 foram realizados utilizando o método de radio-imunoensaio, utilizando Kits comerciais DPC-Medlab. O coeficiente de variação (C.V.) intra e inter-ensaio foi respectivamente de 12,4% e 12,6%. A sensibilidade (dose mínima detectável média) dos ensaios foi de 0,0026 ng/ml.

Área (cm^2), volume (cm^3) e perfusão sanguínea luteal (0 a 100%) foram os parâmetros do CL avaliados por ultrassonografia convencional e colorida. A coleta de dados foi realizada a cada 24 horas em éguas gestantes e não gestantes previamente à colheita de sangue. Área e volume luteal foram determinados pela média das duas maiores imagens congeladas do CL em corte transversal através da ultrassonografia modo-B. Já a perfusão sanguínea luteal foi avaliada qualitativamente, através ultrassonografia Doppler função *Power-flow*, estimando-se a porcentagem (0 a 100%) de tecido luteal com sinais coloridos Doppler, como descrito anteriormente por Ginther (2007).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

No estudo em questão foi realizada análise de variância para medidas repetidas denominada *Two Way Reapeted Measures* (ANOVA) para a avaliação entre dados obtidos em ambos os cornos uterinos (contra-lateral *versus* ipsi-lateral à ovulação e contra-lateral *versus* ipsi-lateral ao embrião) ao longo do tempo de acordo com o experimento (a cada hora e durante 13 horas ou a cada 24 horas durante 20 dias nos experimentos 1 e 2, respectivamente) dentro de cada grupo. Quando a análise foi significativa o teste de média utilizado foi Tukey à 5% de probabilidade. Probabilidades ≤0,05 indicam diferença estatística. Dados são apresentados por Média±E.P.M.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1

Ao avaliar todas as éguas independente a classificação histológica (n=18), um aumento na perfusão sanguínea de ambos os cornos uterinos, ipsi e contra-lateral à OV, foi detectado em h2 (*P*<0,001). Um segundo aumento de menor intensidade na vascularidade uterina foi observado em h8 (Figura 11). Ao distribuir os animais de acordo com os achados histopatológicos, não houve diferença estatística significativa (*P*>0,05) para vascularidade uterina entre cornos ipsi e contra-lateral a OV e entre a interação cornos uterinos *versus* momento. Éguas do Grupo GI apresentaram vascularidade uterina estatisticamente constante durante as 12 primeiras horas pós-IA (*P*>0,05), enquanto que éguas GII e GIII apresentaram aumento significativo (*P*<0,001) na perfusão sanguínea do útero em h2. Um segundo aumento na vascularidade uterina foi observado em h8 somente em éguas GII (Tabela 4). Entretanto, não foi detectado efeito de grupo (GI, GII e GIII) para a vascularidade uterina de ambos os cornos uterinos. A vascularidade média do útero de éguas GII foi significativamente maior (*P*<0,001) quando comparada a de éguas GI e GIII, que foram estatisticamente semelhantes (Tabela 4 e Figura 12).

Não foi observado efeito do lado da ovulação sobre os índices Doppler (RI e PI) nas 12 primeiras horas pós-cobertura independente do grupo experimental (GI, GII e GIII). Desta forma a média dos valores obtidos em ambos os cornos uterinos foi utilizada para a análise estatística. Ao desconsiderar o grupo experimental (GI, GII e GIII), não houve diferença estatística para PI e RI quando comparada a interação entre lados e momentos. Entretanto, éguas GI avaliadas individualmente apresentaram uma diminuição significativa (*P*<0,001) em h12 para ambos os índices Doppler. Em GII, não houve diferença estatística significativa (P>0,05) para RI e PI mesometriais entre lados, momentos, bem como entre a interação lados versus momentos. Éguas do grupo GIII apresentaram uma diminuição significativa (*P*<0,001) de RI em h2 e h7, enquanto que o PI manteve-se constante (P>0,05) ao longo das 12 horas pós-cobertura (Tabela 5 e 6).

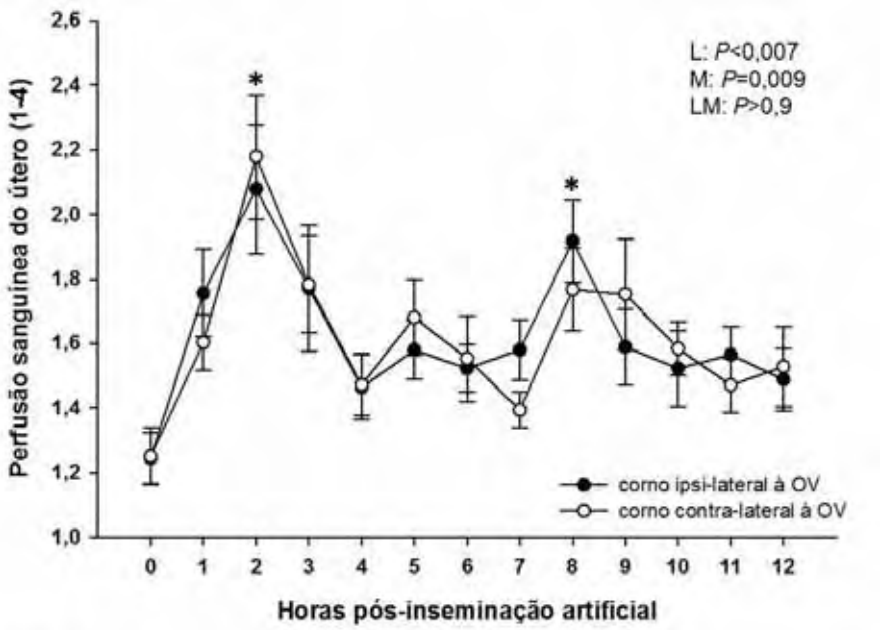

FIGURA 11. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas (n=18) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à h0 são indicados por asterisco.

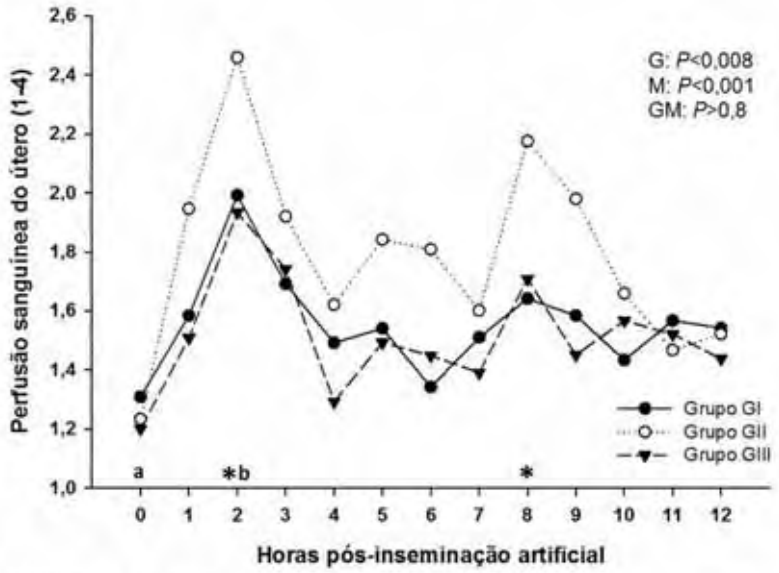

FIGURA 12. Média para perfusão sanguínea do útero (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos endometriais(Grupos GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina de éguas GII em relação à h0 são indicados por asterisco. (a, b) Letras diferentes indicam diferença estatisca (P<0,05) entre momentos para éguas GIII.

TABELA 4. Média±E.P.M de perfusão sanguínea média (1-4) de ambos os cornos uterinos de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (n= 6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1.

	Grupo experimental *		
Horas pós-IA	**GI**	**GII**	**GIII**
0	1,31±0,11	1,23±0,13c	1,20±0,06b
1	1,58±0,14	1,95±0,15abc	1,51±0,10ab
2	1,99±0,23	2,46±0,22a	1,93±0,25a
3	1,69±0,25	1,92±0,18abc	1,74±0,19ab
4	1,49±0,13	1,62±0,13bc	1,29±0,08b
5	1,54±0,10	1,84±0,15abc	1,49±0,10ab
6	1,34±0,06	1,81±0,17abc	1,45±0,07ab
7	1,51±0,11	1,56±0,09bc	1,39±0,09ab
8	1,64±0,15	2,18±0,17ab	1,71±0,11ab
9	1,58±0,12	1,98±0,23abc	1,45±0,5ab
10	1,43±0,07	1,66±0,15bc	1,57±0,13ab
11	1,57±0,13	1,47±0,11bc	1,52±0,06ab
12	1,54±0,14	1,52±0,13bc	1,44±0,13ab
Média	1,56±0,01D	1,78±0,01E	1,56±0,02D

a, b, c Letras minúsculas na mesma coluna são diferentes (P<0,05).
D, E Letras maiúsculas na mesma coluna apresentam diferença estatística (P<0,05).
* Classificação de acordo com os achados histológicos endometriais

Com relação às velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial (PSV e EDV), não foi observada diferença estatística entre os cornos uterinos (ipsi e contra-lateral) assim como entre a interação cornos uterinos *versus* momento durante as 12 primeiras horas pós-IA em nenhum dos grupos experimentais (dados não apresentados).

Os valores para fluxo sanguíneo e área mesometrial foram inconsistentes e pouco confiáveis ao longo da coleta de dados. Consequentemente, ambos os parâmetros foram excluídos do presente estudo.

TABELA 5. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (n= 6 éguas / grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1.

	Grupo experimental #			
Horas pós-IA	**GI**	**GII**	**GIII**	**Total (n=18)**
0	1,28±0,10	1,49±0,13	1,87±0,17	1,53±0,08
1	1,13±0,14	1,50±0,10	1,67±0,12	1,43±0,08
2	0,96±0,09	1,51±0,14	1,40±0,09	1,29±0,07
3	1,40±0,12	1,43±0,08	2,16±0,15	1,67±0,09
4	1,20±0,11	1,56±0,19	1,63±0,11	1,46±0,09
5	1,10±0,07	1,43±0,11	1,65±0,16	1,39±0,08
6	1,35±0,08	1,33±0,10	1,61±0,10	1,43±0,06
7	1,09±0,07	1,25±0,10	1,25±0,10	1,19±0,05
8	1,13±0,06	2,24±0,09	1,79±0,11	1,39±0,07
9	1,12±0,10	1,46±0,13	1,57±0,10	1,38±0,07
10	1,06±0,08	1,36±0,07	1,59±0,13	1,34±0,07
11	0,86±0,05	1,30±0,10	1,68±0,09	1,28±0,07
12	0,80±0,06*	1,47±0,13	1,94±0,10	1,40±0,10

Classificação de acordo com os achados histológicos endometriais
Ω Horas pós-inseminação artificial
* Diferença estatística em relação a hora 0 (P<0,001).

TABELA 6. Média±E.P.M para índice de resistência uterina (RI) mesometrial de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (n= 6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1.

	Grupo experimental #			
Horas pós-IA	**GI**	**GII**	**GIII**	**Total (n=18)**
0	0,62±0,02	0,72±0,03	0,78±0,02	0,70±0,02
1	0,59±0,03	0,70±0,02	0,74±0,03	0,67±0,02
2	0,54±0,03	0,71±0,03	0,66±0,02	0,64±0,02
3	0,66±0,03	0,68±0,01	0,83±0,02	0,73±0,02
4	0,62±0,03	0,69±0,04	0,74±0,02	0,68±0,02
5	0,61±0,02	0,69±0,03	0,73±0,03	0,68±0,02
6	0,66±0,02	0,67±0,04	0,71±0,03	0,68±0,02
7	0,64±0,03	0,64±0,02	0,62±0,03	0,63±0,02
8	0,63±0,02	0,67±0,02	0,77±0,03	0,69±0,02
9	0,61±0,03	0,67±0,03	0,70±0,02	0,66±0,02
10	0,59±0,03	0,69±0,02	0,71±0,03	0,66±0,02
11	0,51±0,02	0,66±0,02	0,73±0,01	0,63±0,07
12	0,48±0,02*	0,71±0,03	0,74±0,01	0,64±0,02

Classificação de acordo com os achados histológicos endometriais
* Diferença estatística em relação hora 0 (P<0,001)

Ao avaliar as éguas de acordo com a idade, não foi detectado efeito de lado da ovulação sobre a hemodinâmica uterina nas 12 primeiras horas pós-inseminação. Desta forma a média dos valores obtidos em ambos os cornos uterinos foi utilizada para análise estatística. No Grupo Jovem, não houve diferença significativa (P>0,05) para perfusão sanguínea do útero entre cornos uterinos (ipsi e contra-lateral a OV), momentos (h0 até h12), bem como entre a interação cornos uterinos *versus* momentos. Entretanto, no Grupo Velho foi observada diferença estatística (P<0,001) quando comparado os momentos independentes dos cornos uterinos. Éguas idosas apresentaram um aumento progressivo na vascularidade uterina em h1 e h2. Outros dois aumentos na perfusão sanguínea do útero foram detectadas em h8 e h11 (Figura 13). Os

valores médios de vascularidade uterina em h2 e h8 dos Grupos Jovem e Velho foram estatisticamente semelhantes (*P*>0,05). Entretanto, éguas velhas apresentaram menor perfusão sanguínea do útero em h0 do que éguas jovens (1,09±0,08 e 1,43±0,14, respectivamente; *P*<0,05).

Em ambos os grupos classificados pela idade (Jovem e Velho), não houve diferença estatística significativa (*P*>0,05) para os índices Doppler (PI e RI) e para as velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial (PSV e EDV) entre cornos uterinos (ipsi e contra-lateral a OV) e entre a interação cornos uterinos *versus* momentos durante as 12 primeiras horas após a infusão de sêmen. Os valores médios de PI e RI durante as 12 primeiras horas pós-inseminação artificial de éguas com idades distintas são apresentados na Tabela 7.

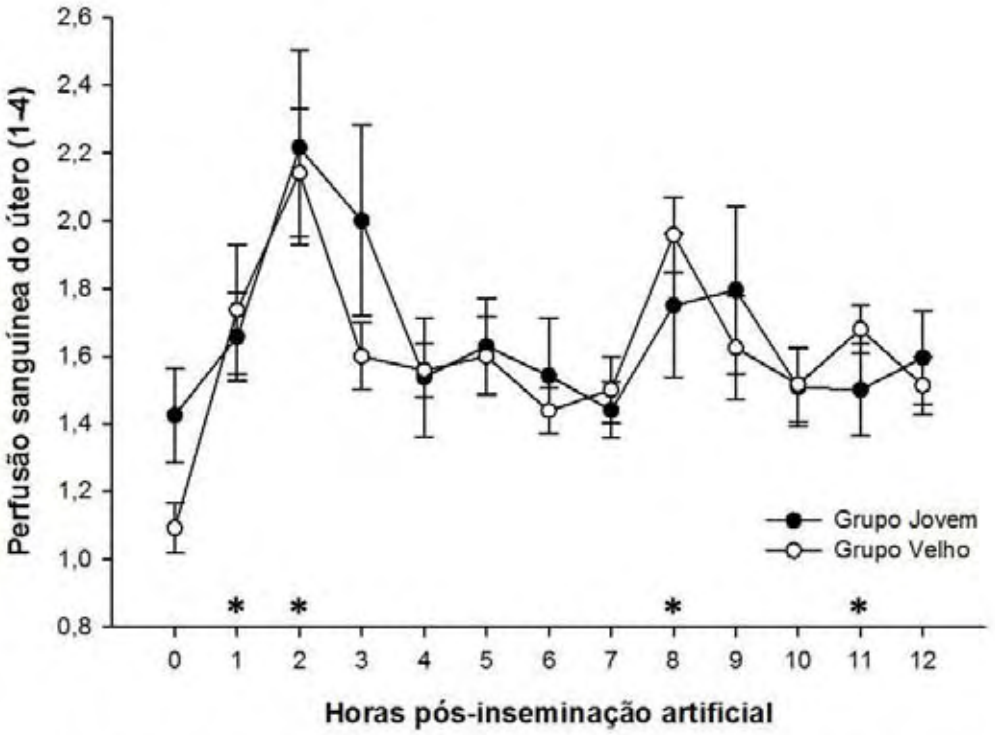

FIGURA 13. Média±E.P.M para perfusão sanguínea do útero (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de éguas classificadas de acordo com idade (Grupo Jovem e Velho; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à h0 em éguas do grupo Velho são indicados por asterisco.

Tabela 7. Média±S.E.M para índice de pulsatilidade e resistência uterina (PI e RI, respectivamente) de éguas classificadas de acordo com a idade (Grupo Jovem e Velho; n= 6 éguas / grupo) durante as 12 primeiras horas pós-cobertura. Experimento 1.

	Grupo Jovem *		Grupo Velho ᵕ	
Momento Ω	**PI**	**RI**	**PI**	**RI**
0	1,49±0,13	0,69±0,03	1,76±0,16	0,77±0,03
1	1,43±0,12	0,68±0,03	1,46±0,16	0,67±0,04
2	1,25±0,14	0,62±0,04	1,43±0,15	0,67±0,03
3	1,50±0,15	0,69±0,04	1,99±0,16	0,78±0,03
4	1,26±0,11	0,63±0,03	1,57±0,14	0,72±0,03
5	1,32±0,11	0,65±0,03	1,49±0,17	0,67±0,03
6	1,52±0,10	0,70±0,02	1,39±0,10	0,68±0,03
7	1,19±0,06	0,65±0,02	1,37±0,08	0,67±0,01
8	1,40±0,11	0,71±0,03	1,51±0,12	0,71±0,03
9	1,31±0,11	0,65±0,03	1,40±0,09	0,67±0,02
10	1,21±0,12	0,61±0,03	1,46±0,12	0,68±0,03
11	1,25±0,08	0,65±0,02	1,33±0,11	0,64±0,03
12	1,28±0,10	0,63±0,02	1,41±0,12	0,67±0,02

* Éguas com idade ≤ seis anos; ᵕ Éguas com idade ≥ 15 anos
Ω Horas pós-inseminação artificial

A contratilidade uterina pós-AI não foi afetada pelo intensidade de alterações degenerativas endometriais ou idade dos animais. Não houve diferença estatística (*P*>0,05) para contratilidade uterina entre grupos (classificação histológica ou idade) e entre a interação grupos *versus* momentos (entre h0 e h12). Entretanto, foi observado efeito de momento independente do grupo experimental. Um aumento significativo (*P*<0,001) da contratilidade uterina foi detectado em todos os animais em h1 e h2 em todos os grupos experimentais classificados de acordo com os achados histológicos e idade (Figura 14 e 15, respectivamente). Nos demais momentos a contratilidade uterina foi estatisticamente semelhante à observada em h0.

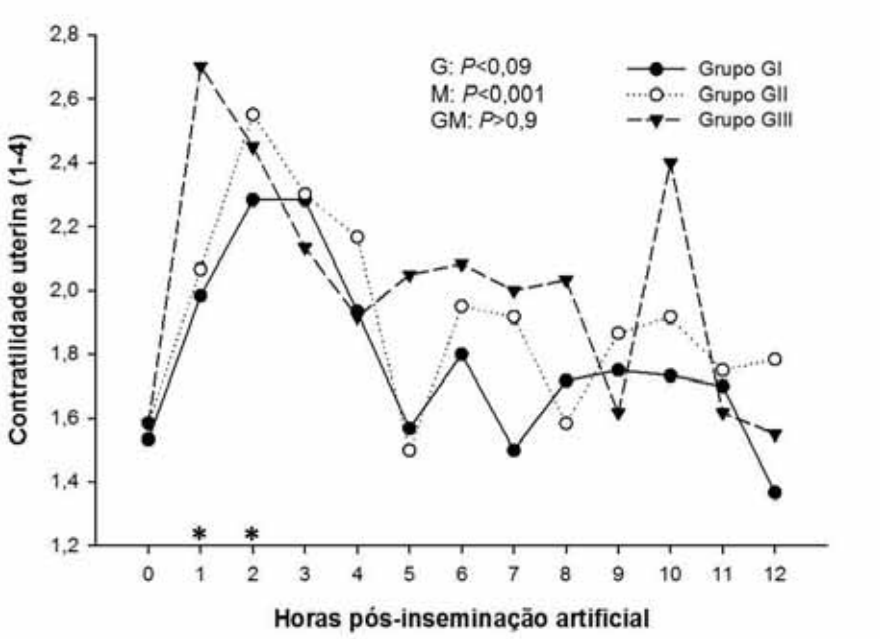

FIGURA 14. Média para contratilidade uterina de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos endometriais(Grupos GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (P<0,05) na contratilidade uterina em relação à h0 nos três grupos experimentais são indicados por asterisco.

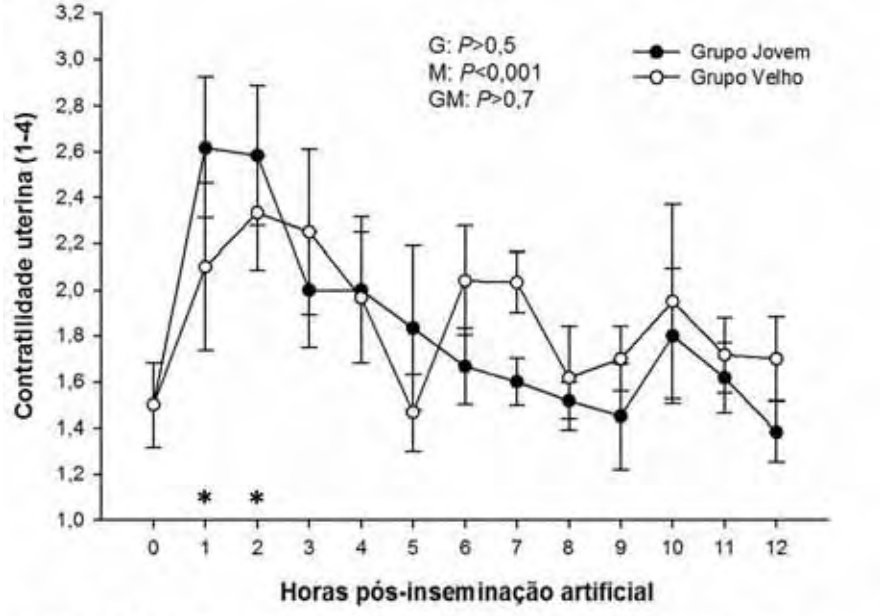

FIGURA 15. Média±E.P.M para contratilidade uterina de éguas classificadas de acordo com idade (Grupo Jovem e Velho; n=6 éguas/grupo) durante as 12 primeiras horas pós-IA. Experimento 1. Aumentos significativos (P<0,05) na contratilidade uterina em relação à h0 em ambos os grupos experimentais são indicados por asterisco.

6.2 Experimento 2

Inicialmente foi avaliado o efeito da gestação sobre a hemodinâmica uterina durante os 12 primeiros dias pós-ovulação. Em ambos os grupos (Gestante e Não Gestante) não foi detectado efeito do corno uterino (ipsi *versus* contra-lateral à OV) para os índices Doppler, velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial e perfusão sanguínea uterina. Portanto, a média dos valores dos dois cornos uterinos foi utilizada para análise estatística. Um aumento significativo (P<0,001) na perfusão sanguínea do útero foi observado em D4 de éguas gestantes e não gestantes. Adicionalmente um aumento progressivo da vascularidade uterina foi detectado em D12 em relação à D9 em éguas gestante. Em éguas não gestantes, a vascularidade uterina nos demais dias foi estatisticamente semelhante ao observado em D0 (Figura 16). Foi detectada diferença estatística (P<0,01) entre grupos (Gestante e Não Gestante) e entre momentos, mas não entre a interação grupo *versus* momentos para a perfusão sanguínea dos cornos ipsi e contra-lateral à OV avaliados individualmente. A vascularidade uterina média de ambos os cornos do Grupo Gestante (1,76±0,01) foi significativamente maior do que a do Grupo Não Gestante (1,35±0,05) nos primeiros 12 dias da gestação. Quando avaliados individualmente, um aumento significativo na perfusão sanguínea do útero em D4 foi detectado nos cornos ipsi e contra-lateral do Grupo Gestante e Não Gestante.

No Grupo Não Gestante, uma diminuição significativa de PI foi detectada em D3-4 e, posteriormente, em D7 e 8, independente dos cornos uterinos (P<0,001, Tabela 8). Em relação a D1, uma diminuição progressiva de PI entre D3 e D4 e a partir de D9 foi detectada em éguas gestantes (P<0,001). Entretanto, estes valores foram estatisticamente semelhantes ao observado em D0 (Tabela 8). Não houve diferença estatística significativa (P>0,05) para RI entre cornos uterinos e entre a interação cornos uterinos *versus* momentos (D0-12) nos grupos Gestante e Não Gestante. Efeito de momento para RI foi observado em ambos os grupos experimentais (P<0,001). Em relação à D1, valores diminuídos de RI foram detectados entre D3-4 e D7-8 no Grupo Não Gestante e somente em D12 no Grupo Gestante (Tabela 8). Não foi detectada diferença estatística (P>0,1) entre grupos Gestantes e Não Gestantes para o valor médio de PI e RI durante os primeiros 12 dias pós-ovulação. Em ambos os grupos experimentais, não foi detectada diferença estatística para EDV e PSV quando comparados cornos

uterinos, momentos e interação entre cornos uterinos e momentos durante os 12 primeiros dias pós-ovulação (dados não apresentados).

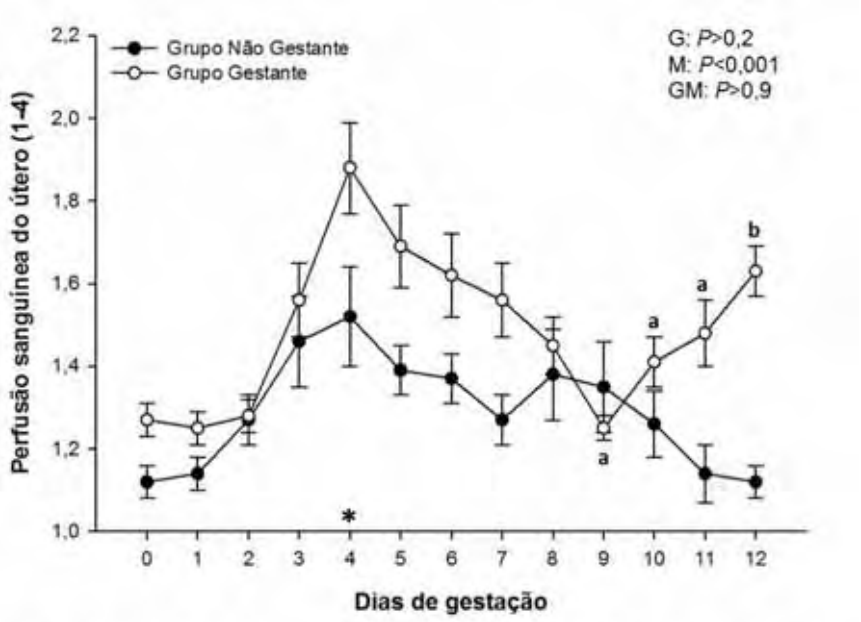

FIGURA 16. Média±E.P.M para perfusão sanguínea do útero (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de éguas gestantes e não gestantes (n=18 e 7 éguas/grupo, respectivamente) durante os 12 primeiros dias pós-ovulação. Experimento 2. Aumento significativo (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 em éguas do grupo gestantes e não gestantes são indicados por asterisco. Aumento siginificativo (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D9 é indicado por letras diferentes (a,b).

Ao comparar o efeito da idade sobre a hemodinâmica uterina de éguas gestantes não foi detectado efeito da posição do CL (cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação) independente do momento para perfusão sanguínea e índices Doppler. Logo, os valores médios de ambos os cornos uterinos foram utilizados para a posterior avaliação do efeito do momento de acordo com a idade das éguas.

TABELA 8. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade e resistência (PI e RI, respectivamente) mesometrial de éguas gestantes e não gestantes (n= 18 e 7 / grupo, respectivamente) durante os 12 primeiros dias pós-ovulação. Experimento 2.

	Grupo Gestante		Grupo Não Gestante	
Horas pós-IA	**PI**	**RI**	**PI**	**RI**
0	1,44±0,07ab	0,70±0,01a	1,42±0,08a	0,69±0,02ab
1	1,56±0,07a	0,72±0,02a	1,63±0,08a	0,75±0,02a
2	1,23±0,11abc	0,67±0,02abc	1,29±0,08ab	0,67±0,02ab
3	1,16±0,07bcde	0,64±0,02abcde	1,17±0,07b	0,62±0,03b
4	1,19±0,06bcde	0,63±0,02abcde	1,19±0,11b	0,63±0,04b
5	1,28±0,08abcde	0,63±0,02abcde	1,25±0,10ab	0,66±0,03ab
6	1,40±0,07abc	0,66±0,02abcd	1,29±0,12ab	0,66±0,03ab
7	1,29±0,07abcde	0,69±0,01ab	1,06±0,07b	0,62±0,03b
8	1,36±0,07abcd	0,70±0,04ab	1,02±0,09b	0,63±0,02b
9	1,24±0,07bcde	0,66±0,02abcd	1,29±0,11ab	0,67±0,03ab
10	1,22±0,08bcde	0,66±0,02abcd	1,61±0,10a	0,75±0,02a
11	1,11±0,07cde	0,64±0,02abcde	1,42±0,11ab	0,70±0,03ab
12	1,00±0,05e	0,61±0,02cde	1,40±0,08ab	0,70±0,02ab

a, b, c, d, e Letras minúsculas na mesma coluna são diferentes (P<0,05)

Um aumento precoce em D4 da perfusão sanguínea do útero foi observado somente no Grupo Jovem (Figura 17). Não foram detectadas alterações na perfusão sanguínea durante os primeiros 12 dias de gestação nos Grupos Adulto e Velho (Figuras 18 e 19, respectivamente). Ao comparar somente os cornos contra-laterais à OV entre os três grupos idade (Jovem, Adulto e Velho), não foi observada diferença estatística (P>0,05) para vascularidade uterina durante os 12 primeiros dias pós-OV. Da mesma forma, a perfusão sanguínea do corno ipsi-lateral à OV foi baixa e estatisticamente semelhante (P>0,05) entre D0 e D2 e entre D7-12 nos três grupos experimentais. Entretanto, a vascularidade do corno ipsi-lateral à OV do grupo Velho foi maior do que no grupo Adulto e estatisticamente semelhante ao do Grupo Jovem entre D3 e D6 (P<0,001).

Valores médios da perfusão sanguínea dos cornos uterino ipsi-lateral à OV durante os primeiros 12 dias da gestação de éguas com idades distintas são apresentados na Tabela 9.

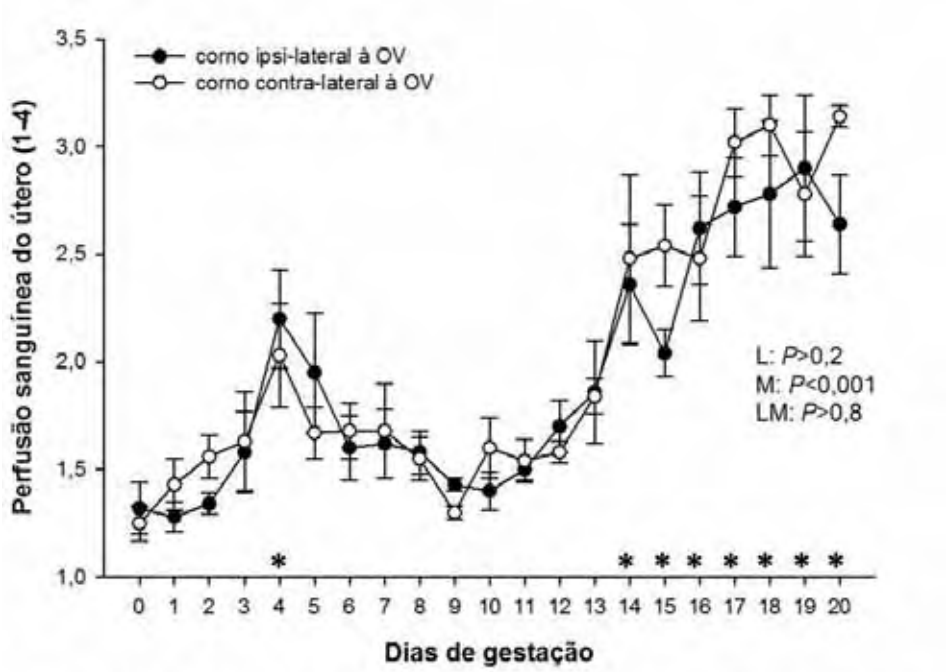

FIGURA 17. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas jovens (idade ≤6 anos; n=6 éguas) durante os 20 primeiros dias de gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

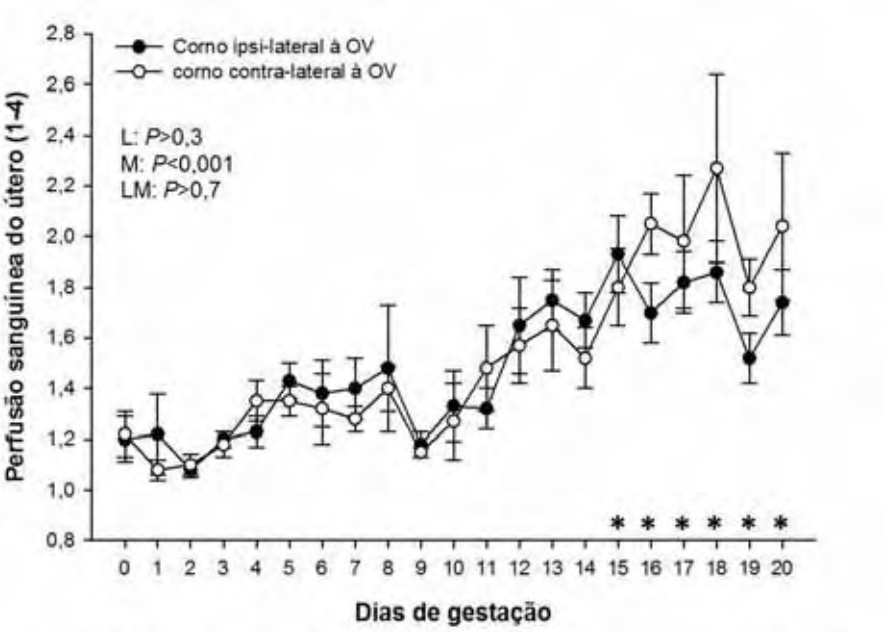

FIGURA 18. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas adultas (8 anos ≤idade ≤12 anos; n=6 éguas) durante os 20 primeiros dias de gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

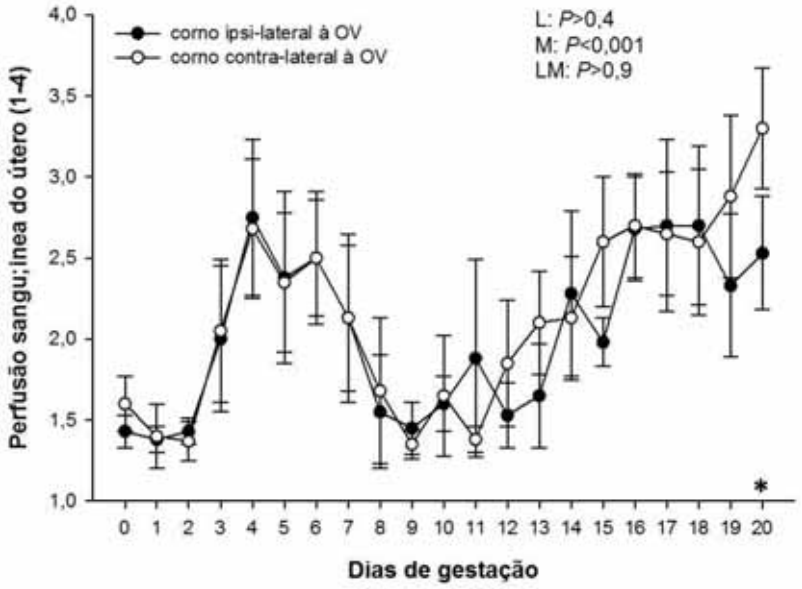

FIGURA 19. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas velhas (idade ≥15 anos; n=6 éguas) durante os 20 primeiros dias de gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

Desconsiderando a localização do embrião, um aumento progressivo na perfusão sanguínea do útero de éguas gestantes foi detectado a partir de D14 e D15 nos grupos Jovem e Adulto, respectivamente (Figuras 17 e 18). No grupo Velho, foi detectada diferença estatística para vascularidade uterina somente em D20 (Figura 19). Entretanto, ao comparar a vascularidade de cornos ipsi e contra-lateral a OV entre os grupos Jovem e Velho não foi detectada diferença estatística para perfusão sanguínea uterina entre D12 e D20 (Tabela 10).

TABELA 9. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (1-4) do corno uterino ipsi-lateral à ovulação de éguas gestantes com idades distintas (Grupos Jovem, Adulto e Velho; n=6 éguas/grupo) durante os 12 primeiros dias da gestação. Experimento 2.

	Grupo experimental *		
Dias de gestação	**Jovem**	**Adulto**	**Velho**
0	1,32±0,12a	1,20±0,09a	1,43±0,01a
1	1,28±0,07a	1,22±0,16a	1,38±0,08a
2	1,34±0,05a	1,08±0,03b	1,43±0,08 a
3	1,58±0,19ab	1,20±0,03b	2,00±0,45a
4	2,20±0,23a	1,23±0,06b	2,75±0,48a
5	1,95±0,28ab	1,43±0,07b	2,38±0,53a
6	1,60±0,15b	1,38±0,13b	2,50±0,41a
7	1,62±0,16a	1,40±0,12a	2,13±0,52a
8	1,58±0,10a	1,48±0,25a	1,55±0,32a
9	1,43±0,03a	1,18±0,05a	1,45±0,16a
10	1,40±0,09a	1,33±0,14a	1,60±0,17a
11	1,50±0,05a	1,32±0,08a	1,88±0,61a
12	1,70±0,12a	1,65±0,19a	1,53±0,20a

a, b Letras minúsculas na mesma linha são diferentes (P<0,05).
* Classificação de acordo com a idade: Grupo Jovem (idade ≤ 6 anos), Grupo Adulto (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos) e Grupo Velho (idade ≥ 15 anos)

TABELA 10. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (1–4) dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulução de éguas gestantes jovens e velhas (n=6 éguas/grupo) entre os dias 12 e 20 da gestação. Experimento 2.

	Corno ipsi-lateral à OV		Corno contra-lateral à OV	
Dias de gestação	**Jovem**	**Velho**	**Jovem**	**Velho**
12	1,70±0,12a	1,53±0,20a	1,58±0,05c	1,85±0,39c
13	1,86±0,24a	1,65±0,32a	1,84±0,08c	2,10±0,32c
14	2,36±0,28a	2,28±0,51b	2,48±0,39c	2,13±0,38c
15	2,04±0,11a	1,98±0,15a	2,54±0,19c	2,60±0,40c
16	2,62±0,26a	2,68±0,32a	2,48±0,29c	2,70±0,32c
17	2,72±0,23a	2,70±0,53a	3,02±0,16c	2,65±0,38d
18	2,78±0,34a	2,70±0,49a	3,01±0,14c	2,60±0,45c
19	2,90±0,34a	2,33±0,44a	2,78±0,29c	2,88±0,50c
20	2,64±0,23a	2,33±0,35a	3,14±0,05c	3,30±0,37c

a, b Perfusão sanguínea do corno ipsi-lateral à ovulação de éguas jovens e velhas são diferentes (P<0,05).
c, d Letras diferentes para perfusão sanguínea do corno contra-lateral diferem estatisticamente (P<0,05).

Ao avaliar os índices Doppler uterinos (RI e PI) independente da localização do embrião de éguas gestantes com idades distintas, diferenças estatísticas foram detectadas levando-se em consideração D1 como referencial. Uma diminuição significativa para RI foi detectada em D5, D14 e D20 no Grupo Jovem (P<0,01). Éguas do Grupo Adulto apresentaram uma diminuição progressiva (P<0,001) de RI a partir de D12, enquanto que o RI do Grupo Velho foi estatisticamente semelhante (P>0,05) durante os primeiros 20 dias de gestação (Tabela 11). Em relação à D1, valores baixos de PI foram detectados de forma isolada em D5, 14 e 19 em éguas jovens. No Grupo Adulto, uma diminuição de PI foi detectada em D4 e uma redução progressiva foi observada a partir de D12. Em éguas do Grupo Velho, valores diminuídos de PI foram detectados entre D13 e D15, D17, D19 e D20 (Tabela 12).

TABELA 11. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de éguas gestantes com idades distintas (Grupos Jovem, Adulto e Velho; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2.

	Grupo experimental *		
Dias de gestação	**Jovem**	**Adulto**	**Velho**
0	0,65±0,03ab	0,75±0,02abc	0,73±0,02ab
1	0,68±0,03a	0,78±0,02a	0,78±0,03ab
2	0,59±0,02ab	0,76±0,03ab	0,67±0,04ab
3	0,60±0,03ab	0,73±0,02abcd	0,60±0,04b
4	0,61±0,03ab	0,63±0,04abcde	0,65±0,04ab
5	0,54±0,02b	0,72±0,03abcd	0,61±0,04ab
6	0,58±0,05ab	0,69±0,03abcde	0,75±0,03a
7	0,63±0,03ab	0,73±0,03abcd	0,72±0,01ab
8	0,60±0,03ab	0,69±0,04abcde	0,89±0,18ab
9	0,55±0,01ab	0,72±0,02abcd	0,67±0,03ab
10	0,58±0,01ab	0,74±0,02abcd	0,69±0,04ab
11	0,59±0,02ab	0,67±0,04abcde	0,62±0,03ab
12	0,62±0,03ab	0,62±0,03bcde	0,64±0,02ab
13	0,56±0,03ab	0,62±0,03abcde	0,56±0,03b
14	0,52±0,02b	0,60±0,03cde	0,54±0,04b
15	0,57±0,04ab	0,60±0,04cde	0,60±0,05b
16	0,54±0,03ab	0,60±0,03bcde	0,65±0,06ab
17	0,59±0,02ab	0,59±0,03de	0,56±0,03b
18	0,60±0,02ab	0,61±0,03bcde	0,61±0,04b
19	0,52±0,02ab	0,56±0,03e	0,61±0,03b
20	0,55±0,03b	0,62±0,04bcde	0,59±0,03b

a, b, c, d, e Letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença estatistica ($P<0,05$).
* Classificação de acordo com a idade: Jovem (idade ≤ 6 anos), Adulto (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos) e Velho (idade ≥ 15 anos)

TABELA 12. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de éguas gestantes com idades distintas (Grupos Jovem, Adulto e Velho; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2.

	Grupo experimental *		
Dias de gestação	**Jovem**	**Adulto**	**Velho**
0	1,23±0,09ab	1,73±0,1ab	1,33±0,15ab
1	1,27±0,10a	1,91±0,11a	1,77±0,13a
2	1,02±0,08abc	1,91±0,21a	1,41±0,13ab
3	1,98±0,07abc	1,61±0,11abc	1,12±0,16ab
4	1,07±0,09abc	1,21±0,13bcd	1,19±0,15ab
5	0,85±0,05bc	1,54±0,19abcd	1,12±0,14ab
6	1,05±0,06abc	1,38±0,12abcd	1,55±0,12ab
7	1,22±0,13ab	1,57±0,16abc	1,48±0,08ab
8	1,05±0,08abc	1,45±0,17abcd	1,34±0,17ab
9	0,90±0,02abc	1,46±0,11abcd	1,42±0,14ab
10	0,98±0,03abc	1,47±0,13abcd	1,38±0,22ab
11	1,02±0,0abc	1,32±0,13abcd	1,19±0,09ab
12	1,14±0,03abc	1,11±0,09bcd	1,19±0,12ab
13	0,97±0,03abc	1,15±0,12bcd	0,93±0, 10b
14	0,81±0,02c	1,05±0,12cd	0,94±0,10b
15	0,95±0,04abc	1,03±0,11cd	1,04±0,12b
16	0,92±0,03abc	1,15±0,09bcd	1,11±0,13ab
17	1,00±0,02abc	0,99±0,08cd	0,94±0,07b
18	0,96±0,02abc	1,19±0,12bcd	1,15±0,15ab
19	0,81±0,02c	0,91±0,06d	1,02±0,08b
20	0,92±0,03abc	1,09±0,12bcd	1,05±0,11b

a, b, c, d, e Letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença estatistica ($P<0,05$).
* Classificação de acordo com a idade: Jovem (idade ≤ 6 anos), Adulto (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos) e Velho (idade ≥ 15 anos)

Independente do classificação histológica, idade dos animais e localização do embrião, um aumento progressivo na perfusão sanguínea de ambos os cornos uterinos foi detectado em éguas gestantes a partir de D14 (Figura 20). Ao comparar o efeito da intensidade das alterações degenerativas endometriais sobre a hemodinâmica uterina de éguas gestantes, não foi detectado efeito da posição do CL (cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação) para perfusão sanguínea uterina, PI e RI. Logo, os valores médios de ambos os cornos uterinos foram utilizados para a posterior avaliação do efeito do momento de acordo com a classificação endometrial. Um aumento significativo, isolado e precoce (P<0,001) na vascularidade uterina em D4 foi observado somente em éguas do Grupo GI, enquanto que um aumento progressivo na perfusão sanguínea do útero foi detectado em ambos os cornos uterinos dos três grupos experimentais independente da localização do embrião (Figuras 21, 22 e 23). Éguas dos grupos GI e GII apresentaram um aumento na vascularidade uterina a partir de D14, enquanto que em éguas classificadas histologicamente como categoria III o aumento na perfusão sanguínea do útero foi observado a partir de D15.

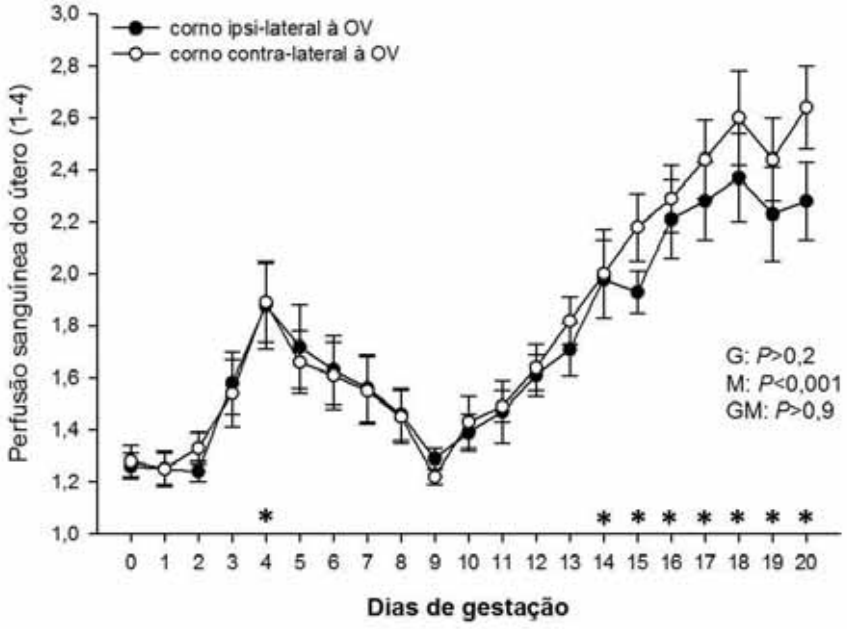

FIGURA 20. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas durante os 20 primeiros dias de gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

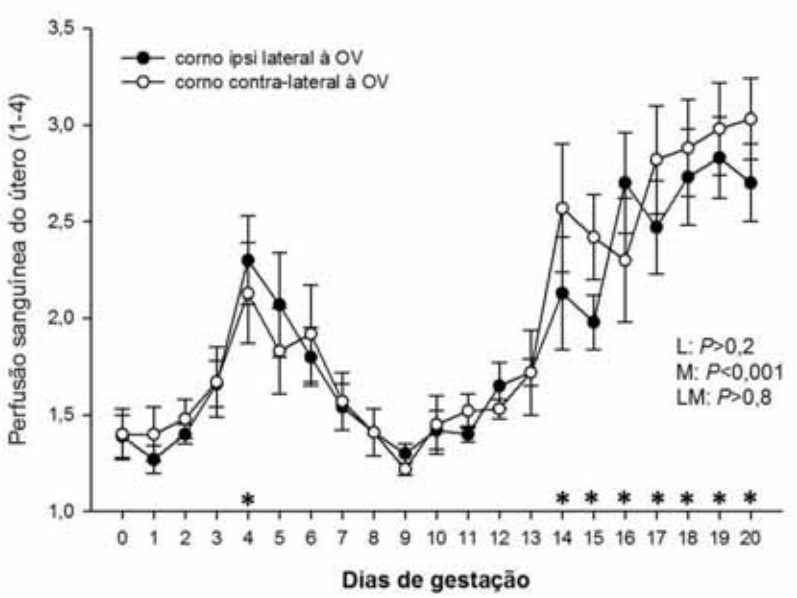

FIGURA 21. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas classificadas histologicamente como Grau I durante os 20 primeiros dias de gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

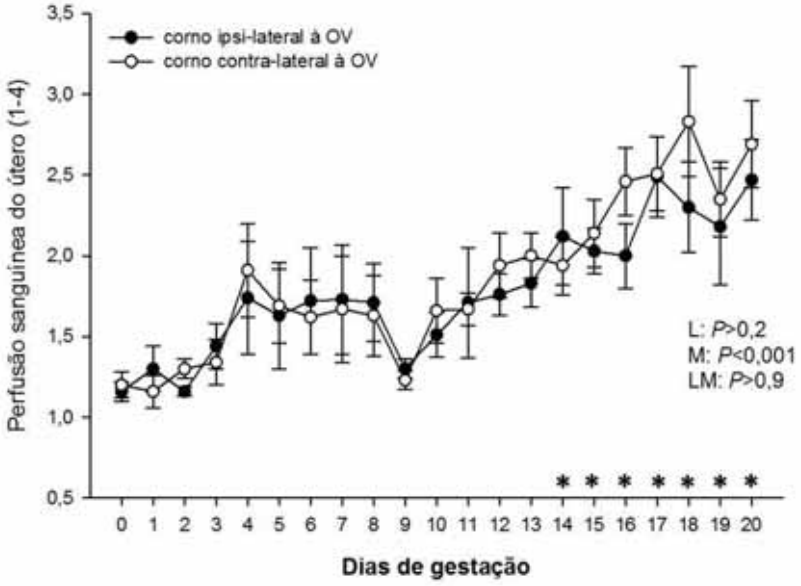

FIGURA 22. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas classificadas histologicamente como Grau II durante os 20 primeiros dias de gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

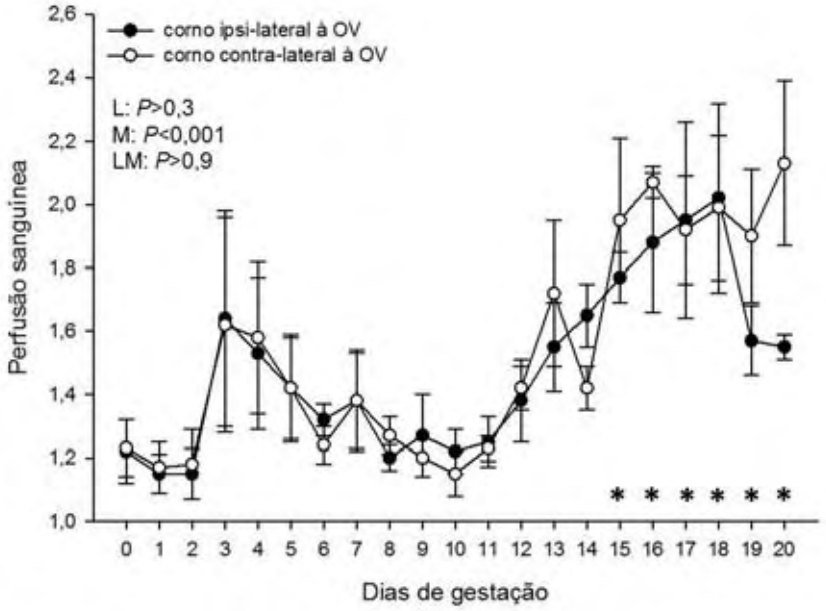

FIGURA 23. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação (OV) de éguas classificadas histologicamente como Grau III durante os 20 primeiros dias de gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

Ao avaliar a hemodinâmica uterina independente da localização do embrião durante os 20 primeiros dias da gestação, não foram detectadas quedas significativas (P>0,05) para RI nos grupos GI e GII. Somente éguas gestantes com degeneração endometrial categoria III apresentaram diminuição progressiva de RI, observada a partir de D13 (P<0,001; Tabela 13). Durante os 12 primeiros dias de gestação, foi observada diferença estatística (P<0,001) para PI quando comparado o momento independente do corno uterino somente em éguas do grupo GI. Éguas classificadas como categoria I apresentaram valores diminuídos de PI em D2, D3, D5 e D11. Uma redução progressiva de PI a partir de D13 independente da localização do embrião foi observada somente em éguas GIII. Entretanto, valores reduzidos de PI também foram detectados em éguas GI a partir de D13, com exceção dos dias 15 e 17. Em éguas GII, não foi encontrada diferença estatística (P>0,05) para PI durante os primeiros 20 dias de gestação (Tabela 14).

TABELA 13. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de éguas gestantes com diferentes graus de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2.

	Grupo experimental *		
Dias de gestação	**GI**	**GII**	**GIII**
0	0,69±0,02abc	0,68±0,03abc	0,75±0,02ab
1	0,69±0,02ab	0,71±0,03ab	0,79±0,02a
2	0,57±0,02abc	0,68±0,03abc	0,72±0,03a
3	0,59±0,02abc	0,68±0,03abc	0,69±0,02abcdef
4	0,61±0,03abc	0,68±0,03abc	0,62±0,04cdef
5	0,55±0,03 abc	0,69±0,03abc	0,68±0,02abcdef
6	0,57±0,04abc	0,72±0,02a	0,67±0,03abcde
7	0,65±0,12abc	0,73±0,03a	0,69±0,02abcd
8	0,71±0,11a	0,71±0,03ab	0,67±0,03abcdef
9	0,59±0,02abc	0,65±0,02abc	0,72±0,02abc
10	0,59±0,02abc	0,67±0,03abc	0,73±0,02abc
11	0,57±0,01abc	0,71±0,03a	0,60±0,03bcdef
12	0,63±0,02abc	0,58±0,03abc	0,59±0,02bcdef
13	0,55±0,03abc	0,61±0,03abc	0,57±0,03ef
14	0,52±0,02c	0,55±0,03bc	0,60±0,03def
15	0,60±0,02abc	0,59±0,04abc	0,62±0,03cdef
16	0,58±0,02abc	0,63±0,05abc	0,58±0,03f
17	0,58±0,02abc	0,58±0,02abc	0,60±0,03f
18	0,58±0,02abc	0,58±0,03abc	0,62±0,03f
19	0,53±0,02bc	0,53±0,02c	0,60±0,03f
20	0,56±0,03abc	0,59±0,04abc	0,62±003f

a, b, c, d, e, f Letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença estatistica (P<0,05).
* Classificação de acordo com o grau de degeneração endometrial

TABELA 14. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de éguas gestantes com diferentes graus de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n=6 éguas/grupo) durante os 20 primeiros dias da gestação. Experimento 2.

	Grupo experimental *		
Dias de gestação	**GI**	**GII**	**GIII**
0	1,36±0,08a	1,41±0,10abcd	1,57±0,16abc
1	1,3±0,07ab	1,55±0,12ab	1,92±0,11a
2	0,96±0,05cd	1,48±0,10abc	1,83±0,21ab
3	0,98±0,06bcd	1,38±0,13abcd	1,39±0,08abcde
4	1,02±0,07abcd	1,35±0,10abcd	1,09±0,12cde
5	0,90±0,06cd	1,41±0,18abc	1,27±0,09cde
6	1,02±0,05abcd	1,48±0,08abc	1,36±0,12bcde
7	1,22±0,09abc	1,59±0,14a	1,38±0,08abcde
8	1,06±0,08abcd	1,45±0,13abc	1,36±0,12bcde
9	1,11±0,08abcd	1,26±0,11abcd	1,46±0,10abcd
10	1,03±0,05abcd	1,29±0,13abcd	1,39±0,14abcde
11	1,00±0,03bcd	1,47±0,13abc	1,15±0,10cde
12	1,24±0,08abc	1,01±0,08abcd	1,07±0,06cde
13	0,92±0,06cd	1,05±0,10abcd	1,00±0,10de
14	0,85±0,05d	0,92±0,11cd	0,94±0,08de
15	1,05±0,06abcd	1,10±0,13abcd	0,93±0,08de
16	0,98±0,07bcd	1,20±0,11abcd	0,99±0,09de
17	1,03±0,06abcd	0,97±0,05bcd	0,87±0,07e
18	0,94±0,05cd	1,03±0,12abcd	1,15±0,10 cde
19	0,95±0,09cd	0,81±0,03d	1,00±0,07de
20	0,94±0,07cd	1,05±0,11abcd	0,99±0,08de

a, b, c, d, e Letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença estatistica ($P<0,05$).
* Classificação de acordo com o grau de degeneração endometrial

Ao considerar a localização do embrião, foi detectada diferença estatística entre cornos uterinos para a perfusão sanguínea entre os dias 12 e 20 de gestação independente da idade e classificação histológica. Um aumento progressivo na perfusão sanguínea foi observado em ambos os cornos uterinos (ipsi e contra-lateral ao embrião) de éguas gestantes. Entretanto, a vascularidade média do corno uterino contendo o embrião foi significativamente superior ao do corno contra-lateral (2,39±0,01 e 1,94±0,01, respectivamente). Entre os dias D12 e D14, não foi detectado (*P*>0,02) efeito da localização do embrião sobre a vascularidade dos cornos uterinos de éguas gestantes. Porém, a partir de D15 a vascularidade do corno ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente maior do que a do corno contra-lateral (*P*<0,03; Figura 24).

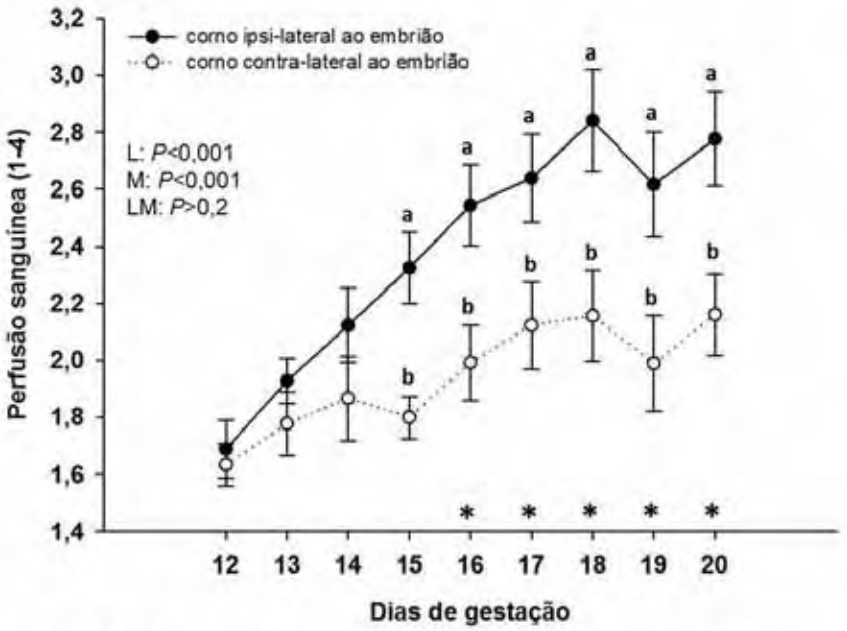

FIGURA 24. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (*P*<0,05) entre cornos uterinos no momento.

Valores médios (±EPM) dos índices Doppler uterinos (PI e RI) entre os dias 12 e 20 de éguas gestantes são apresentados na Tabela 15. Entre D12 e D20 da gestação, efeito de corno uterino e de momento foram detectados (P<0,004) para ambos os índices Doppler de acordo com a localização do embrião. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valores médios de PI e RI (Figura 25 e 26) significativamente menores do que o corno contra-lateral.

TABELA 15. Média±E.P.M para os indices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) mesometriais dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas gestantes (n= 18 éguas) entre os dias 12 e 20 da gestação. Experimento 2.

	PI			RI		
Dias da gestação	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**	**Média**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**	**Média**
12	0,95±0,06	1,16±0,06	1,05±0,06A	0,56±0,02	0,62±0,01	0,59±0,01A
13	0,86±0,08	0,95±0,04	0,91±0,04AB	0,53±0,03	0,58±0,02	0,55±0,02AB
14	0,69±0,02	0,93±0,05	0,81±0,05B	0,47±0,01	0,56±0,02	0,51±0,02B
15	0,88±0,06	1,03±0,07	0,95±0,07AB	0,56±0,03	0,57±0,02	0,57±0,02AB
16	0,94±0,07	1,19±0,08	1,07±0,08A	0,56±0,03	0,66±0,03	0,61±0,03A
17	0,85±0,04	1,04±0,05	0,94±0,05AB	0,53±0,02	0,60±0,02	0,56±0,02AB
18	0,92±0,06	1,14±0,10	1,03±0,10A	0,56±0,02	0,60±0,03	0,58±0,03AB
19	0,82±0,05	0,97±0,04	0,90±0,04AB	0,53±0,02	0,58±0,02	0,55±0,02AB
20	0,83±0,04	1,03±0,08	0,93±0,08AB	0,55±0,02	0,59±0,03	0,57±0,03AB
Média	0,86±0,01a	1,05±0,01b		0,53±0,002a	0,60±0,002b	

a, b Letras minúsculas na mesma linha e para o mesmo parâmetro diferem estatisticamente (P<0,05).
A, B Letras maiúsculas na mesma coluna apresentam diferença estatística (P<0,05)

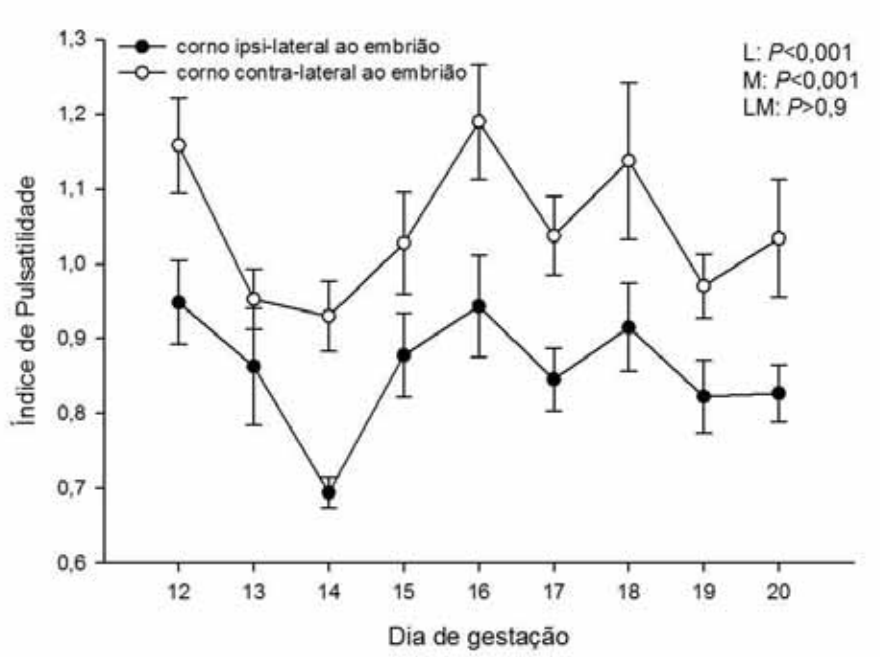

FIGURA 25. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valores médios de PI significativamente menores ($P<0,05$) do que o corno contra-lateral ao embrião.

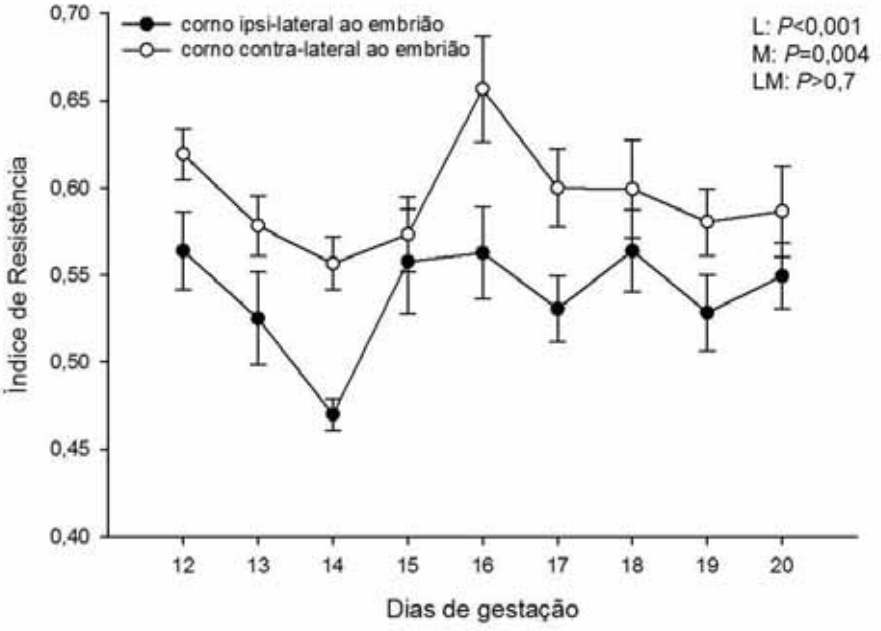

FIGURA 26. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valores médios de RI significativamente menores ($P<0,05$) do que o corno contra-lateral ao embrião.

Efeito da posição do embrião para a vascularidade uterina foi observado em todos os grupos histológicos (GI, GII e GIII) entre D12 e D20. Cornos uterinos contendo o embrião apresentaram perfusão sanguínea média superior ao corno contralateral (Tabela 16). A perfusão sanguínea média do corno contendo embrião de éguas GIII foi estatisticamente inferior (*P*<0,001) ao observado em éguas GI e GII. Fenômeno semelhante foi observado para os cornos contra-laterais ao embrião. Em éguas GI, o corno uterino ipsi-lateral ao embrião apresentou maior vascularidade que o corno contra-lateral em D15 e a partir de D17 (*P*<0,05, Figura 27). Em éguas dos grupos GII e GIII, o corno ipsi-lateral ao embrião apresentou maior vascularidade do que o contra-lateral somente nos dias 16 e 19, respectivamente (Figuras 28 e 29). O corno uterino contendo embrião de éguas GI apresentou maior vascularidade do que em éguas GIII em D14 e a partir de D17 (Figura 30). Já ao avaliar o corno contra-lateral ao embrião, éguas GI apresentaram maior perfusão sanguínea do que éguas GIII somente em D19 e D20 (Figura 31).

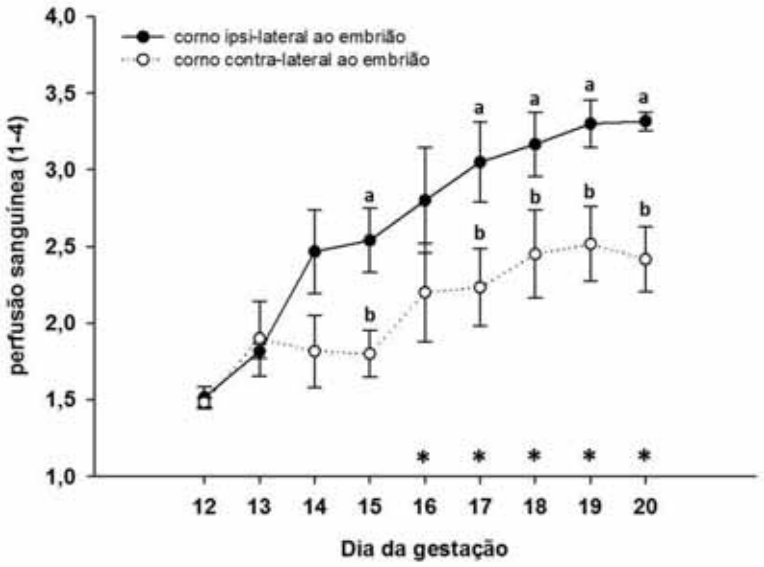

FIGURA 27. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos endometriais como Grau I entre o 12º e 20º dia da gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (*P*<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatistica (*P*<0,05) entre cornos uterinos no momento.

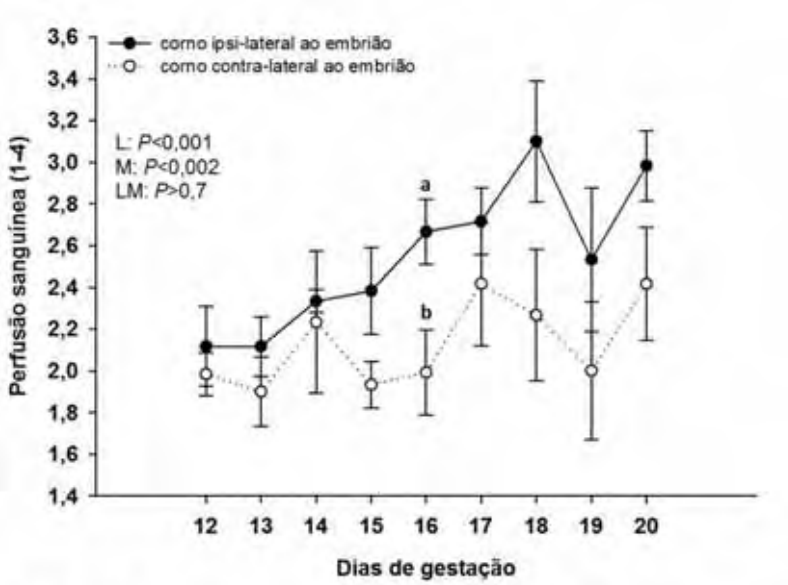

FIGURA 28. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos endometriais como Grau II entre o 12º e 20º dia da gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (P<0,05) entre cornos uterinos no momento.

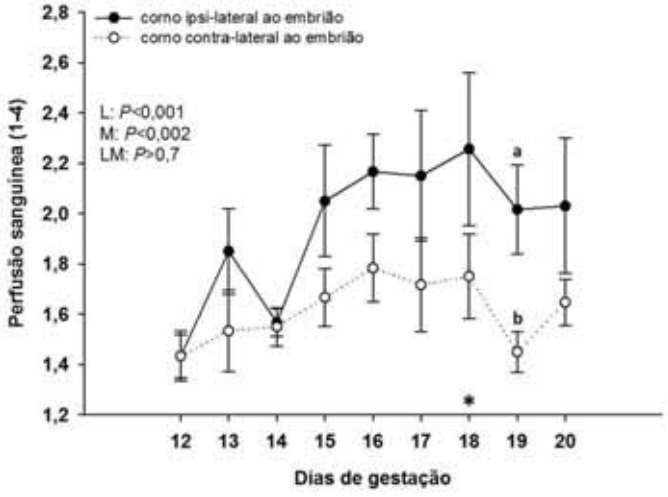

FIGURA 29. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos endometriais como Grau III entre o 12º e 20º dia da gestação (n=6 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (P<0,05) entre cornos uterinos no momento.

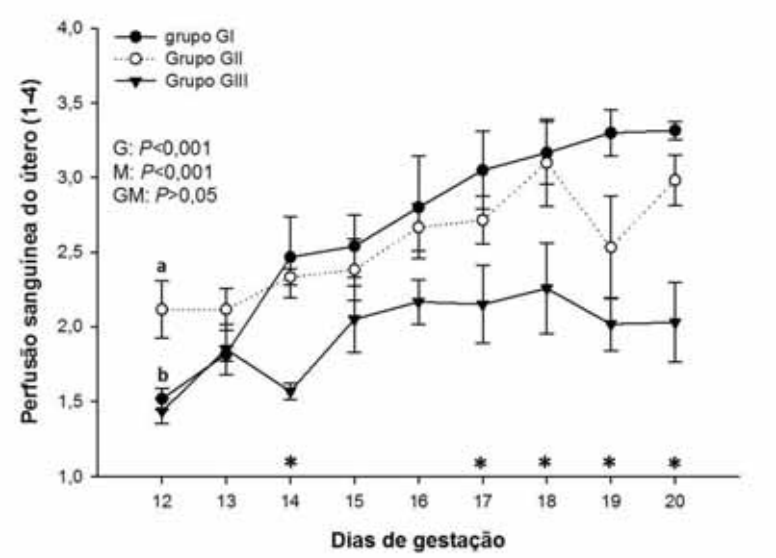

FIGURA 30. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do corno ipsi-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histológicos (GI, GII e GIII; n=6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferença significativa no momento (P<0,05) para vascularidade uterina entre GI e GIII são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (P<0,05) entre os Grupos GI e GII.

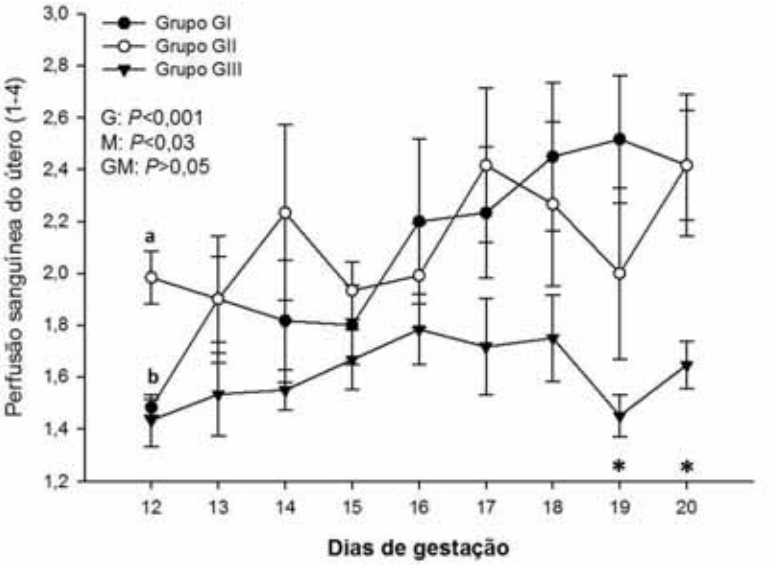

FIGURA 31. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do corno contra-lateral ao embrião de éguas classificadas de acordo com achados histólogicos (GI, GII e GIII; n=6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferença significativa no momento (P<0,05) para vascularidade uterina entre GI e GIII são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística (P<0,05) entre os Grupos GI e GII.

Em todos os grupos classificados de acordo com os achados histológicos, o valor médio para PI no corno ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (*P*<0,001) quando comparado ao corno contra-lateral (Figuras 32, 33 e 34). Não foi detectado efeito de interação (*P*>0,05) entre cornos uterinos *versus* momentos para RI em nenhum dos grupos experimentais (GI, GII e GIII). O valor médio de RI do corno ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente (*P*<0,001) inferior ao contra-lateral em éguas GI e GII (Figura 35 e 36). Não foi detectada efeito de cornos uterinos e momentos para RI uterino em éguas GIII (Figura 37). Adicionalmente, valores de PI e RI dos cornos ipsi e contra-laterais ao embrião entre D12 e D20 dos Grupos GI, GII e GIII são apresentados nas Tabela 17 e 18.

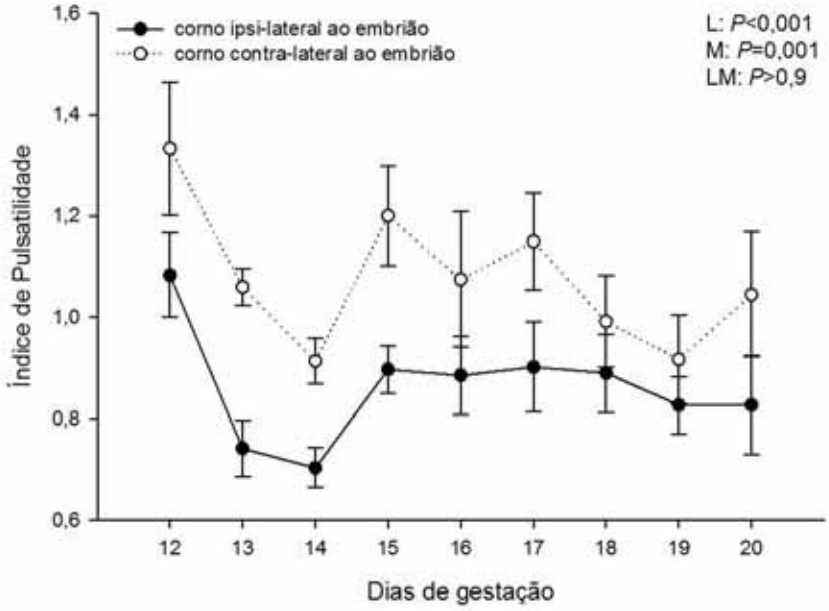

FIGURA 32. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GI entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de PI significativamente menor (*P*<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião.

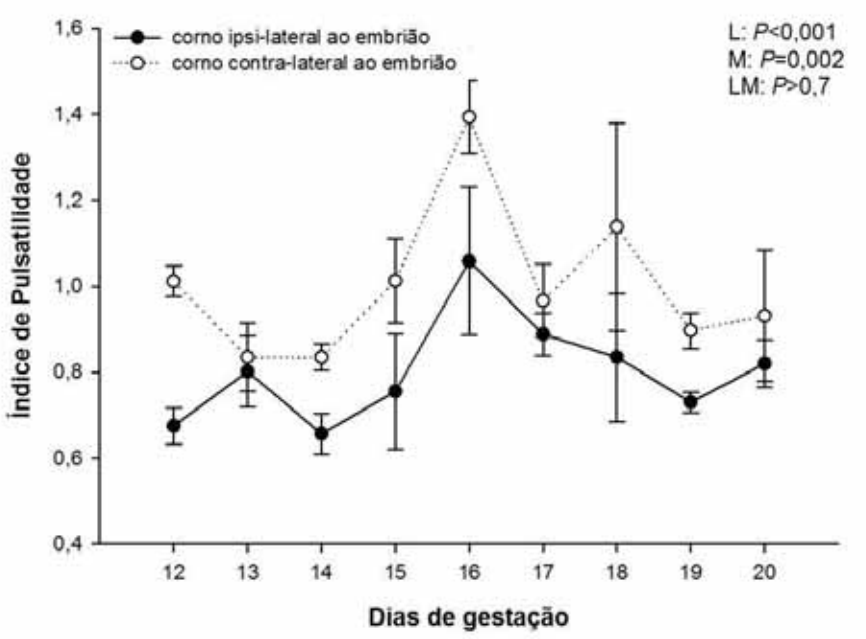

FIGURA 33. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de PI significativamente menor (P<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião.

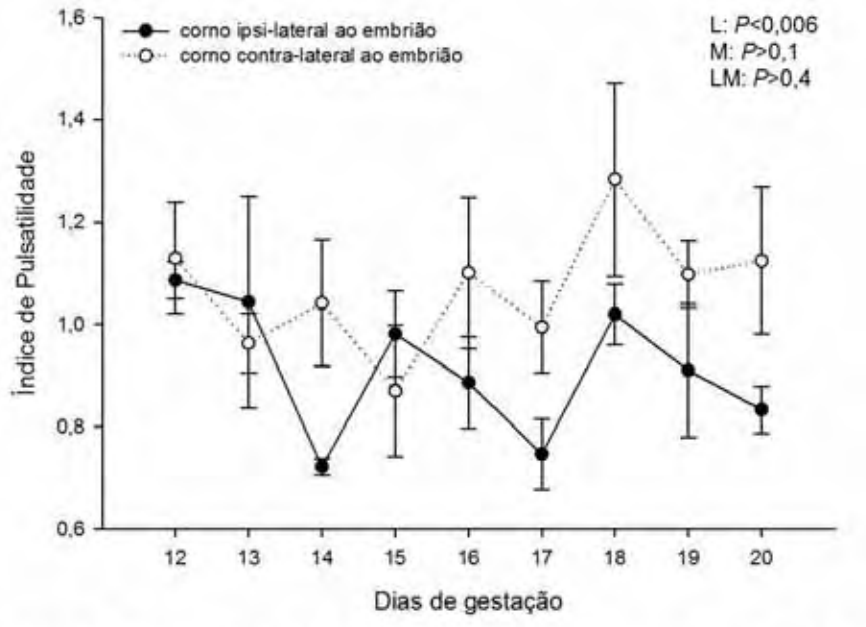

FIGURA 34. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GIII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de PI significativamente menor (P<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião.

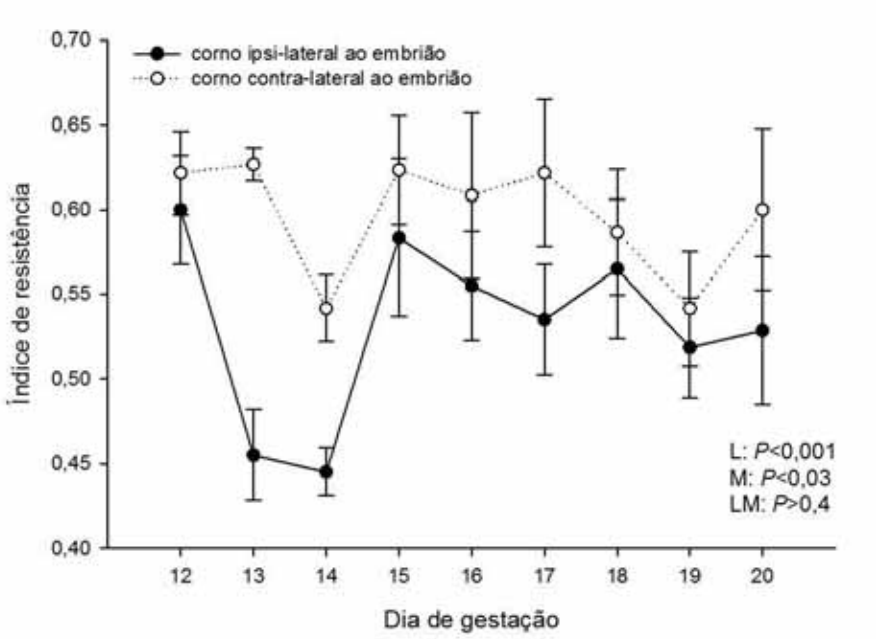

FIGURA 35. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GI entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de RI significativamente menor (P<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião.

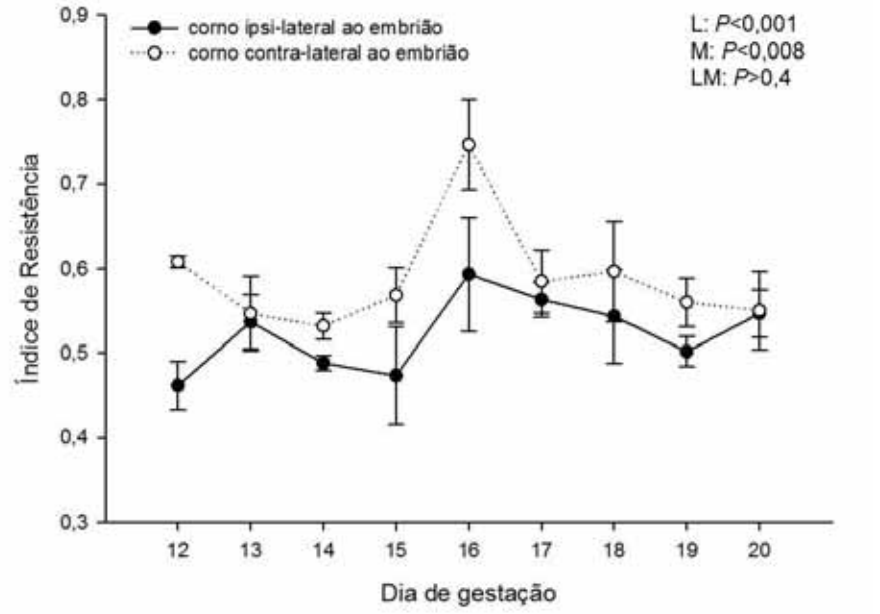

FIGURA 36. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O corno ipsi-lateral ao embrião apresentou valor médio de RI significativamente menor (P<0,05) do que o corno contra-lateral ao embrião.

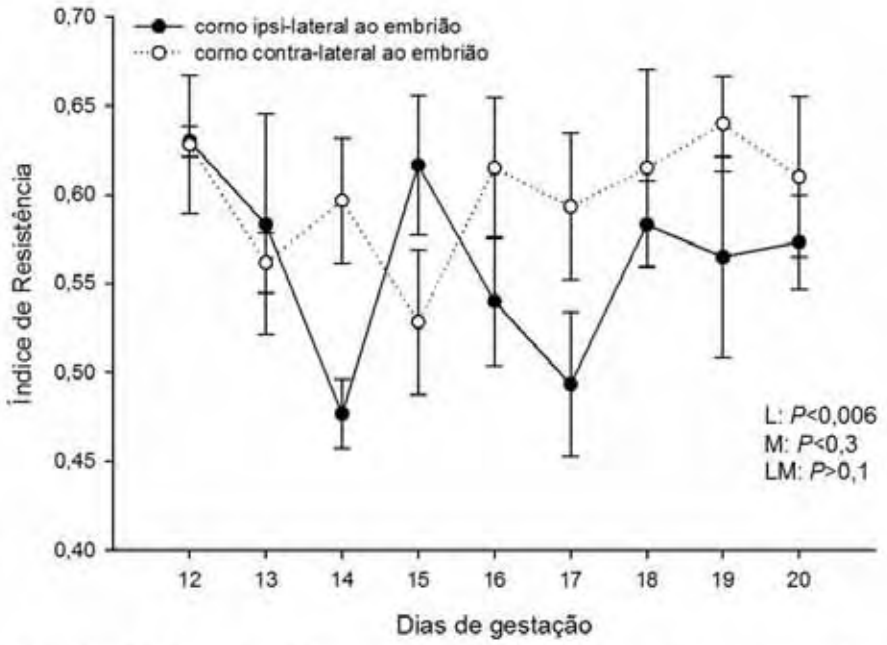

FIGURA 37. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas GIII entre o 12º e 20º dia da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. O valor médio para RI dos cornos ipsi- e contra-lateral ao embrião foi semelhante ($P>0,05$).

TABELA 16. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2.

	GI		**GII**		**GIII**	
Dias de gestação	**Ipsi-lateral***	**Contra-lateralº**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**
12	1,08±0,08	1,33±0,13	0,68±0,04	1,01±0,04	1,09±0,04	1,13±0,11
13	0,74±0,06	1,06±0,04	0,80±0,08	0,84±0,08	1,04±0,21	0,96±0,06
14	0,70±0,04	0,91±0,05	0,66±0,05	0,84±0,03	0,72±0,02	1,04±0,12
15	0,90±0,05	1,20±0,10	0,76±0,13	1,01±0,10	0,98±0,08	0,87±0,13
16	0,89±0,08	1,08±0,13	1,06±0,17	1,39±0,08	0,89±0,09	1,10±0,15
17	0,90±0,09	1,15±0,10	0,89±0,05	0,97±0,09	0,75±0,07	1,00±0,09
18	0,89±0,08	0,99±0,09	0,84±0,15	1,14±0,24	1,02±0,06	1,28±0,19
19	0,83±0,06	0,92±0,09	0,73±0,02	0,90±0,04	0,91±0,13	1,10±0,06
20	0,83±0,10	1,05±0,12	0,82±0,05	0,93±0,15	0,83±0,05	1,13±0,14
Média	0,86±0,01a	1,08±0,01b	0,80±0,02a	1,00±0,02b	0,91±0,02a	1,07±0,01b

a, b Letras minúsculas na mesma linha e dentro do mesmo grupo diferem entre si ($P<0,05$).
*, ω Índice de pulsatilidade do corno uterino ipsi e contra-lateral ao embrião, respectivaemente

TABELA 17. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas classificadas de acordo com o grau de degeneração endometrial (GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2.

	GI		GII		GIII	
Dias de geatação	**Ipsi-lateral***	**Contra-lateralω**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**
12	0,69±0,03	0,62±0,02	0,46±0,03	0,61±0,01	0,63±0,01	0,63±0,04
13	0,46±0,03	0,63±0,01	0,54±0,03	0,55±0,04	0,58±0,06	0,56±0,02
14	0,45±0,01	0,54±0,02	0,49±0,01	0,53±0,02	0,48±0,02	0,60±0,04
15	0,58±0,05	0,62±0,03	0,47±0,06	0,57±0,03	0,62±0,04	0,53±0,04
16	0,56±0,03	0,61±0,05	0,59±0,07	0,75±0,05	0,54±0,04	0,62±0,04
17	0,57±0,03	0,62±0,04	0,56±0,02	0,59±0,04	0,49±0,04	0,59±0,04
18	0,52±0,04	0,59±0,04	0,54±0,06	0,60±0,06	0,58±0,02	0,62±0,06
19	0,53±0,03	0,54±0,03	0,50±0,02	0,56±0,03	0,57±0,16	0,64±0,03
20	0,53±0,04	0,60±0,05	0,55±0,03	0,55±0,05	0,57±0,03	0,61±0,05
Média	0,53±0,00a	0,60±0,00b	0,52±0,01a	0,59±0,01b	0,56±0,01a	0,60±0,00b

a, b Letras minúsculas na mesma linha e dentro do mesmo grupo diferem entre si (P<0,05).
*, ω Índice de Resistência do corno uterino ipsi e contra-lateral ao embrião, respectivamente

Ao avaliar éguas gestantes entre D12 e D20 de acordo com a idade, foram detectados (P<0,001) efeitos de localização do embrião e momentos sobre a perfusão sanguínea do útero. Nos três grupos experimentais (jovem, adulto e velho) a vascularidade uterina média do corno contendo o embrião foi estatisticamente maior do que a do corno contra-lateral. Em éguas jovens, o corno uterino contendo o embrião apresentou (P<0,007) maior vascularidade do que o corno contra-lateral em D12, entre D15 e D18 e D20 (Figura 38). O corno ipsi-lateral ao embrião de éguas adultas apresentou maior vascularidade do que o corno contra-lateral em D16, D18 e D19 (Figura 39). No grupo Velho, a perfusão sanguínea de ambos os cornos uterinos foi estatisticamente semelhante após o décimo segundo dia de gestação, com exceção de D15 (Figura 40). A perfusão sanguínea média de cornos uterinos contendo o embrião dos grupos Jovem e Velho foram estatisticamente semelhantes e maiores do que a do Grupo Adulto entre D12 e D20 (Figura 41). O mesmo fenômeno foi detectado para a perfusão sanguínea do corno contra-lateral ao embrião (Figura 42).

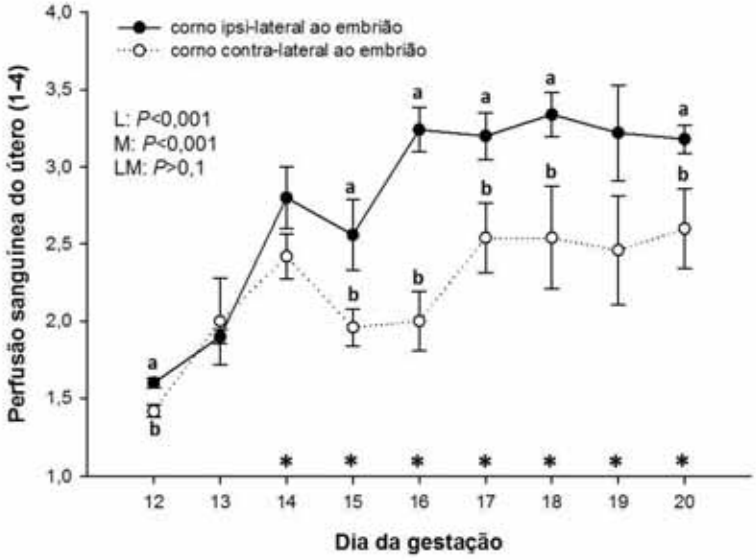

FIGURA 38. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas jovens (idade ≤6 anos; n= 6 éguas/grupo) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicados por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatistica entre os cornos uterinos no momento.

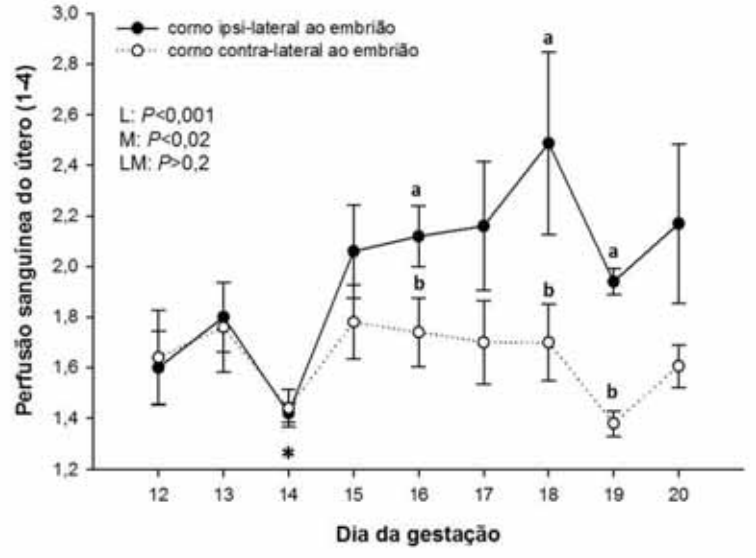

FIGURA 39. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas adultas (8 anos ≤ idade ≤12 anos; n= 6 éguas/grupo) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferenças significativas (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicadas por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística entre os cornos uterinos no momento.

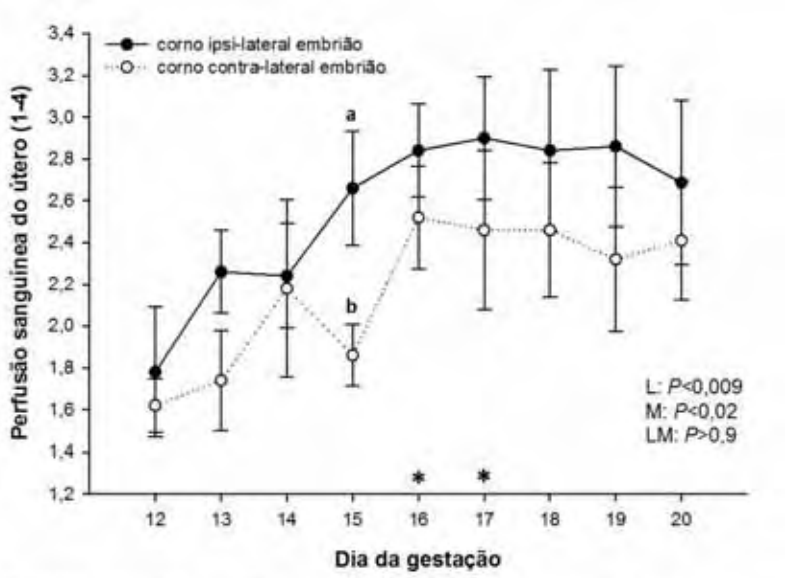

FIGURA 40. Média±E.P.M para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) de cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas velhas (idade ≥15 anos; n= 6 éguas/grupo) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. Diferenças significativas (P<0,05) na vascularidade uterina em relação à D12 são indicadas por asterisco. Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística entre os cornos uterinos no momento.

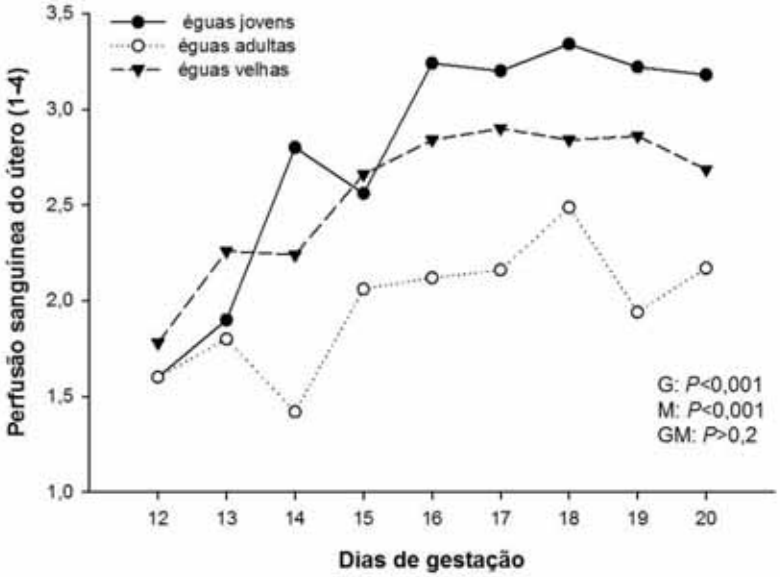

FIGURA 41. Média para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do cornos uterinos ipsi-lateral ao embrião de éguas com idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. A vascularidade uterina média do corno unterino ipsi-lateral ao embrião dos grupos Jovem e Velho foi estatisticamente maior (P<0,05) do que no grupo Adulto.

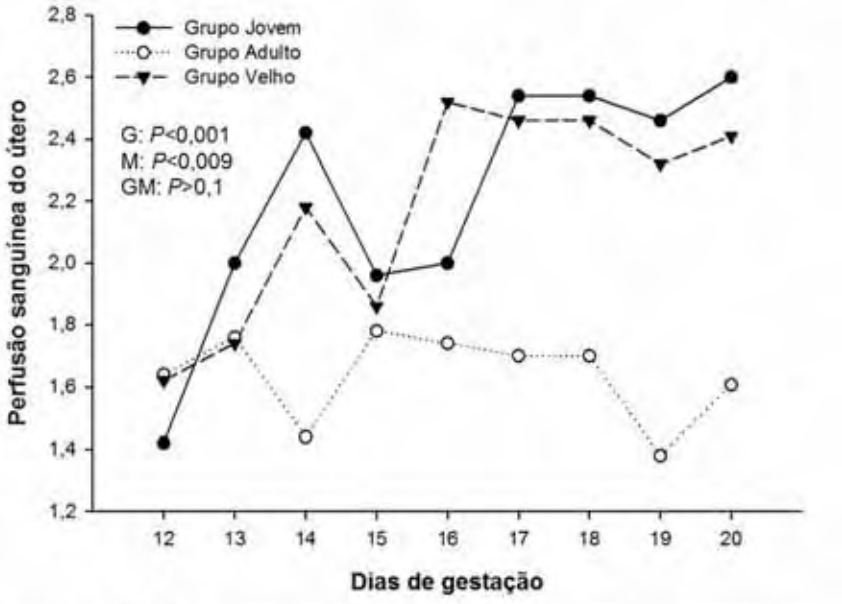

FIGURA 42. Média para perfusão sanguínea (endométrio e miométrio; escore entre 1 e 4) do cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas com idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. A vascularidade uterina média do corno unterino contra-lateral ao embrião dos grupos Jovem e Velho foi estatisticamente maior (P<0,05) do que no grupo Adulto.

Não foi observada diferença estatística para PI entre a interação cornos uterinos *versus* momento de éguas gestantes nos grupos Jovem, Adulto e Velho (Figura 43, 44 e 45). O valor médio de PI após D12 do corno ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente inferior ao do corno contra-lateral em éguas jovens e velhas. Adicionalmente, o valor médio de RI do corno contendo o embrião foi estatisticamente inferior ao do corno contra-lateral após D12 no Grupo Jovem (Figura 46). Não foi observada diferença estatística para o valor médio de RI entre os cornos uterinos de éguas adultas e velhas (Figuras 47 e 48). Valores médios para PI e RI de éguas com idades distintas são apresentados nas Tabelas 19 e 20.

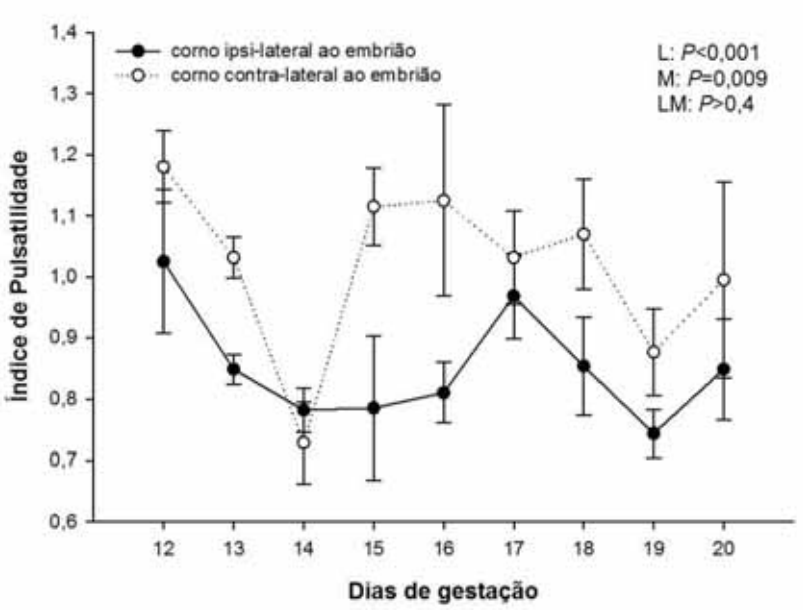

FIGURA 43. Média para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas jovens (idade ≤6 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de pulsatilidade médio do corno uterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (P<0,05) do que no corno contra-lateral em éguas jovens.

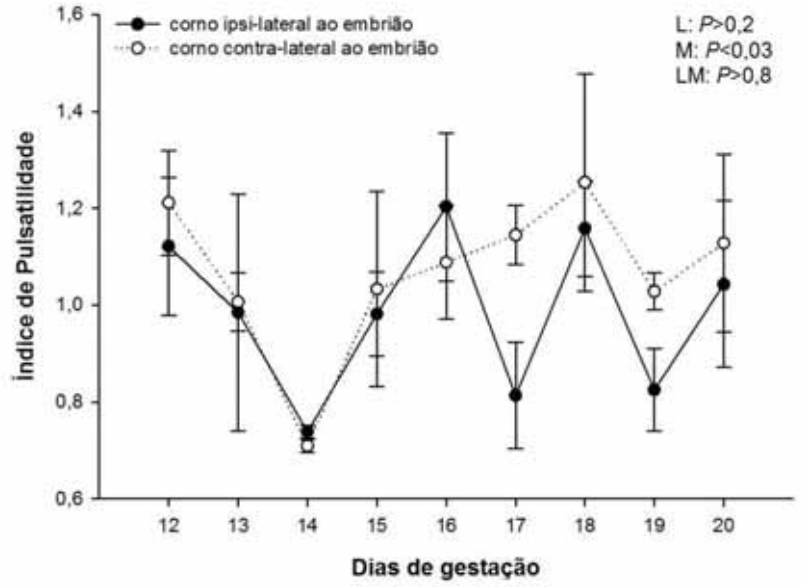

FIGURA 44. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas adultas (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de pulsatilidade médio do corno unterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente semelhante (P>0,05) do que no corno contra-lateral em éguas adultas.c

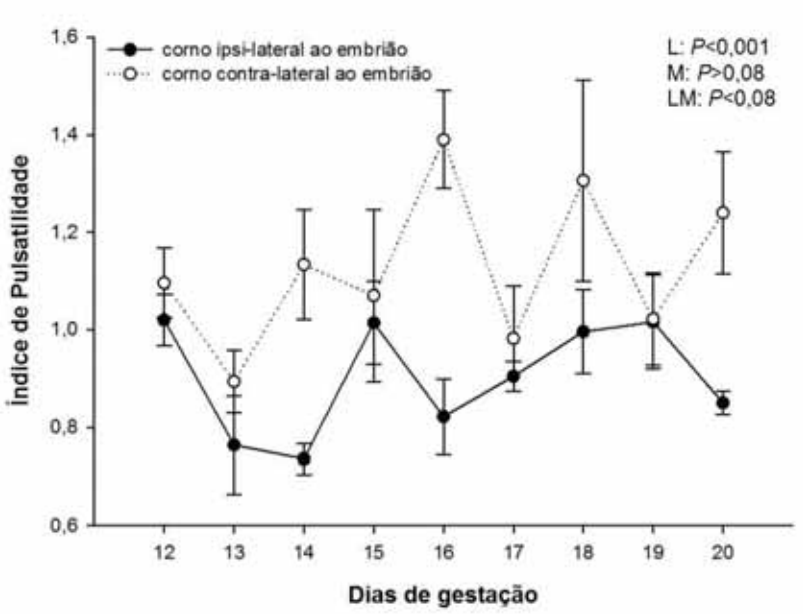

FIGURA 45. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas velhas (idade ≥15 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de pulsatilidade médio do corno unterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (P<0,05) do que no corno contra-lateral em éguas velhas.

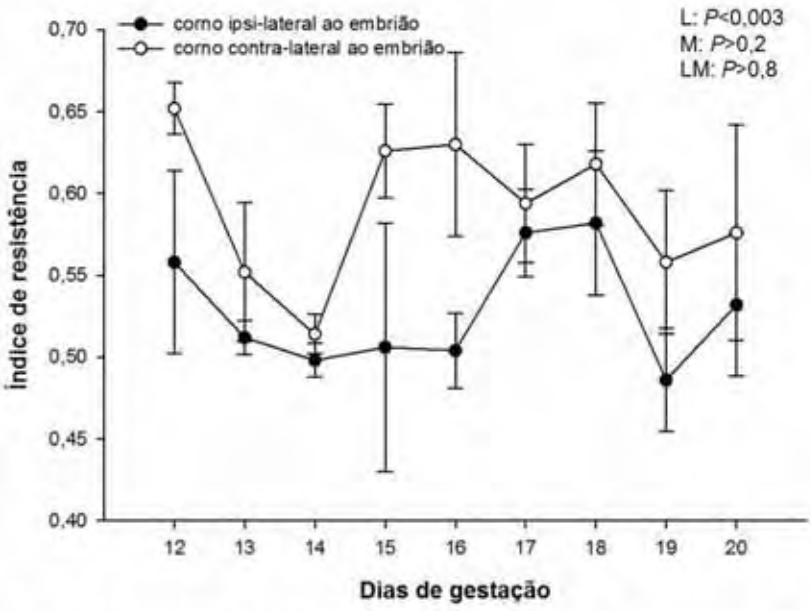

FIGURA 46. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas jovens (idade ≤6 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de resistência médio do corno uterino ipsi-lateral ao embrião foi estatisticamente menor (P<0,05) do que no corno contra-lateral em éguas jovens.

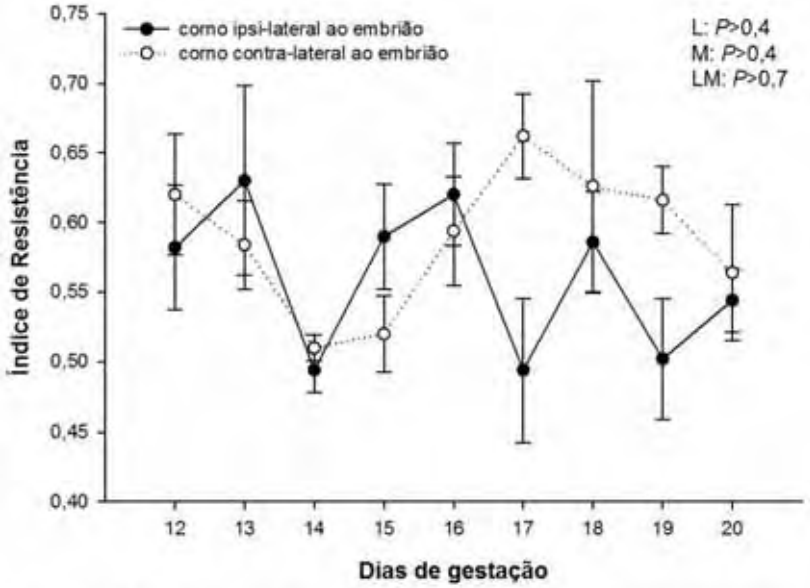

FIGURA 47. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas adulto (6< anos idade <15 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de resistência médio dos cornos uterinos ipsi- e contra-lateral ao embrião foi estatisticamente semelhante (P>0,05).

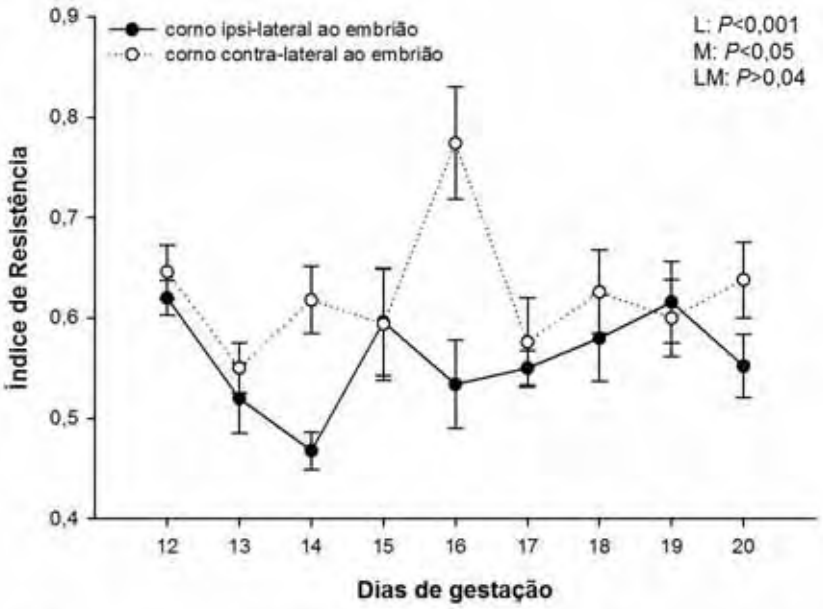

FIGURA 48. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos contra-lateral ao embrião de éguas velhas (idade ≥15 anos ; n= 6 éguas) entre o 12º e 20º dia da gestação. Experimento 2. O índice de resistência médio dos cornos uterinos ipsi- e contra-lateral ao embrião foi estatisticamente semelhante (P>0,05).

TABELA 18. Média±E.P.M para índice de pulsatilidade (PI) dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas classificadas de acordo com idade (jovem, adulta e velha; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2.

	Jovem*		Adulto*		Velho*	
Dias de gestação	**Ipsi-lateral***	**Contra-lateralω**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**
12	1,03±0,12	1,18±0,06	1,12±0,14	1,21±0,11	1,02±0,05	1,10±0,07
13	0,85±0,02	1,03±0,03	0,99±0,24	1,01±0,06	0,76±0,10	0,89±0,06
14	0,78±0,04	0,73±0,07	0,74±0,01	0,71±0,01	0,74±0,03	1,13±0,11
15	0,79±0,12	1,12±0,06	0,98±0,09	1,03±0,20	1,01±0,09	1,07±0,18
16	0,81±0,05	1,13±0,16	1,20±0,15	1,09±0,12	0,82±0,08	1,39±0,10
17	0,97±0,07	1,03±0,08	0,81±0,11	1,15±0,06	0,90±0,03	0,98±0,11
18	0,85±0,08	1,07±0,09	1,16±0,10	1,25±0,22	1,00±0,09	1,31±0,21
19	0,74±0,04	0,88±0,07	0,83±0,09	1,03±0,04	1,02±0,10	1,02±0,10
20	0,85±0,08	1,00±0,16	1,04±0,17	1,13±0,18	0,85±0,02	1,24±0,13
Média	0,85±0,01a	1,02±0,01b	0,99±0,02	1,07±0,03	0,90±0,01a	1,13±0,02b

* Classificação de acordo com a idade: Grupo Jovem (idade ≤ 6 anos), Grupo Adulto (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos) e Grupo Velho (idade ≥ 15 anos)
ω Índice de Resistência do corno uterino ipsi e contra-lateral ao embrião, respectivamente.
a, b Letras minúsculas na mesma linha e dentro do mesmo grupo diferem entre si (P<0,05).

TABELA 19. Média±E.P.M para índice de resistência (RI) mesometrial dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião entre os dias 12 e 20 da gestação de éguas com idades distintas (jovem, adulto e velho; n= 6 éguas/grupo). Experimento 2.

	Jovem*		Adulto*		Velho*	
Dias de gestação	**Ipsi-lateralω**	**Contra-lateralω**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**	**Ipsi-lateral**	**Contra-lateral**
12	0,56±0,06	0,65±0,02	0,58±0,04	0,62±0,04	0,62±0,02	0,65±0,03
13	0,51±0,01	0,55±0,04	0,63±0,07	0,58±0,03	0,52±0,04	0,55±0,02
14	0,50±0,01	0,5±0,01	0,49±0,02	0,51±0,01	0,47±0,02	0,62±0,03
15	0,51±0,08	0,63±0,03	0,59±0,04	0,52±0,03	0,60±0,05	0,59±0,06
16	0,50±0,02	0,63±0,06	0,62±0,04	0,59±0,04	0,53±0,04	0,77±0,06
17	0,58±0,03	0,59±0,04	0,49±0,05	0,66±0,03	0,55±0,02	0,58±0,04
18	0,58±0,04	0,62±0,04	0,59±0,04	0,63±0,08	0,58±0,04	0,63±0,04
19	0,49±0,03	0,56±0,04	0,50±0,04	0,62±0,02	0,62±0,04	0,60±0,04
20	0,53±0,04	0,58±0,07	0,54±0,02	0,56±0,05	0,55±0,03	0,64±0,04
Média	0,53±0,01a	0,59±0,01b	0,56±0,01	0,59±0,01	0,56±0,04	0,63±0, 004

* Classificação de acordo com a idade: Grupo Jovem (idade ≤ 6 anos), Grupo Adulto (8 anos ≤ idade ≤ 12 anos) e Grupo Velho (idade ≥ 15 anos)
ω Índice de Resistência do corno uterino ipsi e contra-lateral ao embrião, respectivamente.
a, b Letras minúsculas na mesma linha e ndentro do mesmo grupo diferem entre si (P<0,05).

Independente da classificação histológica e idade dos animais, a contratilidade uterina foi significativamente maior entre D10 e D17 (Figura 49). Ao avaliar a contratilidade uterina de éguas gestantes de acordo com a classificação histológica do útero, foram detectados efeito de grupo (P<0,004) e de momento (P<0,001), mas não para a interação entre grupos e momentos (P>0,1). O Grupo II apresentou maior contratilidade uterina do que GI e GIII entre D1 e D3. Adicionalmente, foi observado um aumento significativo na contratilidade uterina entre D10 e D17 nos três grupos experimentais (Figura 50). A contratilidade uterina média do Grupo GIII (1,98±0,02) foi significativamente inferior ao do grupo GII (2,22±0,01; P<0,05), enquanto que éguas GI e GII apresentaram contratilidade uterina média estatisticamente semelhantes durante os primeiros 20 dias de gestação (P>0,1).

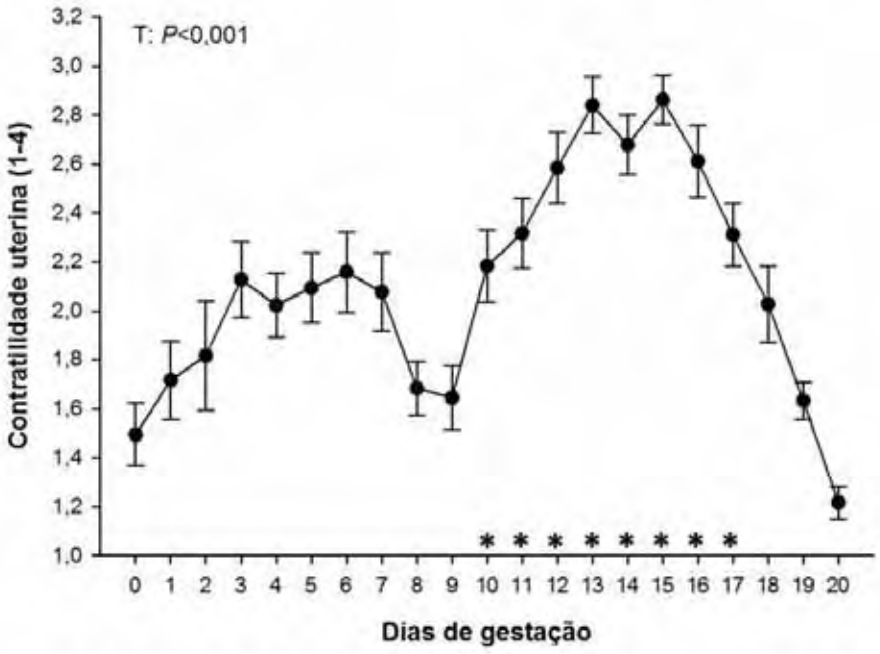

FIGURA 49. Média±E.P.M para contratilidade uterina de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na contratilidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

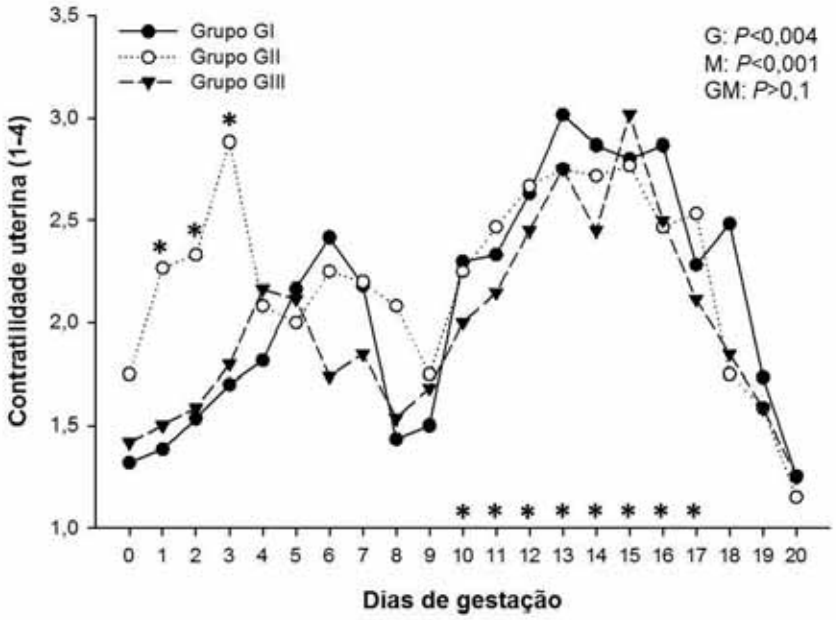

FIGURA 50. Média para contratilidade uterina de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos (grupos GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na contratilidade uterina em relação à D0 são indicados por asterisco.

Efeito de grupo, momento e interação grupo *versus* momento (P<0,001, P<0,001 e P<0,03, respectivamente) foram observados para contratilidade uterina de éguas gestantes de idades distintas (Figura 51). A contratilidade média durante os 20 primeiros dias de gestação foi semelhante nos três grupos, entretanto foi detectado efeito de idade em dias específicos. A contratilidade uterina do Grupo Idoso foi significativamente menor do que a observada no Grupo Jovem em D0, D1, D3, D10, D11, D14, D17 e D18. Éguas adultas apresentaram contratilidade uterina semelhante ao de éguas jovens e idosas durante os 20 primeiros dias de gestação, com exceção de D10 e D17. Os maiores valores para contratilidade uterina de éguas jovens, adultas e idosas foram observados entre D12 e D14, entre D13 e D17 e entre D12 e D16, respectivamente.

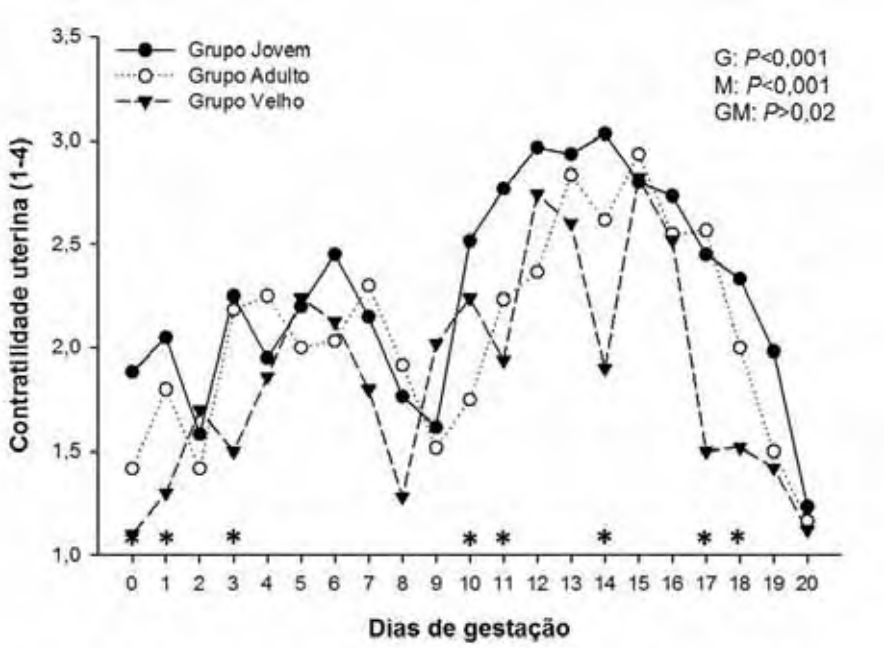

FIGURA 51. Média para contratilidade uterina de éguas de idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Valores estatisticamente maiores (*P*<0,05) para contratilidade uterina de éguas jovens em relação à éguas velhas são indicados por asterisco.

Éguas gestantes e não gestantes apresentaram níveis plasmáticos de progesterona estatisticamente semelhantes durante os 12 primeiros dias pós-ovulação. Um aumento progressivo de P4 foi observado durante os quatro primeiros dias pós-ovulação em ambos os grupos. A concentração circulante de P4 foi semelhante estatisticamente (*P*>0,05) entre D4 e D12 em ambos os grupos, Gestantes e Não Gestantes. Independente classificação histológica do útero e idade, éguas gestantes apresentaram um aumento progressivo nos níveis de progesterona entre D0-7, a partir de quando a concentração foi máxima até D20 (Figura 52). Foi detectada diferença significativa (*P*<0,001) para o nível plasmático de progesterona quando comparado os grupos experimentais de acordo com categoria uterina (GI, GII e GIII) e os momentos (D0-20), mas não para a interação entre grupos e momentos. A concentração de P4 média do Grupo GI foi significativamente maior quando comparada aos Grupos GII e GIII (Figura 53). Ao avaliar os níveis séricos de P4 de éguas gestante com idades distintas foi detectada diferença estatística para o momento (P<0,001), mas não entre os grupos e para a interação entre grupos e momentos (Figura 54).

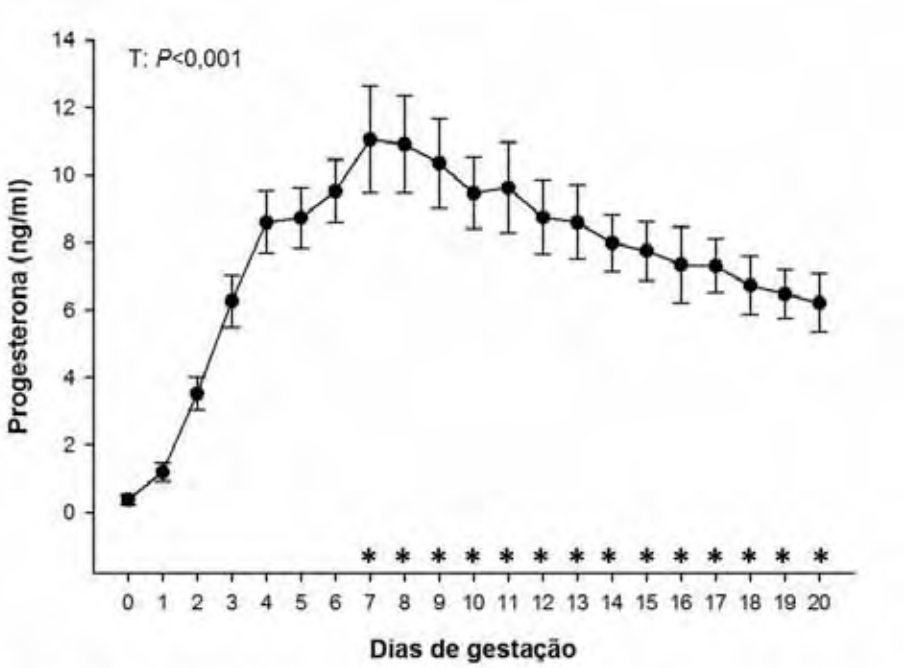

FIGURA 52. Média±E.P.M para concentração plasmática de progesterona de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos ($P<0,05$) na concentração sérica de progesterona em relação à D0 são indicados por asterisco.

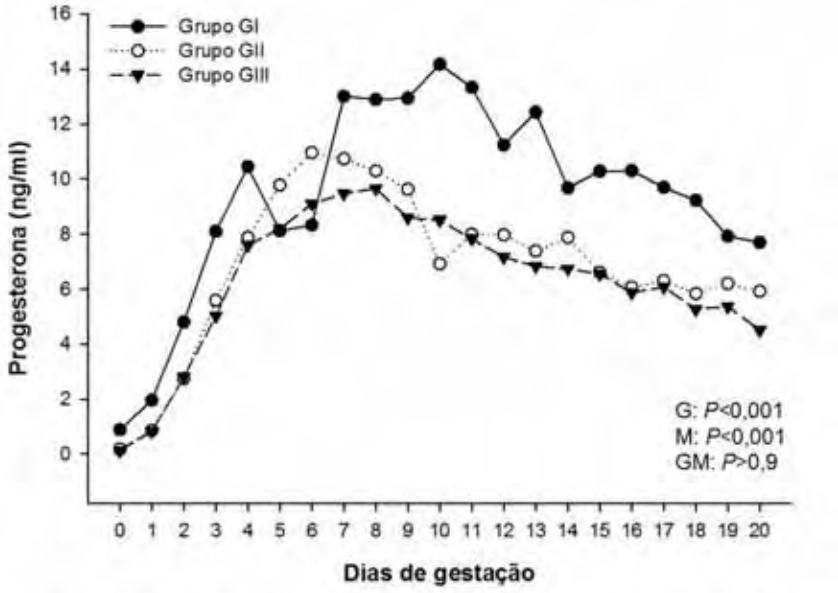

FIGURA 53. Média para concetração plasmática de progesterona de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos (grupos GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. A concentração média de progesterona entre DO-20 foi estatisticamente maior ($P<0,05$) no grupo GI do que nos grupos GII e GIII.

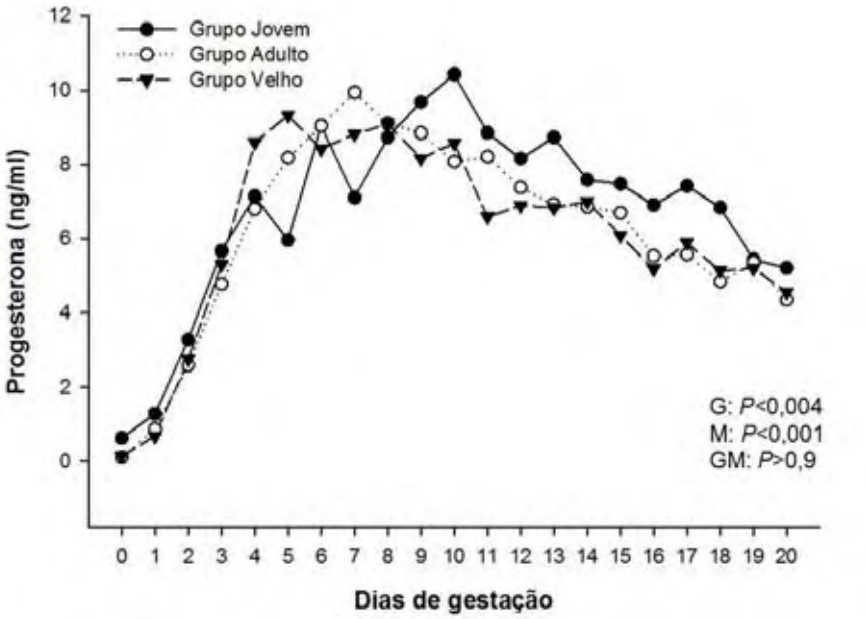

FIGURA 54. Média para concentração plasmática de progesterona de éguas de idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Os valores médios de progesterona entre D0-20 foram estatisticamente semelhantes (P>0,1) nos três grupos experimentais.

Não foi observada diferença estatística (P>0,05) para a perfusão sanguínea do CL de éguas gestantes e não gestantes entre D0 e D12. Um aumento progressivo (P<0,001) da perfusão sanguínea do CL foi observado em todas as éguas gestantes independente da classificação etária e histológica. Valores máximos para vascularidade luteal foram observados a partir de D6 até D20 (Figura 55). CLs de éguas do grupo GI apresentaram perfusão sanguínea média (62,5±0,4) significativamente menor (P<0,001) do que éguas dos grupos GII (70,2±0,2) e maior do que éguas GIII (54,8±0,4; Figura 56). A vascularidade luteal média de éguas jovens (72,9±0,3) foi significativamente maior (P<0,001) do que a de éguas adultas e velhas (58,8±0,2; Figura 57).

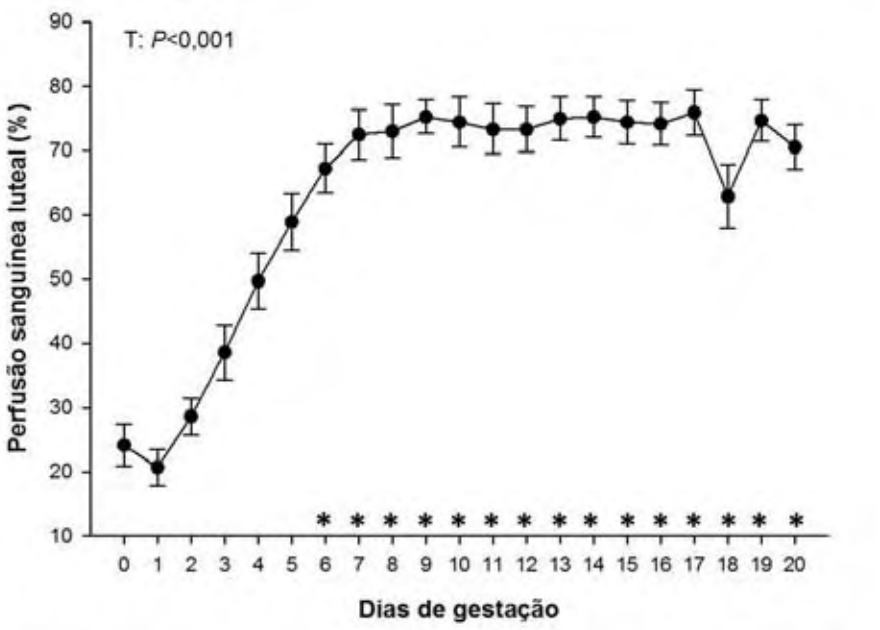

FIGURA 55. Média para perfusão sanguínea luteal de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na vascularidade luteal em relação à D0 são indicados por asterisco.

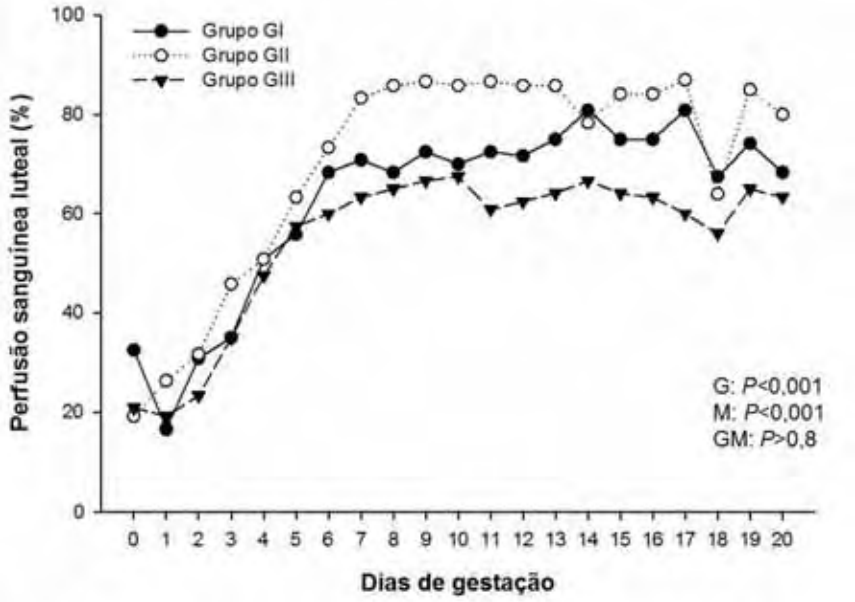

FIGURA 56. Média para perfusão sanguínea luteal de éguas classificadas de acordo com os achados histológicos (grupos GI, GII e GIII; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. A vascularidade luteal média entre DO-20 de éguas gestantes GI foi estatisticaemente maior e menor do em éguas GIII e GII, respectivamente.

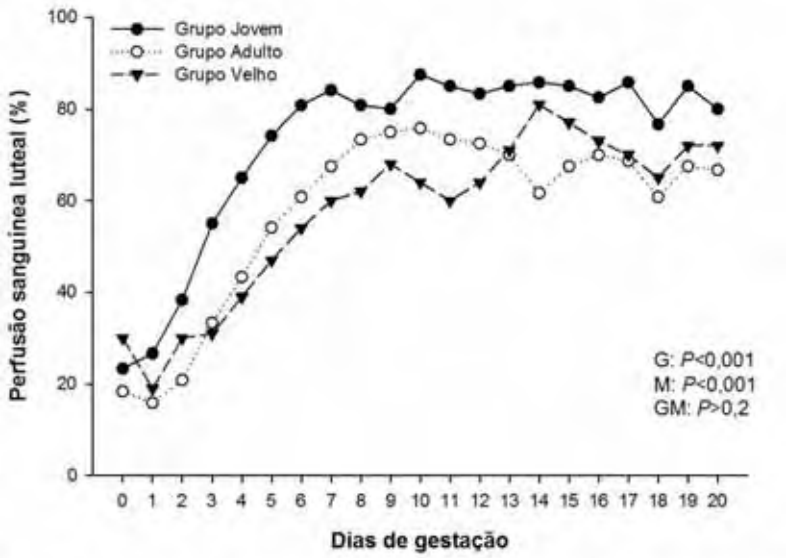

FIGURA 57. Média para perfusão sanguínea luteal de éguas de idades distintas (grupos Jovem, Adulto e Velho; n= 6 éguas/grupo) durante os primeiros 20 dias da gestação. Experimento 2. Os valores médios de vascularidade luteal de éguas jovens foi estatisticamente maior (P>0,05) do que em éguas adultas e velhas.

Efeito de grupo e de interação grupo *versus* momento não foram detectados para área de CL. Um aumento significativo na área luteal foi detectado somente entre D2 e D6. A partir de D7 a área luteal foi estatisticamente semelhante à D0 (Figura 58).

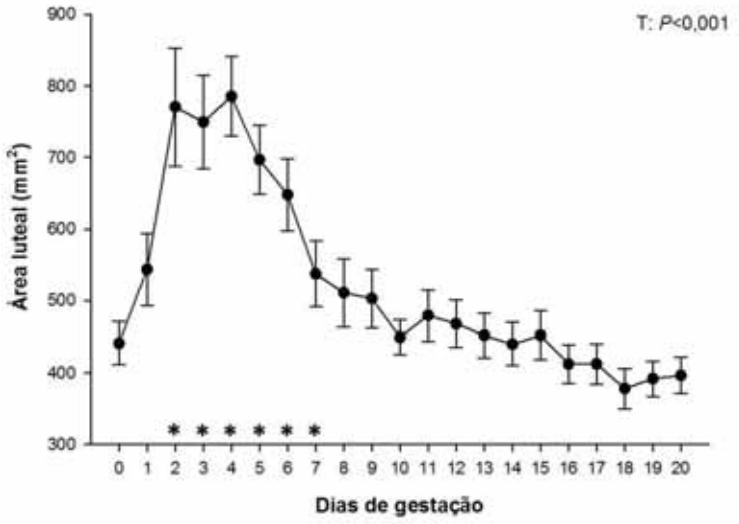

FIGURA 58. Média para área luteal de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação (n=18 éguas). Experimento 2. Aumentos significativos (P<0,05) na área luteal em relação à D0 são indicados por asterisco.

Efeito de idade e intensidade de alterações degenerativas não foi observado para o dia de cessar da mobilidade embrionária (*P*>0,1). Em média o cessar da mobilidade ocorreu 17,04±0,17 dias após a ovulação (variando de D16 até D19). Efeito de momento (*P*<0,001), mas não de grupo (*P*>0,1) foi observado para o diâmetro da vesícula embrionária. Um aumento progressivo no diâmetro da vesícula embrionária foi observado até D16. Entre D16 e D20 o diâmetro da vesícula embrionária foi constante. Média±E.P.M para diâmetro de vesícula embrionária entre D10 e D20 independente da classificação histológica endometrial e idades dos animais são apresentados na Tabela 21.

TABELA 20. Média±E.P.M para diâmetro da vesícula embrionária entre os dias 10 e 20 da gestação (n= 18 éguas). Experimento 2.

Dias de gestação	Diâmetro (mm)
10	2,91±0,31f
11	5,66±0,40ef
12	9,33±0,52de
13	13,36±0,56cd
14	17,54±0,69bc
15	21,59±0,54b
16	27,95±0,64a
17	28,48±0,70a
18	29,74±0,68a
19	30,54±0,89a
20	30,23±0,65a

a, b,c, d, e, f Letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si (*P*<0,05).

Discussão

7. DISCUSSÃO

Assim como a ultrassonografia convencional tornou-se uma ferramenta indispensável na reprodução assistida de equinos, a ultrassonografia apresenta um grande potencial de aplicação tanto na pesquisa como a campo e seu uso certamente crescerá progressivamente nos próximos anos. Entretanto, sabe-se que uma parte significativa dos estudos iniciais envolvendo a hemodinâmica uterina e ovariana de éguas apresentaram erros de metodologia e/ou análise de dados. Hoje, um cuidado especial deve ser tomado no intuito de aperfeiçoar os estudos nesta área. Caso contrário, a publicação de achados incoerentes e não reproduzíveis poderão levar a um futuro descrédito da tecnologia Doppler perante a sociedade científica e veterinários de campo.

Por ser uma técnica não invasiva que fornece informações em tempo real sobre o fluxo sanguíneo tecidual, a ultrassonografia Doppler tem se mostrado fundamental para a realização de estudos *in vivo* sobre a fisiologia da reprodução de animais de grande porte. O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a influência da idade e da intensidade das alterações degenerativas endometriais sobre a hemodinâmica uterina de éguas no período pós-cobertura e fase inicial da gestação.

Os achados serão de grande valia para a melhor compreensão dos fenômenos envolvidos nos processos de fertilização, “limpeza” uterina pós-cobertura e reconhecimento embrio-maternal da gestação em éguas. Os resultados serão importantes para a melhor compreensão da etiogenia de patologias envolvida nos fenômenos em questão, e consequentemente, para o desenvolvimento de novos tratamentos preventivos e/ou clínicos para as mesmas na espécie equina. Além disso, este estudo ratificou a viabilidade das artérias mesometriais para a coleta sequencial de dados de índices Doppler, assim como o uso da ultrassonografia Doppler função *Power-flow* para a avaliação qualitativa da perfusão sanguínea do utero de éguas gestantes e não gestantes.

Nenhum tipo de sedação farmacológica foi utilizada durante o experimento. Araujo & Ginther (2009) afirmaram que o uso de detomidina (3mg/égua, IV) para sedação de éguas não interfere no fluxo sanguíneo dos órgãos reprodutivos, podendo ser utilizada como método auxiliar para a avaliação colorida Doppler da perfusão vascular do útero e ovários. Entretanto, nenhum estudo até o momento

demonstrou os efeitos da administração sucessiva de sedativos, assim como a utilização de diferentes doses e fármacos, sobre a hemodinâmica do trato reprodutivo de animais de grande porte. Devido à escassez de estudos sobre o assunto, com o intuito de minimizar movimentação excessiva do animal e, posteriormente, a produção de artefatos recomenda-se o uso de outros artifícios que não a sedação farmacológica. De preferência, o exame ultrassonográfico deve ser a realizado em ambiente fechado e climatizado, desta forma evita-se a ofegação e mioclonias em excesso devido ao desconforto térmico. A presença de um segundo animal ou de um assistente próximo ao tronco de contenção tendem a acalmar a égua e facilitar a coleta de dados. Se possível, o exame deve ser realizado em horários distintos do arraçoamento, quando os animais encontram-se agitados e com movimentos peristálticos intensificados.

No experimento 1, parâmetros quantitativos mantiveram-se constantes ao longo das 12 horas pós-inseminação em éguas com idades distintas e/ou com diferentes classificações histológicas do útero. Estes achados sugerem que a realização de exames ultrassonográficos Doppler por via transretal sucessivos e por um longo período não apresentam efeitos sobre a hemodinâmica do trato reprodutivo de éguas. Esta informação será importante durante a elaboração de estudos futuros visando a melhor compreensão de diversos fenômenos presentes no período pós-cobertura em éguas.

Este foi o primeiro estudo a associar o uso de exames ultrassonográficos Doppler quantitativo (modo Espectral) e qualitativo (modo Doppler) para a avaliação da hemodinâmica uterina de éguas durante as 12 primeiras horas pós-cobertura e durante os primeiros 20 dias da gestação. O exame espectral teve por objetivo principal determinar os índices Doppler mesometriais, além de avaliar sua relação com a análise subjetiva da perfusão sanguínea do útero. Estudo anterior fez uso da artéria uterina para a avaliação indireta da vascularidade do útero de éguas cíclicas após a infusão de sêmen (BOLLWEIN et al., 2003a).Entretanto, os autores não demostraram de que forma as alterações na velocidade de fluxo sanguíneo observadas na artéria uterina refletem na perfusão sanguínea do útero, já que nenhuma avaliação direta no tecido alvo (endométrio e miométrio) foi realizada.

A descrição de valores exatos para RI e PI de éguas com idades e características endometriais distintas do presente estudo possibilitará a

determinação de padrões de normalidade para ambos os índices Doppler uterinos para o diestro, período pós-cobertura e fase inicial da gestação. A determinação dos padrões de normalidade será de vital importância em estudos futuros visando o diagnóstico precoce de distúrbios comumente observados em éguas que possam comprometer sua fertilidade. Em seres humanos, a mensuração de RI e PI da artéria uterina ao longo do ciclo menstrual através da dopplervelocimetria permitiu o posterior uso da tecnologia Doppler para o diagnóstico diferencial de diversas patologias uterinas, como por exemplo, miomas, adenomiose, neoplasia trofoblástica gestacional e até mesmo casos de infertilidade (CERRI et al., 1998)

Como o objetivo do presente estudo foi avaliar a hemodinâmica uterina em éguas em diferentes situações, o ideal seria realizar o exame objetivo da hemodinâmica em vasos localizados no tecido endometrial e/ou miometrial. Entretanto, de acordo com Silva et al. (2005), sinais coloridos Doppler presentes no endométrio uterino são inadequados para a produção de gráficos de velocidade espectral em éguas não gestantes, enquanto que em éguas gestante é possível realizar o exame objetivo em artérias do mesométrio somente após o décimo dia da gestação. Vasos de pequeno calibre do sistema reprodutivo apresentam fluxo sanguíneo fraco e inconstante devido à baixa elasticidade da parede arterial e a grande distância em relação ao coração (GINTHER, 2007). O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, o uso eficaz de artérias do mesométrio para a mensuração de índices Doppler do útero de éguas não gestantes e gestantes. Em éguas cíclicas não gestantes foi possível produzir gráficos de velocidade espectral a partir de vasos mesometriais durante os 12 primeiros dias pós-ovulação, assim como avaliar éguas com folículos >35 mm de diâmetro e sinais de eminência de ovulação durante 13 horas consecutivas. Além disso, a mensuração dos índices Doppler mesometriais foi realizada diáriamente entre D0 e D20 em éguas gestantes. De acordo com Ginther e Utt (2004), o Ângulo Doppler tem influência direta sobre a Frequência Doppler e, consequentemente, sobre a mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo. Para produzir um gráfico espectral com valores de velocidade de fluxo sanguíneo confiáveis exige-se um Ângulo Doppler entre 0° e 60°. Ângulos superiores 60° interferem significativamente nos valores de velocidade de fluxo sanguíneo, tornando o exame impreciso e de baixa confiabilidade. Devido a grande tortuosidade dos vasos localizados no mesométrio uterino não é possível

determinar seu Ângulo Doppler. Nestas situações, de acordo com Silva et al. (2005) e Ferreira et al. (2008), recomenda-se a utilização dos índices Doppler, já que seus valores independem do ângulo de insonância do transdutor em relação ao vaso sanguíneo. Desta forma, os valores de velocidade de fluxo sanguíneo de artérias mesometriais não devem ser considerados para a avaliação da hemodinâmica uterina.

Em ambos os experimentos deste estudo fez-se uso da ultrassonografia modo Doppler função *Power-flow* para a avaliação qualitativa da perfusão sanguínea do útero. De acordo com Ginther (2007), a função *Power-flow* é mais sensível a sinais coloridos discretos e produz menos artefatos quando comparado à função Color-flow convencional. Consequentemente, recomenda-se a função *Power-flow* para a avaliação de vasos de pequeno diâmetro e com fluxo sanguíneo baixo, como os presentes no útero e ovários de éguas. Adicionalmente, o miométrio apresenta uma vasta rede de vasos sanguíneos. Portanto, ambas as camadas do útero (miométrio e endométrio) devem ser levadas em consideração durante a avaliação subjetiva da perfusão vascular uterina de éguas gestantes e não gestantes (FERREIRA et al., 2008; 2011). De forma semelhante, a perfusão sanguínea luteal também foi avaliada subjetivamente através do modo Doppler função *Power-flow*. A maioria dos estudos da atividade ovariana de animais de grande porte basearam-se nos achados ultrassonográficos obtidos através da função *Color-flow* (GINTHER et al, 2005; GINTHER et al., 2006a; ARAUJO et al., 2009). Entretanto, pesquisas recentes tendem a avaliar o estatus funcional de folículos e CLs de éguas e vacas através da função *Power-flow* (GINTHER et al., 2008; SIDDIQUI et al., 2010).

7.1 Experimento 1

Os achados do presente estudo suportam a hipótese de que um aumento na vascularidade uterina em resposta a infusão de sêmen ocorre em éguas. Os resultados obtidos no Experimento 1 demonstraram uma interação imediata e de curta duração entre o útero e o sêmen durante o período pós-IA em éguas com idades distintas e diferentes características histológicas endometriais. Inicialmente, um aumento na perfusão sanguínea do útero foi detectado duas horas após a infusão de sêmen. Entretanto, a vascularidade uterina diminuiu e foi semelhante ao observado no momento prévio à inseminação a partir da terceira

hora pós-IA. Adicionalmente, um segundo, porém discreto, aumento na perfusão sanguínea do útero foi detectado de forma isolada na hora 8 pós-IA.

As alterações na hemodinâmica uterina durante o período pós-IA eram esperadas devido à resposta inflamatória induzida pela deposição do sêmen no corpo uterino e sua posterior e rápida distribuição ao longo de todo o órgão. Em éguas, a endometrite pós-IA é um fenômeno transitório e fisiológico caracterizada pelo afluxo de neutrófilos para o lúmen uterino com o objetivo de eliminar agentes contaminantes e espermatozoides defeituosos, mortos e/ou excedentes (TROEDSSON et al., 2001). De acordo com Bollwein et al. (2003a), um aumento significativo de células inflamatórias no lúmen uterino é observada uma hora após a infusão de sêmen ou plasma seminal. Já Katila (1995) relatou a presença intra-uterina de polimorfonucleares (PMN) 30 minutos após a inseminação. Acredita-se que a presença de espermatozoide estimula a quimiotaxia de PMN através da ativação do Sistema Complemento. Por sua vez, o Sistema Complemento media uma séria de fenômenos biológicos, dentre eles a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular do útero (TROEDSSON et al., 2001). Como todo processo inflamatório, esta é uma resposta inespecífica do organismo caracterizada por uma vasodilatação transitória seguida por um maior afluxo de sangue regional. De acordo com Bollwein et al. (2003a), um aumento na velocidade média máxima do fluxo sanguíneo da artéria uterina de éguas não gestantes é observado na primeira hora após a infusão de sêmen. Entretanto, os valores dos índices Doppler da artéria uterina, assim como a perfusão sanguínea do tecido uterino não foram avaliados no estudo em questão e, portanto, o mesmo não deve ser utilizado para afirmar possíveis alterações na perfusão sanguínea do útero de éguas após a infusão de sêmen.

Estudo em ovelhas demonstrou que durante processos inflamatórios agudos do útero ocorre um aumento na concentração livre de PGE_2 que, por possuir ação vasodilatadora, estimula um aumento na vascularidade uterina (STILL & GREISS, 1978). O óxido nítrico também possui potente ação miorelaxante do sistema vascular e sua atuação no útero de fêmeas gestantes e não gestantes de diferentes espécies tem sido relatada. Um aumento na expressão de óxido nítrico sintetase tipo II e, consequentemente, na produção de oxido nítrico foram observados no útero de ratas acometidas por endometrite de origem bacteriana (FANG et al.,1999). O aumento na produção de óxido nítrico no útero de

mulheres não gestantes tem sido associado com uma intensa vasodilatação e inibição da agregação plaquetária observadas em casos de menorragia durante o período menstrual (NORMAN & CAMERON, 1996). Além disso, Bollwein et al. (2000) relataram um aumento na perfusão sanguínea do útero de éguas após a suplementação de oxido nítrico por via oral.

A ação do plasma seminal durante endometritis pós-IA em éguas não é totalmente compreendida até o momento. Entretanto, acredita-se que o mesmo module a resposta inflamatória do útero induzida pela interação espermatozoide-endométrio. De acordo com Troedsson et al. (2000), o plasma seminal apresenta ação supressora sobre a ativação do Sistema Complemento e sobre a quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos PMN presentes no lúmen uterino. Além disso, estudos variados sugerem que a inseminação com sêmen congelado induz a uma intensa e prolongada resposta inflamatória uterina pós-IA devido à remoção do plasma seminal durante o processo de criopreservação (revisado por TROEDSSON et al., 2001). Todavia, estudo recente demonstrou que o plasma seminal possui propriedades vasodilatadoras no sistema reprodutivo de éguas. De acordo com Bollwein et al. (2003), a infusão de plasma seminal estimula um aumento na velocidade média sanguínea máxima da artérias uterina e ovariana de éguas durante as primeiras 24 horas pós-infusão, o que poderia ser associado com um aumento na perfusão sanguínea do útero. Porém, uma avaliação direta sobre o tecido alvo não foi realizada no estudo em questão.

O plasma seminal contém prostaglandinas e estrógeno (BIELAŃSKI et a., 1982; CLAUS et al., 1992; RAESIDE & CHRISTIE, 1997) e estes possuem propriedades vasodilatadoras. Entretanto, a ação do estrógeno de origem plasmática e seminal sobre a vascularidade uterina é questionável. No Experimento 1 do presente estudo, as inseminações foram realizadas após a detecção de um folículo com diâmetro >35mm associado à edema uterino evidente. Logo, podemos supor que no momento imediatamente antes da inseminação a concentração plasmática de estrógeno de todas as éguas era elevado, enquanto que a perfusão sanguínea do útero foi baixa independente da idade de classificação histológica dos animais. Este achado sugere que a concentração plasmática de estrógeno não interfere na vascularidade uterina em éguas. Já Bollwein et al. (2002a) relataram uma relação negativa entre o nível plasmático de estrógeno e o PI da artéria uterina ao longo do ciclo estral de

éguas não gestantes, ou seja, em concentrações elevadas de estrógeno observou-se uma diminuição de PI da artéria uterina, o que sugere um aumento na perfusão sanguínea do útero. Seguindo este raciocínio, Bollwein et al. (2003) sugerem que um aumento na concentração de estrógeno no lúmen uterino devido à infusão de plasma seminal possa ocasionar uma vasodilatação endometrial e, consequentemente, um aumento na perfusão sanguínea do útero. Entretanto, em nenhum dos estudos realizados por Bollwein et al. (2002a, 2003) foi realizada a avaliação direta da vascularidade no tecido uterino e sua relação com ambos, PI da artéria uterina e nível plasmático e/ou seminal de estrógeno. Desta forma, não é possível afirmar qual o efeito do plasma seminal e de altas concentrações sistêmicas de estrógeno sobre a perfusão sanguínea do útero e novos estudos a respeito são necessários.

A localização do folículo pré-ovulatório não interferiu na hemodinâmica uterina de éguas com diferentes idades e achados histológicos, já que não foi observada diferença estatística para perfusão sanguínea entre os cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação durante as 12 primeiras horas pós-infusão em nenhum dos grupos experimentais avaliados. Imediatamente após a cobertura dá-se inicio o transporte espermático em direção ao sítio de fertilização e quatro horas após a inseminação com sêmen refrigerado a população de espermatozoides nos ovidutos de éguas é próxima da máxima (BADER & KRAUSE, 1980). Além disso, a distribuição de espermatozoides nos cornos e tubas uterinas não sofre influência da posição do folículo pré-ovulatório e, consequentemente, do lado da ovulação e um aumento significativo no número de células espermáticas é detectado em ambas as junções útero-tubáricas duas horas após a infusão de sêmen (FIALA et al., 2008; 2010b). Como dito anteriormente, o aumento na perfusão sanguínea do útero possivelmente está relacionado com a interação espermatozoide-endométrio e da ação de constituintes do plasma seminal sobre o tecido uterino. Desta forma, alterações de perfusão sanguínea similares nos cornos uterinos ipsi e contra-lateral à ovulação eram esperadas devido ao tipo de infusão utilizado neste estudo (inseminação de grande volume de sêmen refrigerado no segmento intermediário do corpo uterino) e a distribuição rápida e homogênea do sêmen por todo o órgão.

Efeito do intensidade da degeneração endometrial foi observado para perfusão sanguínea do útero de éguas durante o período pós-IA. Entretanto,

nossos achados não confirmaram a hipótese inicial de que em éguas alterações degenerativas severas apresentaram menor vascularidade uterina durante as 12 primeiras horas pós-IA. No momento prévio a infusão de sêmen (h0) a perfusão sanguínea do útero foi semelhante e baixa nos três grupos experimentais (GI, GII e GIII). Durante a avaliação subjetiva da vascularidade uterina de éguas com diferentes categorias de degeneração endometrial, um aumento discreto na perfusão sanguínea de ambos os cornos uterinos (ipsi e contra-lateral à OV) foi observado somente na segunda hora pós-IA das éguas com alterações histopatológicas intermediárias e severas (categorias II e III, respectivamente). A vascularidade uterina das éguas categoria I foi constante durante as 12 horas posteriores a IA. Entretanto, a vascularidade uterina dos três grupos experimentais foi semelhante no momento h2. É possível que a não detecção de um aumento na perfusão sanguínea em éguas GI no momento h2 foi consequencia de uma maior variação dentro do grupo associado ao grande rigor da análise estatística utilizada.

A hipótese inicial de que existe uma relação negativa entre a idade da égua e a perfusão sanguínea uterina pós-IA não foi confirmada. Entretanto, alterações na hemodinâmica uterina foram detectadas de acordo com a idade das éguas. Ao avaliar éguas com idades distintas, um aumento progressivo na vascularidade uterina foi detectado durante as duas primeiras horas pós-IA em éguas velhas (idade ≥15 anos), enquanto que em éguas jovens (idade ≤6 anos) a perfusão sanguínea do útero foi constante e baixa durante as 12 primeiras horas pós-inseminação. Como observado nos grupos classificados de acordo com os achados histológicos, a perfusão sanguínea do útero de éguas jovens e velhas foi estatisticamente semelhante nos momentos h1 e 2. É possível que um aumento na vascularidade não foi detectada no útero de éguas jovens nos momentos h1 e 2 devido ao valor ligeiramente aumentado da perfusão sanguínea no momento prévio a inseminação artificial (h0) associado à maior variabilidade de valores para o parâmetro durante as primeiras horas pós-IA e a rigidez da análise estatística utilizada. Adicionalmente, não foi observada alteração significativa nos índices Doppler uterinos em éguas jovens.

É possível que o aumento imediato e de curta duração na perfusão sanguínea detectado no útero de éguas velhas e/ou com intensas alterações degenerativas no útero deva-se a uma resposta inflamatória pós-IA mais intensa quando

comparado a animais jovens e/ou com endométrio sadio. Uma maior variedade de fatores predisponentes à endometrite persistente pós-IA são detectados em éguas velhas e com histórico de partos múltiplos (HURTGEN, 2006). A idade avançada em éguas pode ser ainda associada a maior severidade de fibrose endometrial, disfunções vasculares uterinas e outros fatores associados com redução na fertilidade (DOIG et al., 1981; OIKAWA et al., 1993; Nambo et al. 1995, GRÜNINGER et al., 1998; SCHOON et al. 1999; ULIANI et al., 2010). A intensidade das alterações degenerativas endometriais e a incidência de cistos uterinos aumentam progressivamente de acordo com a idade e/ou com o número de parições do animal (GRÜNINGER et al., 1998; FERREIRA et al., 2008; HOFFMANN et al., 2009).

Índices Doppler (RI e PI) arteriais apresentam uma correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão. Desta forma, uma diminuição de pelo menos um dos índices Doppler mesometriais era esperada nos momentos de aumento significativo na perfusão sanguínea do útero, o que foi observado somente em éguas com intensa degeneração endometrial. Ao avaliar éguas independente da idade e da classificação histológica não foram detectadas variações em PI ou RI durante as 12 primeiras horas pós-IA. Além disso, os índices Doppler mantiveram-se inalterados mesmo durante os momentos em que aumentos na perfusão sanguínea do útero foram visualizados em éguas velhas e éguas GII. Desta forma, esses achados sugerem que não é possível avaliar modificações fisiológicas na hemodinâmica uterina de éguas durante o período pós-IA através da mensuração dos índices Doppler mesometriais. Entretanto, o relato destes valores será de vital importância para a determinação de padrões de normalidade para índices de resistência e pulsatilidade uterina durante as 12 primeiras horas pós-inseminação artificial.

As velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial (PSV e EDV) não apresentaram alterações significativas ao longo das 12 primeiras horas pós-IA, independente dos grupos experimentais (idade ou categorias de degeneração endometrial). De forma semelhante ao relatado no presente estudo, Ferreira et al. (2008) não detectaram relação entre as velocidades de fluxo sanguíneo mesometrial (PSV, TAMV e EDV) com alterações nos índices Doppler e perfusão sanguínea do útero de éguas não gestantes em diferentes estágios do ciclo estral. As artérias do mesométrio uterino apresentam anatomia tortuosa, o que

impossibilita a determinação do Ângulo Doppler durante o exame ultrassonográfico (SILVA et al., 2005). Consequentemente, é provável que muitas mensurações foram realizadas utilizando um ângulo Doppler >60°, o que diminui a acurácia do exame (GINTHER & UTT, 2004; GINTHER, 2007).

Um aumento na contratilidade uterina de intensidade semelhante foi detectado nas duas primeiras horas após a infusão de sêmen em éguas de todos os grupos experimentais (idade e classificação histológica). Em éguas, o aumento na atividade contrátil do útero associado ao relaxamento da cervix é um dos principais mecanismos de defesa do organismo observado durante o período pós-IA que tem como objetivo auxiliar na drenagem via cervical de agentes contaminantes e fatores inflamatórios oriundos a interação espermatozóide-endométrio (TROEDSSON et al., 1998). Em éguas não gestantes um aumento espontâneo na atividade contrátil do útero é observado durante o período pré-luteolítico e luteolítico, quando a concentração plasmática de prostaglandina F2α é máxima (CROSS & GINTHER, 1988; GRIFFIN & GINTHER, 1993a). Adicionalmente, sabe-se que a administração sistêmica e intrauterina de prostaglandina F2α induz ao aumento na contratilidade uterina de éguas não gestantes e gestantes, respectivamente (GASTAL et al. 1998b; 1998c). É possível que a presença de estrógeno e prostaglandina no plasma seminal (BIELAŃSKI et al., 1982; CLAUS et al., 1992; Goff et al., 1993) estimule um aumento imediato na atividade contrátil do útero de éguas sem que este fenômeno seja influenciado pelas características endometriais ou pela idade dos animais.

7.2 Experimento 2

Este estudo descreveu, pela primeira vez, os valores dos Índices Doppler (RI e PI) mesometriais ao longo dos primeiros 20 dias de gestação de éguas com idades distintas e diferentes categorais de degeneração endometrial. Os resultados observados no Experimento 2 confirmaram a hipótese de que o útero gestante e não gestante apresentam perfusão sanguínea semelhante durante os primeiros 10 dias pós-ovulação. Entretanto, a descrição de aumento precoce na perfusão sanguínea do útero acompanhado por uma diminuição no índice de pulsatilidade mesometrial de éguas gestantes e não gestante é um relato inédito na literatura.

De acordo com Silva et al. (2005), os sinais coloridos Doppler presentes no endométrio são inadequados para a produção de gráficos espectrais, enquanto que vasos mesometriais possibilitam a realização da análise objetiva da hemodinâmica uterina de éguas prenhes após o décimo dia da gestação. No presente estudo, a mensuração dos dados espectrais foi realizada diariamente entre D0 e D20 em éguas gestantes. Adicionalmente, éguas não gestantes foram avaliadas uma vez ao dia ao longo dos 12 primeiros dias pós-ovulação. Durante as avaliações diárias realizadas no Experimento 2, aumentos na vascularidade uterina de éguas gestantes e não gestante foram acompanhados por diminuição nos valores dos índices Doppler mesometriais. Esta relação negativa entre vascularidade uterina e índices Doppler mesometriais estão de acordo com o descrito anteriormente (GINTHER & UTT, 2004; SILVA et al., 2005; GINTHER 2007). Desta forma, a avaliação objetiva da hemodinâmica uterina validou os achados subjetivos do presente estudo. Além disso, o presente estudo demonstrou que índices Doppler de artérias mesometriais podem ser obtidos em diferentes momentos do ciclo estral de éguas não gestantes, assim como durante toda a fase inicial da gestação.

Achados deste estudo quanto à perfusão sanguínea do útero de éguas divergem de relatos anteriores. De acordo com Silva et al. (2005), éguas não gestantes apresentam vascularidade endometrial baixa e constante durante os 10 primeiros dias pós-ovulação, enquanto que um aumento progressivo na perfusão sanguínea do endométrio é detectado em éguas gestante somente após D10. No presente estudo, éguas gestantes e não gestantes apresentaram perfusão sanguínea e valores de Índices Doppler semelhantes nos primeiros 12 dias pós-ovulação. Entretanto, um aumento na vascularidade uterina em D4 acompanhado pela diminuição de PI em D3 e D4 foi observado em ambos os grupos experimentais. Para a análise subjetiva deste estudo foi utilizado o modo Doppler função *Power-flow* conforme descrito por Ferreira et al. (2008). Quando comparado ao Color Doppler convencional, o modo *Power-flow* apresenta maior sensibilidade aos discretos sinais coloridos produzidos por vasos de pequeno calibre e baixo fluxo sanguíneo, como os presentes no útero equino (GINTHER & UTT, 2004). Adicionalmente, ambos as camadas uterinas (endométrio e miométrio) foram consideradas durante o exame. Estudos anteriores avaliaram somente a presença de pontos coloridos Doppler presentes no endométrio (SILVA

et al, 2005; SILVA & GINTHER, 2006). Porém, como o miométrio uterino possui uma rica rede vascular, sugere-se que todas as camadas uterinas sejam consideradas durante a avaliação subjetiva da perfusão sanguínea do útero (FERREIRA et al., 2008). Logo, é possível que o uso da junção *Power-flow* associado à avaliação das duas camadas uterinas facilitou a visualização de variações na vascularidade uterina de éguas gestantes e não gestantes durante os 12 primeiros dias pós-ovulação.

Os fenômenos fisiológicos responsáveis pelas alterações na hemodinâmica uterina de éguas entre D3 e D4 ainda são obscuros até o momento. A ausência de fluído intra-uterino em conjunto com os baixos e constantes valores para vascularidade tecidual durante os primeiros dias pós-inseminação sugerem que a alteração precoce na perfusão sanguínea e nos índices Doppler uterinos de éguas não está associada a nenhum processo patológico do sistema reprodutivo frequentemente observados nesta fase, como por exemplo, endometrite persistente pós-IA. Na espécie equina, somente embriões viáveis são transportados para o útero, enquanto que oócitos e embriões degenerados são retidos no oviduto por meses (BETTERIDGE et al., 1974; FLOOD et al., 1979) . A vesícula embrionária equina migra para o útero normalmente entre o quinto e sexto dia da gestação (OGURI et al., 1972; BETTERIDGE et al., 1982), dentre outros fatores, devido a ação miorelaxante e vasodilatadora da prostaglandina E2 de origem embrionária sobre a junção útero-tubárica (WEBER et al., 1991a; ROBINSON et al., 2000). Weber et al. (1991b) detectaram PGE_2 embrionária a partir do terceiro dia da gestação, e observaram que a produção de PGE_2 aumentou significativamente somente entre D5 e D6. Todas as éguas do Experimento 2, gestantes e não gestantes, foram inseminadas em D-1. É possível que algumas em éguas do grupo Não Gestante ocorreu a fertilização e, posteriormente, sofreram perda embrionária precoce antes do dia de diagnóstico da gestação (BALL, 1988). Logo, os achados ultrassonográficos Doppler podem estar associados com alterações uterinas fisiológicas que ocorrem no início do diestro ou, ainda, com adaptações hemodinâmicas do sistema reprodutivo com o intuito de estimular o transporte embrionário através do oviduto e preparar o ambiente úterino para receber o embrião entre D5 e D6. Desta forma, novos estudos a respeito se fazem necessários.

O aumento progressivo da vascularidade uterina a partir do décimo segundo dia da gestação e o efeito da localização do embrião, mas não da posição do CL, sobre perfusão sanguínea do útero a partir de D15 em éguas independente da idade e da classificação histológica estão de acordo com o descrito anteriormente por Silva et al. (2005). Além de equinos, o aumento na perfusão sanguínea do útero gravídico foi previamente relatado em outras espécies animais, como por exemplo, ovinos, suínos e bovinos (FORD & CHRISTENSON, 1979; FORD et al., 1979; REYNOLDS et al., 1984; SILVA & GINTHER, 2010). Foi sugerido que o estrógeno estimula o aumento na perfusão sanguínea do útero em bovinos e ovinos (FORD, 1982). Porém, como já mencionado anteriormente, o efeito do estrógeno sistêmico sobre a hemodinâmica uterina em éguas é questionável. A variação na perfusão sanguínea de um mesmo segmento uterino de acordo com a mobilidade embrionária (SILVA et al., 2005) é um forte indício que fatores embrionários e sua interação com o endométrio materno estejam relacionados com aumento no aporte sanguíneo do útero gravídico. É possível que as alterações na vascularidade uterina observadas neste estudo estejam relacionadas com a síntese e secreção local de prostaglandinas e estrógeno de origem embrionária. Estudos *in vitro* demostram que o embrião equino produz prostaglandina e estrógeno a partir de D3 e D12 (WEBER et al., 1991a; 1991b; Raeside et al., 2004). Mesmo após a entrada no útero, o embrião equino continua a produzir prostaglandinas (WEBER et al., 1992; VANDERVALL et al., 1993b), sendo que a secreção de PGE_2 mantem-se elevada até D32, enquanto que a produção de $PGF_{2\alpha}$ diminui drasticamente após D18 (STOUT & ALLEN, 2002).

A hipótese que a intensidade das alterações degenerativas endometriais afeta negativamente a hemodinâmica de éguas durante a fase inicial da gestação foi confirmada. Em uma primeira análise desconsiderando a posição do embrião, aumentos progressivos e de intensidade semelhante da perfusão sanguínea foram detectados em ambos os cornos uterinos (ipsi e contra-lateral à ovulação) de éguas GI, GII e GIII. Entretanto, ao avaliar a hemodinâmica uterina de acordo com a localização do embrião, uma maior perfusão sanguínea e uma redução no índice de pulsatilidade mesometrial foram detectadas no corno gravídico quando comparado ao corno contra-lateral em todos os grupos experimentais. Portanto, pode-se concluir que o embrião induz a variações locais na perfusão sanguínea do útero independente do grau de comprometimento endometrial. Porém, a

magnitude deste fenômeno hemodinâmico variou de acordo com a classificação histológica dos animais. Aparentemente a interação concepto-uterina durante a fase inicial da gestação é afetada negativamente de acordo com a intensidade das alterações degenerativas endometriais, já que vascularidade média de ambos os cornos uterinos (ipsi e contra-lateral ao embrião) de éguas categoria III foi menor do que a de éguas categorias I e II. Além disso, éguas com útero sadio apresentaram maior perfusão sanguínea no corno gravídico após o cessar da mobilidade embrionária do que éguas com intensa degeneração endometrial. Estudo recente em éguas não gestantes relatou uma menor perfusão sanguínea em segmentos uterinos com grande área cística em relação à segmentos adjacentes sem cistos (FERREIRA et al., 2008).

Os achados obtidos no Experimento 2 confirmaram a hipótese de que a idade, assim como o intensidade de degeneração endometrial, apresenta efeito negativo sobre a hemodinâmica uterina de éguas durante os primeiros 20 dias da gestação. Um aumento agudo e precoce da vascularidade uterina, acompanhada pela diminuição dos índices Doppler, foi observado somente em éguas jovens. Já um aumento progressivo da perfusão sanguínea do útero com o avançar da gestação foi observado em éguas jovens e adultas a partir de D14 e 15, respectivamente. Por sua vez, em éguas com idade superior a 15 anos não foi observado aumento na perfusão sanguínea do útero nos primeiros 20 dias da gestação. Nos três grupos classificados de acordo com a idade (Jovem, Adulto e Velho), o valor médio da vascularidade uterina do corno ipsi-lateral ao embrião foi maior que no corno contra-lateral. Entretanto, nossos achados sugerem que o efeito local do embrião sobre a hemodinâmica uterina diminuiu com o avançar da idade. A ação do embrião sobre a perfusão sanguínea foi mais evidente em éguas jovens, nas quais o corno gravídico apresentou maior vascularidade do que o corno não gravídico em praticamente todos os dias a partir de D15. Em éguas adultas, o corno ipsi-lateral ao embrião apresentou maior perfusão sanguínea do que o corno uterino contra-lateral durante os dois dias após o cessar da mobilidade embrionária. Já a vascularidade dos cornos uterinos ipsi e contra-lateral ao embrião de éguas velhas foi semelhante em oito dos nove dias avaliados (entre D12 e D20).

Os achados aqui apresentados sugerem que tanto éguas velhas como éguas com alterações degenerativas endometriais intensas apresentam perfusão

sanguínea reduzida durante a fase inicial da gestação. De forma semelhante, em estudo recente utilizando ultrassonografia Doppler relatou-se uma diminuição na perfusão sanguínea do útero de éguas cíclicas não gestantes idosas e com grande área cística uterina (FERREIRA et al., 2008). Uma maior frequência de alterações degenerativas uterinas (ADAMS et al.,1987; LEIDL et al., 1987; BRACHER et al., 1992) e um aumento progressivo na incidência de cistos uterinos com o avançar da idade (TANNUS & THUN, 1995) tem sido relatado. Alterações vasculares degenerativas do útero e fibrose endometrial são achados frequentes em éguas idosas subférteis (DOIG et al., 1981; OIKAWA et al., 1993; NAMBO et al., 1995; GRÜNINGER et al., 1998). De acordo com Lakata et al. (2002), mesmo mulheres saudáveis apresentam alterações estruturais do sistema vascular com o avançar da idade. Em humanos, estas alterações estão associadas com a diminuição da elasticidade vascular e espessamento da parede arterial (VAITKEVICIUS et al., 1993; TAO et al, 2004). A suplementação sanguínea deficiente do útero de éguas com idade avançada provavelmente interfere nos processos fertilização, desenvolvimento embrionário/fetal e na manutenção da gestação. Em estudo recente demonstrou-se uma redução na eficiência reprodutiva de éguas >18 anos quando comparada a animais jovens e adultos (ULIANI et al., 2010). É possível que a baixa perfusão sanguínea ao redor do concepto observada em éguas categoria III e idosas comprometa o processo de fixação e, posteriormente, a continuidade do desenvolvimento embrionário-fetal, o que possivelmente contribuiria para os baixos índices para eficiência reprodutiva de fêmeas idosas e/ou com alterações degenerativas endometriais intensas. Entretanto, novos estudos a respeito se fazem necessários para confirmar tal hipótese.

Entre os dias 12 e 20 da gestação, ambos os índices Doppler mesometriais (PI e RI) apresentaram valores médios reduzidos no corno gravídico em relação ao corno uterino não gravídico de acordo com o relatado anteriormente por Silva et al., (2005). No presente estudo, este fenômeno foi observado em todos os grupos experimentais classificados de acordo com a idade ou com o grau de degeneração endometrial. Como dito anteriormente, a redução no índice Doppler de um vaso sanguíneo indica um aumento no afluxo sanguíneo em direção ao tecido/órgão irrigado pelo mesmo (GINTHER & UTT, 2004; GINTHER, 2007). Logo podemos afirmar que a avaliação quantitativa das artérias mesometriais

validou o exame qualitativo da perfusão sanguínea do útero durante a fase inicial da gestação. Adicionalmente, os dados aqui apresentados poderão ser utilizados como base para a criação de um padrão de normalidade de índices Doppler uterina de éguas gestantes com idades distintas e diferentes categoria de degeneração endometrial. Estas informações quantitativas serão muito importantes em um futuro próximo para o acompanhamento embrionário/fetal e para o diagnostico precoce de distúrbios da gestação em éguas.

Este foi o primeiro relato sobre o efeito da idade e alteração degenerativas endometriais sobre a contratilidade uterina de éguas gestantes. A atividade contrátil máxima entre D10 e D17, seguida por uma diminuição progressiva na contratilidade uterina após o cessar da mobilidade embrionária confirmam relatos anteriores (GRIFFIN & GINTHER, 1993b; BOFANOS et al., 1995). De acordo com Carnevale & Ginther (1994), a contratilidade uterina é reduzida em éguas gestantes idosas. A menor contratilidade média observada em éguas categoria III e a baixa atividade contrátil detectada em dias específicos em éguas idosas sugerem que a idade e intensidade das alterações degenerativas endometriais apresentam um efeito negativo sobre a contratilidade uterina durante a fase inicial da gestação em éguas. Entretanto, mesmo éguas categoria III e/ou velhas apresentaram um aumento na contratilidade uterina entre D10 e D17, estimulando a mobilidade embrionária ao longo de todo o útero, o que resultou no adequado reconhecimento materno e manutenção inicial da gestação (ALLEN & STEWART, 2001). Assim como o sugerido para perfusão sanguínea, as prostaglandinas devem ser consideradas como potenciais estimuladores da atividade contrátil do útero em éguas (GASTAL et al., 1998a; 1998b) e tanto PGE_2 como $PGF_{2\alpha}$ são secretadas pelo embrião durante a fase inicial da gestação (STOUT & ALLEN, 2002).

Este foi o primeiro estudo a registrar as características ultrassonográficas da vesícula embrionária durante a fase inicial da gestação de éguas de acordo com as características histológicas endometriais. Esses achados não suportam a hipótese de que a idade e/ou a intensidade das alterações degenerativas endometriais interferem no desenvolvimento embrionário durante os 20 primeiros dias da gestação. Nenhum caso de perda embrionária precoce foi registrado após a visualização ultrassonográfica da vesícula embrionária, o que sugere que o processo de reconhecimento maternal da gestação ocorreu independentemente

da idade e características endometriais. Independentemente do grupo experimental, o diagnóstico da gestação ocorreu entre D9 e D10. A vesícula embrionária foi visualizada predominantemente no corpo uterino durante os três primeiros dias pós-detecção, o que impossibilitou a avaliação da hemodinâmica entre os cornos ipsi e contra-lateral ao embrião antes de D12. Aparentemente a menor perfusão sanguínea observada no corno uterino gravídico de éguas categoria III e/ou idosas não interferiu no desenvolvimento inicial do concepto, já que a taxa de crescimento embrionário foi semelhante em éguas com idades distintas (CARNEVALE & GINTHER, 1992) e diferentes categoria de degeneração endometrial. Uma íntima relação entre o dia de cessar da mobilidade embrionária, a expansão vesicular e o tônus uterino são descritos na literatura (GINTHER, 1985). Ao contrário do relatado anteriormente por Carnevale & Ginther (1992), o cessar da mobilidade embrionária na base de um dos cornos uterinos ocorreu aproximadamente 17 dias após a ovulação (GINTHER, 1983) independentemente da idade ou da intensidade de degeneração endometrial.

Diversos estudos fizerem uso da ultrassonografia Doppler (BOLLWEIN et al., 2002a; 2002b; GINTHER et al., 2007a; 2007b; 2008) para descrever o desenvolvimento e regressão luteal espontânea e induzida em éguas não gestantes. Entretanto, este é o primeiro relato da aplicação da tecnologia Doppler para a avaliação subjetiva do estatus funcional do CL durante a fase inicial em éguas, assim como para descrever o efeito das características endometriais e da idade sobre a vascularidade luteal.

Assim como o descrito anteriormente para éguas não gestantes (GINTHER et al., 2007a; 2007b; 2008), a extensão de tecido luteal com sinais coloridos Doppler demonstrou ser um bom parâmetro para a avaliação qualitativa do estatus funcional do CL equino durante a fase inicial da gestação. Um aumento concomitante e progressivo na vascularidade luteal e na concentração plasmática de progesterona foi observado durante os primeiros dias pós-ovulação. Além disso, valores máximos e constantes para ambos os parâmetros foram observados a partir do sétimo dia da gestação. Por sua vez, a área luteal não deve ser utilizada para a avaliação indireta do nível plasmático de progesterona de éguas gestantes. Um inicial aumento na área luteal foi detectado, porém, poucos dias após a ovulação houve uma redução do diâmetro do CL para dimensões semelhantes ao de D0 que se mantiveram até o final do estudo.

A hipótese de que alterações degenerativas endometriais intensas e a idade da égua estariam relacionadas com a regressão prematura do CL não foi confirmada. Entretanto, os achados do presente estudos demonstraram uma variação na vascularidade luteal e na concentração de plasmática de progesterona de acordo com as características histológicas do endométrio. A vascularidade uterina média e a concentração sérica de progesterona de éguas com intensas alterações degenerativas foram menores do que em éguas com útero sadio ao longo dos primeiros 20 dias da gestação. Entretanto, o nível plasmática de progesterona em éguas categoria III manteve-se constante e acima da concentração mínima necessária (2ng/mL) para a manutenção de gestação na espécie equina (GINTHER et al., 2007b), o que refletiu na ausência de perda embrionária precoce durante os 20 primeiros dias de gestação neste grupo experimental. O CL de éguas velhas também apresentou menor perfusão sanguínea média do que o CL de éguas jovens. Entretanto, essa variação na vascularidade luteal não refletiu sobre as concentrações plasmáticas de progesterona de éguas com idades distintas durante a fase inicial da gestação.

8. CONCLUSÕES

Em função dos resultados inéditos sobre os efeitos da intensidade das alterações degenerativas endometriais e da idade sobre a perfusão sanguínea do útero, assim como sobre a atividade luteal, de éguas gestantes e não gestantes obtidos conclui-se que:

1. Artérias mesometriais podem ser utilizadas para a mensuração de índices Doppler durante diferentes fases do ciclo reprodutivo em éguas (estro, diestro, gestação).

2. Éguas idosas ou com degenerações endometriais de intensidade moderada ou severa apresentaram uma resposta vascular imediata e de curta duração após a inseminação artificial, enquanto que um aumento na atividade contrátil do útero independente da idade e da categoria uterina é detectado nas primeiras horas pós-IA.

3. Um aumento de origem indeterminada na vascularidade uterina acompanhado pela diminuição nos índices Doppler mesometriais foram detectados no quarto dia pós-ovulação de éguas gestantes e não gestantes.

4. Um aumento progressivo no aporte sanguíneo em direção ao útero com o avançar da gestação é observado em éguas. Entretanto, ocorre um efeito negativo da idade e da intensidade de degeneração endometrial sobre a hemodinâmica uterina durante a fase inicial da gestação.

5. Após o décimo segundo dia de gestação, a avaliação da hemodinâmica uterina deve levar em consideração o posicionamento do embrião. Independente da idade e classificação histológica do útero, cornos ipsi-laterais ao embrião apresentam maior perfusão sanguínea e menor índice de pulsatilidade do que o cornos uterinos contra-laterais. O segmento uterino contendo o embrião de éguas categoria III e velhas apresenta baixa perfusão sanguínea quando comparado ao de éguas jovens e com útero sadio.

6. O embrião de éguas com idades distintas e com diferentes classificações histológicas endometriais apresentaram taxa de crescimento semelhante. A atividade contrátil do útero, mas não o dia de cessar da mobilidade embrionária, foi afetada negativamente pela idade e intensidade das alterações degenerativas do útero gestante.

Referências

9. Referências

ADAMS, N.R. A pathological and bacteriological abattoir survey of the reproductive tracts of merino ewes in Western Australia. **Australian Veterinary Journal***,* v.51, p.351–354, 1975.

ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility***,* v.35, p.445–454, 1987.

AGNEW, D.W.; MUNSON, L.; RAMSAY, E.C. Cystic endometrial hyperplasia in elephants. **Veterinary Pathology**, v.41, p.179–183, 2004.

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction***,* v.121, p.513-527, 2001.

ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.13, p.623-634, 2001.

AMARAL D.; CHIARINI-GARCIA, H.; VALE FILHO, V.R.; ALLEN, W.R. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plastic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.56, p.7-12, 2004.

American Association of Equine Pratitioners. **Manual Official Guide for Determining the age of the Horses.** *AAEP*, Lexington, KY, pp 26. 2002.

ARAUJO, R.R.; GINTHER, O.J. Vascular perfusion of reproductive organs in pony mares and heifers during sedation with detomidine or xylazine**. American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.141–148, 2009.

ARAUJO, R.R.; GINTHER, O.J.; FERREIRA, J.C.; PALHÃO, M.M.; BEG, M.A.; WILTBANK, M.C**.** Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **Biology of Reprodction**, v.81, p.426-437, 2009.

BADER, H.; KRAUSE, A. Investigations about the transport, distribution and the fate of the spermatozoa in the genital tract of the mare. In: Proceedings of Ninth International Congress on Animal Reproduction AI, vol. 5, p. 197–205, 1980.

BALL, B.A. Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.4, p.263-290, 1988.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J.F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.25, p.60–62 1997.

BLANCHARD, T.L.; GARCIA, M.C.; KINTNER, L.D.; KENNEY, R.M. Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. **Theriogenology**, v.28, p.445-450, 1987.

BETTERIDGE, K.J.; MITCHELL, D. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare, **Journal of Reproduction**, v.39, p.145-148, 1974.

BETTERIDGE, K.J.; EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P.F.; BERLAULT, P. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v.135, p.191-209, 1982.

BIELAŃSKI, W.; RZASA, J.; OKÓLSKI, A. Prostaglandins in stallion semen. **Theriogenology**, v.17, p.167-173 , 1982.

BONAFOS, L.D.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**., v.43, p.713-721, 1995.

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

BOLLWEI, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.8, p.2129-38, 2002a.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**. v.57, p. 2043-2051, 2002b.

BOLLWEIN, H.; SOWADE, C.; STOLLA, R. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. **Theriogenology**. v. 60, p.607-616, 2003a.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p.597-605, 2003b.

BRACHER, V.; MATHIAS, S.; ALLEN, W.R. Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. **Equine Veterinary Journal***,* v.24, p.279–284, 1992.

BRINSKO, S.P.; BALL, B.A.; ELLINGTON, J.E. In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. **Theriogenology**., v.44, p.461-469, 1995.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D,; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, S.A. The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**. v.33, p.465-475, 1990.

CARNEVALE, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, p.23-30, 2008.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**., v.37, p.1101-115, 1992.

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.

CERRI, G.G.; MÓLNAR, L.J.; VEZOZZO, D.C.P. **Doppler**. São Paulo: Sarvier, 1998.

CHIEN, L.W.; LEE, W.S.; AU, H.K.; TZENG, C.R. Assessment of changes in utero–ovarian arterial impedance during the peri-implantation period byDoppler sonography in women undergoing assisted reproduction. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology***,* v.23, p.496–500, 2004.

CLAUS, R.; DIMMICK, M.A.; GIMENEZ, T.; HUDSON, L.W. Estrogens and prostaglandin F2alpha in the semen and blood plasma of stallions. **Theriogenology**, v.38, 687-693, 1992.

COLE, M.B.; SYKES, S.M. Glycol methacrylate in light microscopy: a routine method for embedding and sectioning animal tissue. **Stain Technology**, v.49, p.387-400, 1974.

CROSS, D.T.; GINTHER, O.J. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. **Journal of Animal Science***,* v.66, p.250-254, 1988.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; KENNEDY, P.C. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. **Journal of the American Veterinary Medical Association***,* v.181, p.680-681, 1982.

AL-DAHASH, S.Y.; DAVID, J.S. Histological examination of ovaries and uteri from cows with cystic ovaries. **Veterinary Record***,* v.101, p.342–347, 1977.

DALLENBACH-HELLWEG, G. **The histopathology of the endometrium**. In Histopathology of the Endometrium, 4 edn, pp 93–297. Ed.G Dallenbach-Hellweg. Berlin: Springer-Verlag 1987.

DYBDAL, N.O.; DAELS, P.F.; COUTO, M.A.; HUGHES, J.P.; KENNEDY, P.C. Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts on biopsy grade. **Journal of Reproduction and Fertililty** p.697–697, 1991.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v.69, p.237–250, 1959.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the cat. **Veterinary Record**, v.74, p.141–146, 1962.

DOIG, P.A.; MCKNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. **Canadian Veterinary Journal**, v.22, p.72-76, 1981.

EILTS, B.E.; SCHOLL, D.T.; PACCAMONTI, D.L.; CAUSEY, R.; KLIMCZAK, J.C.; CORLEY, J.R. Prevalence of endometrial cysts and their effect on fertility. **Biology of Reproduction Monograph**, v.1, p.527–532, 1995.

ESTELLER-VICO, A.; LIU, I.K.; BROSNAN, R.J.; STEFFEY, E. P. Uterine vascular elastosis and its effect on uterine blood flow in cyclic mares. **Animal Reproduction Science**, v.121S, v.1, p.87-88, 2010.

FANG, L.; NOWICKI, B.J.; DONG, Y.L.; YALLAMPALLI, C. Localized increase in nitric oxide production and the expression of nitric oxide isoforms in rat uterus with experimental intrauterine infection. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.181, p.601–609, 1999.

FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of size of the cystic area and age. **Reproduction**, v.135, p.541-550, 2008.

FERREIRA, J.C.; MEIRA, C. Potential use of doppler ultrasound in equine embryo transfer programs. **Ciência Rural**, v.41, p.1063-1069, 2011.

FIALA, S.M.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Sperm distribution in the oviduct and uterus of mares within two hours after artificial insemination. **Pferdeheilkunde,** v. 24, p. 96-98, 2008.

FIALA, S.M.; ESMERALDINO, A.; JOBIM, M.I.M.; GARBADE, P.; WOLF, C.A.; RICHTER, G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Endometrial fibrotic changes. Is one bipsy enough to diagnose degenerative changes? **Animal Reproduction Science** 121S, v.1, p.89-90, 2010a.

FIALA, S.M.; CRUZ, L.A.; RODRIGUES, R.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Sperm cells in the reproductive tract of the mare: where can we find them? **Pferdeheilkunde*,*** v.26, p.19-21, 2010b.

FLOOD, P.F.; JONG, A.; BETTERIDGE, K.J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 291-294, 1979.

FORD, S.P. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of the ewe, sow and cow. **Journal of Animal Science**, v.55(SII), p.32–42, 1982.

FORD, S.P.; CHENAULT, J.R.; ECHTERNKAMP, S.E. Uterine blood flow of cows during the estrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 53–62, 1979.

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

FOX, C.H.; JOHNSON, F.B.; WHITING, J. Formaldehyde fixation. **Journal of the Histochemical Society**, v.33, p.845-853, 1985.

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, p.1025–1038, 1998a.

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; TORRES,C.A.A.; GINTHER, O.J. Effect of pge2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v.50, p.989-999, 1998b.

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; TORRES,C.A.A.; GINTHER, O.J. Effect of oxytocin, prostagland F2α, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. **Theriogenology** v.50, p.521-534, 1998c.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.** Cross Plains WI:Equiservices 1992.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses.** Cross Plains WI:Equiservices, 1995.

GINTHER, O.J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v.19, p.603–611, 1983a.

GINTHER, O.J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology***,* v.19, p.613–623, 1983b.

GINTHER, O.J. Dinamic physical interactions between equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.3, p.41-47, 1985.

GINTHER, O.J. **Producing color-flow images.** In Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography, pp 39–60. Ed. OJ Ginther. Cross Plains: Equiservices Publishing 2007.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology***,* v.21, p.505–516, 1984.

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

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, 2006a.

GINTHER.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Effect of prostaglandin F2alpha 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.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; SIDDIQUI, M.A.; BEG, M.A. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. R**eproduction, Fertility and Development**,v.20, p.955-963, 2008.

GOFF, A.K.; SIROIS, J.; PONTBRIAND, D. Effect of oestradiol on oxytocin-stimulated prostaglandin F2 alpha release in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v98, p.107-112,. 1993.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. **Theriogenology**, v.39, p.997-1008, 1993a.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.311–329, 1993b.

GRÜNINGER, B.; SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; MENGER, S.; KLUG. E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. **Journal of Comparative Pathology***,* v.119, p.293-309, 1998.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATES, B.F. Relationship between condition score, physical meansurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal***,* v.15, p.371-372, 1983.

HOFFMAN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, E.; ALLEN, W.R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H.-A. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions – preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v.19, p.666-669, 2003.

HURTGEN, J.P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. **Theriogenology**, v. 66, p.560-566, 2006.

KASPAR, B.; KAHN, W.; LAGING, C.; LEIDL, W. Endometrial cysts in the mare. 1. Post-mortem studies: occurrence and morphology. **Tiera¨rztliche Praxis***,* v.15, p.161–166, 1987.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction Monogr**., v.1, p.515–517, 1995.

KENNEY, R.M. Clinical aspects of endometrial biopsy in fertility evaluation of the mare. **Proceedings American Association of Equine Practitioners***,* p.105-122, 1977.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association***,* v.172, p.241–262, 1978.

KENNEY, R.M.; GANJAM, V.K. Selected pathological changes of the mareuterus and ovary. **Journal of Reproduction and Fertility***,* v.23, p.335–339, 1975.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embrionic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association***,* v.172, p.241-262, 1978.

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

KOTILAINEN, T; HUHTINEN, M.; KATILA T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v.41, p.629-636, 1994.

KUPESIC, S.; KURJAK, A.; BJELOS, D.; VUJISIC, S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. **Fertility and Sterility**, v.79, p.190-197, 2003.

LAKATTA, E.G. Age-associated cardiovascular changes in health: impacton cardiovascular disease in older persons. **Heart Failure Reviews** v.7, p.29–49, 2002.

LEBLANC, M.M. Identification and treatment of the compromised equine fetus: a clinical perspective. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.24, p.100-103, 1997.

LEIDL, W.; KASPAR, B.; KAHN, W. Endometrial cysts in the mare. 2. Clinical studies: occurrence and significance. **Tiera¨rztliche Praxis**, v.15, p.281–289, 1987.

LEITH, G.S.; GINTHER, O.J. Characterization of intrauterine mobility of the early conceptus. **Theriogenology**, v.22, p.401–408, 1984.

LEFRANC, A.C.; ALLEN, W.R. Endometrial gland surface density and hyperaemia of the endometrium during early pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v.39, p.511-515, 2007.

LEWIS, G.S. Prostaglandin secretion by the blastocyst. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement***,* v.37, p.261–267, 1989.

LIPETZ, K.J.; RICHARDSON, M.E.; IVEY, K.W.; DICKEY, J.F.; DIEHL, J.R.; STUART, L.D. Gross and histological characterization of endometrial tissues from SLA miniature pigs with cystic endometrial hyperplasia. **Acta Anatomica**, v.130, p.137–142, 1987.

LOCQUIN, M.; LANGERON, M. Handbook of microscopy. London: Butterworths, 1983. 322p.

MOREL, M.C.; NEWCOMBE, J.R.; HAYWARD, K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). Theriogenology, v.74, p.1241-1247, 2010.

NAMBO, Y.; OIKAMA, M.; YOSHIRA, T.; KUWANO, A.; KATAYAMA, Y. Age-related morphometrical changes of arteries of uterine wall in mares. **Journal of Veteterinary Medicine, Series A***,* v.42, p.383–387, 1995.

NORMAN, J.E.; CAMERON, I.T. Nitric oxide in the human uterus. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.61-68, 1996.

OGURI N, TSUTSUMI Y. Non.surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non.surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.31, p.187-195, 1972.

OIKAWA, M.; KATAYAMA, Y.; YOSHIHARA, T.; KANEKO, M.; YOSHIKAWA, T. Microscopical characteristics of uterine wall arteries in barren aged mares. **Journal of Comparative Pathology***,* v.108, p.411–415, 1993.

RAESIDE, J.I.; CHRISTIE, H.L. Estrogen concentrations in semen of the stallion. **Animal Reproduction Science,** v.48, p.293-300, 1997.

RAESIDE, J.I.; CHRISTIE, H.L.; RENAUD, R.L; WAELCHLI, R.O.; BETTERIDGE, K.J. Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium during early pregnancy in relation to estrogen concentrations in yolk-sac fluid. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1120–1127, 2004.

REYNOLDS, L.P.; MAGNESS, R.R.; FORD, S.P. Uterine blood flow during early pregnancy in ewes: interaction between the conceptus and the ovary bearing the corpus luteum. **Journal of Animal Science**, v.58, p.423–429, 1984.

RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility***,* v.23, p.341–345, 1975.

RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal***,* v.23, p.189-192, 1991.

ROBINSON, S.J.; NEAL, H.; ALLEN, W.R. Modulation of oviductal transport in mares by local application of prostaglandin E2. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.587-592, 2000.

SCHLAFER, D.H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v.68, p.413-22, 2007.

SCHOON, D.; SCHOON, H-A.; KLUG, E. Angioses in the equine endometrium – pathogenesis and clinical correlations. **Pferdeheilkunde**, v.15, p.541-546, 1999.

SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M.; OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical implications. **Proceedings of the American Association Equine Practitioners**, v.41, p.1-2, 1995.

SESSO, A. **Fixação de sistemas biológicos.** In: SOUZA, W. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas*. Rio de Janeiro: Universidade Estadual Norte Fluminense, 1998. p.1-17, cap. I.

SHARP, D.C.; THATCHER, M.J.; SALUTE, M.E.; FUCHS, A.R. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertililty***,* v.109, p.137-144, 1997.

SIDDIQUI, M.A.; FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; COOPER, D.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers .**Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1110-1117, 2010.

SILVA, L.A.; GINTHER, O.J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biology of Reproduction***,* v.74, p.337–343, 2006.

SILVA, L.A; GINTHER, O.J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v.139, p. 453-463, 2010.

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

SNIDER, T.A.; C. SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology** v.75, p.1567–1581, 2011.

STANTON, M.B.; STEINER, J.V.; PUGH, D.G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science***,* v.24, p.14-19, 2004.

STARBUCK, G.R.; STOUT, T.A.; LAMMING, G.E.; ALLEN, W.R.; FLINT, A.P. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility***,* v.113, p.173-179, 1998.

STERZIK, K.; GRAB, D.; SASSE, V.; HÜTTER, W.; ROSENBUSCH, B.; TERINDE, R. Doppler sonographic findings and their correlation with implantation in an in vitro fertilization program. **Fertility and Sterility***,* v.52, p.825-828, 1989.

STILL, J.G.; GREISS, F. The effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity. **American Journal of Obstetrics** & **Gynecology**, v.130, p.1-8, 1978.

STOUT, T.A.; ALLEN, W.R. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction**, v.123, p.261-268, 2002.

TAO, J.; JIN, Y.F.; YANG, Z.; WANG, L.C.; GAO, X.R.; LUI, L.; MA. H. Reduced arterial elasticity is associated with endothelial dysfunction in persons of advancing age: comparative study of noninvasive pulse wave analysis and laser Doppler blood flow measurement. **American Journal of Hypertension**, v.17, p.654–659, 2004.

TANNUS, R.J.; THUN, R. Influence of endometrial cysts on conception rate of mares. **Journal of Veteterinary Medicine, Series A***,* v.42, p.275–283, 1995.

TROEDSSON, M.H. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v.52, p.461-471, 1999.

TROEDSSON**,** M.H.; LIU, I.K.; CRABOM B.G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**, v.50, p.807-818,1998.

TROEDSSON, M.H.; LEE, C.S.; FRANKLIN, R.D.; CRABO, B.G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.56, p. 341-349, 2000.

TROEDSSON, M.H.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A.M.; DAHMS, B.; CRABO, B.G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 273-278, 2001.

ULIANI, R.C.; RAMIRES NETO, C.; DELLÁQUA JR; PESSOA, M.A.; CAMARGO, A.L.; ALVARENGA, R.; ALVARENGA, M.A. Effect of mare breed and age on embryo transfer efficiency. **Animal Reproduction Science** 121S, p.303-304, 2010.

VAN CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare. A review and update. **Veterinary Clinic of North America: Equine Practice**, v.4, p.229-245, 1988.

VAITKEVICIUS, P.V.; FLEG, J.L.; ENGEL, J.H.; O'CONNOR, F.C.; WRINGHT, J.G.; LAKATTA, L.E.; YIN, F.C.; LAKATTA, E.G. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. **Circulation**, v. 88, p. 1456–1462, 1993.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; FREEMAN, D.A.; WEBER, J.A.; ROCK, R.W.; TESTER, D.F. Ovarian follicles, ovulations and progesterone concentrations in aged versus young mares. **Theriogenology**, v.40, p.2-32, 1993a.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; WEBER, J.A.; LICHTENWALNER, A.B. PGE2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse **Equine Veterinary Journal Supplement** , v. 15, p. 24–27, 1993b.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnantmares. **Journal of Reproduction and Fertility***,* v.87, p.331–336, 1989.

WILSON, G.L. Diagnostic and therapeutic hysteroscopy for endometrial cysts in mares. **Veterinary Medicine***, v.* 80, p.59–63, 1985.

WEBEL, S.K.; HAMBLIN, V.; HARLAND, B.; DZUIK, P.J. Fertility, ovulation and maturation of eggs in mares injected with hCG. **Journal of Reproduction and Fertility***,* v.51, p.337–341, 1977.

WEBER, J.A.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction**. 1991 v. 45, 544-546, 1991a.

WEBER, J.A.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biology of Reproduction**, v.45, p.540-543, 1991b.

WEBER, J.A.; WOODS, G.L.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K. Prostaglandin E2 secretion by day 6 to day 9 equine embryos **Prostaglandins**, v.43, p.55–59, 1992.

YANG, Y.J.; CHO, G.J. Factors concerning early embryonic death in thoroughbred mares in South Korea. **Journal of Veterinary Medical Science***,* v.69, p.787–792, 2007.

Artigo submetido para publicação

Submitted to Animal Reproduction Science, December 28, 2011

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

J C Ferreira[1#], F S Ignácio[1], C Meira[1]

[1]UNESP – Univ Estadual de São Paulo, Departamento de Reprodução AAnimal e Radiologia Veterinária, SP18618-970, Brazil

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

Abstract

Coordinated vascular development and a uterine blood supply are necessary for successful embryo development and the maintenance of pregnancy. New approaches to colored Doppler ultrasonography were used to evaluate the uterine hemodynamics of pregnant mares. A total of 25 mares were assigned to either the pregnant or non-pregnant group (n=18 and 7 mares/group, respectively). Lower uterine vascularity (P<0.01) was detected on D0-3 (D0=day of ovulation) and from D5 to D11 in all mares. An increase in An increased uterine vascular perfusion was detected (P>0.01) on D4 (D0=day of ovulation) in both groups, while a progressive increase (P<0.01) was observed only in pregnant mares after D12. Lower pulsatility and resistance indices (PI and RI, respectively) from mesometrial attachment arteries were detected (P<0,001) on D3-4 in non-pregnant mares. In the pregnant group, a lower PI was observed on D3-4 (P<0.01), with a progressive decrease after D9. No effect of CL position was detected (P>0.1) on uterine hemodynamics for pregnant and non-pregnant mares. A uterine horn with an embryo had greater (P<0.01) uterine vascular perfusion and lower (P<0.01) mesometrial Doppler indices than a uterine horn without an embryo. Arteries from mesometrium attachment were adequate for the measurement of Doppler indices during diestrus and early gestation. Our results demonstrated for the first time that there is a simultaneous increase and decrease in uterine vascularity and mesometrial Doppler indices, respectively, during the first days post-ovulation in pregnant and non-pregnant mares.

Keywords: Pregnancy, uterus, embryo, hemodynamics, Pulsatility index, Power-flow.

Introduction

An uninterrupted and complete interaction between uterus and conceptus is essential for the establishment and maintenance of pregnancy. It is unclear what cell-messaging procedures lead to the equine maternal recognition of pregnancy. However, several studies have demonstrated that both the uterus and the conceptus contribute to the maintenance of early gestation (Goff et al., 1987; Silva et al., 2005; Silva & Ginther, 2006; Starbuck et al., 1998). Initially, the embryo-maternal dialogue is initiated within the oviduct, where the equine zygote secretes significant quantities of prostaglandin E_2 on day 5 post-ovulation, allowing for its transport into the uterus (Weber et al., 1991). In the uterine lumen, the young and mobile embryo vesicle provides signals for maternal recognition of pregnancy, which ensures the lifespan and secretory function of the corpus luteum (Allen, 2001).

Ultrasonic Doppler technology provides colored blood flow images of the equine reproductive tract. This technology has the potential to increase the diagnostic, monitoring, and predictive capabilities of theriogenologists and researchers (Ginther & Utt, 2004). Color and power Doppler ultrasonography are noninvasive pulsewave techniques that have recently been used to study the uterine hemodynamics of pregnant and non-pregnant mares (Bollwein et al., 2003a, 2003b; Ferreira et al., 2008; Silva & Ginther, 2006). Earlier studies in mares, using conventional color-flow imaging, found consistently low endometrial vascular perfusion from day 1 to 8 of pregnancy and increased vascularity after day 12 (Silva et al., 2005). However, the color signals present on the myometrium were not considered. To our knowledge, there are no reports of color-mode Doppler imaging to produce endometrial spectral waveforms in diestrus and

pregnancy. Additionally, the correlation between Doppler index values from mesometrial attachment arteries and uterine vascular perfusion during the first days of gestation remains unknown in mares.

Power-flow mode Doppler could have advantages over conventional Color-flow imaging (Ginther & Utt, 2004), and the myometrial blood vessel networks should be considered for the evaluation of uterine hemodynamics in mares (Ferreira et al., 2008). The determination of mesometrial Doppler indices, associated with a more sensitive and detailed evaluation of uterine vascularity, will provide important evidence in understanding the physiology of gestation in mares. In the future, this knowledge will be fundamental in diagnosing pregnancy disorders earlier.

The overall purpose of the present study, using colored Doppler ultrasonography, was to characterize the spectral-Doppler measurements and vascular perfusion of the uterus during early gestation in mares. The specific goals were to (1) determine the variation of Doppler indices from mesometrial attachment arteries and describe the uterine vascular perfusion through the first 20 days of pregnancy (using power-flow imaging), (2) characterize the uterine hemodynamic of non-pregnant mares between days 0 and 12 post-ovulation, and (3) to evaluate the efficiency of the Doppler technology for the early pregnancy diagnosis in mares.

Materials and Methods

Animals and experimental groups

A total of 25 mares were kept under natural light in an open shelter and outdoor paddock at CERBEQ, Reproduction Center of the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, UNESP. The mares were mixed breeds weighing 270-410 kg and were 5-18 years of age (mean 10.2±0.7 years). The score for body condition for all mares was high throughout the experiment (score≥7; Henneke et al. 1983). Animals were maintained on grass hay and pelleted feed with free access to water and trace-mineralized salt. The age of the mares was estimated from dental characteristics (American Association of Equine Practitioners Manual 2002). Only docile mares without macroscopic abnormalities in the reproductive tract were used.

All mares were scanned daily and inseminated 24 hours after induction of ovulation with hCG (2500 IU, i.v.), administered when a preovulatory follicle reached 35 mm in diameter. The day of ovulation was considered as D0. To evaluate the effect of the conception and the early gestation on uterine hemodynamics, the mares were retrospectively assigned into two experimental groups according to visualization of the embryonic vesicle between D9-12. Mares were divided into either the pregnant or non-pregnant group (n= 18 and 7 mares/group, respectively). In non-pregnant mares, a final ultrasound was performed on D15 post-ovulation (D0 = day of ovulation) to confirm the absence of the embryonic vesicle.

Ultrasonography and Doppler End Points

Mares were scanned using a triplex B-mode (gray scale) and pulsed-wave color Doppler ultrasound instrument (Sonoace Pico; Medison do Brasil Ltda) equipped with a linear-array multifrequency transducer (LV5-9CDn, 5 to 9 Mhz) with a beam-field width of 60 mm. The principles, techniques, and interpretations of B-mode examinations of the mare reproductive tract have been reviewed (Ginther 1995). The brightness and contrast controls of the monitor, and the gain controls of the scanner, were standardized to constant settings (Gastal et al. 1998).

Examinations to confirm pregnancy were performed every day, starting from D9, using conventional B-mode ultrasonography. The location of the vesicle within the uterus was evaluated every five minutes for two consecutive hours, as previously described (Figure 1; Leith & Ginther, 1984), to determine the day of fixation. Day of fixation was defined as the first day that the embryonic vesicle was in the same uterine segment during every daily examination (Ginther, 1995). A final ultrasound examination was performed one day later to confirm the location of the vesicle.

Uterine hemodynamics of pregnant and non-pregnant mares were based on the uterine vascular perfusion associated with blood flow velocities and Doppler indices from mesometrial attachment arteries (Figure 1). Data were collected once a day during the first 20 days of gestation and for 12 days post-ovulation on pregnant and non-pregnant groups, respectively.

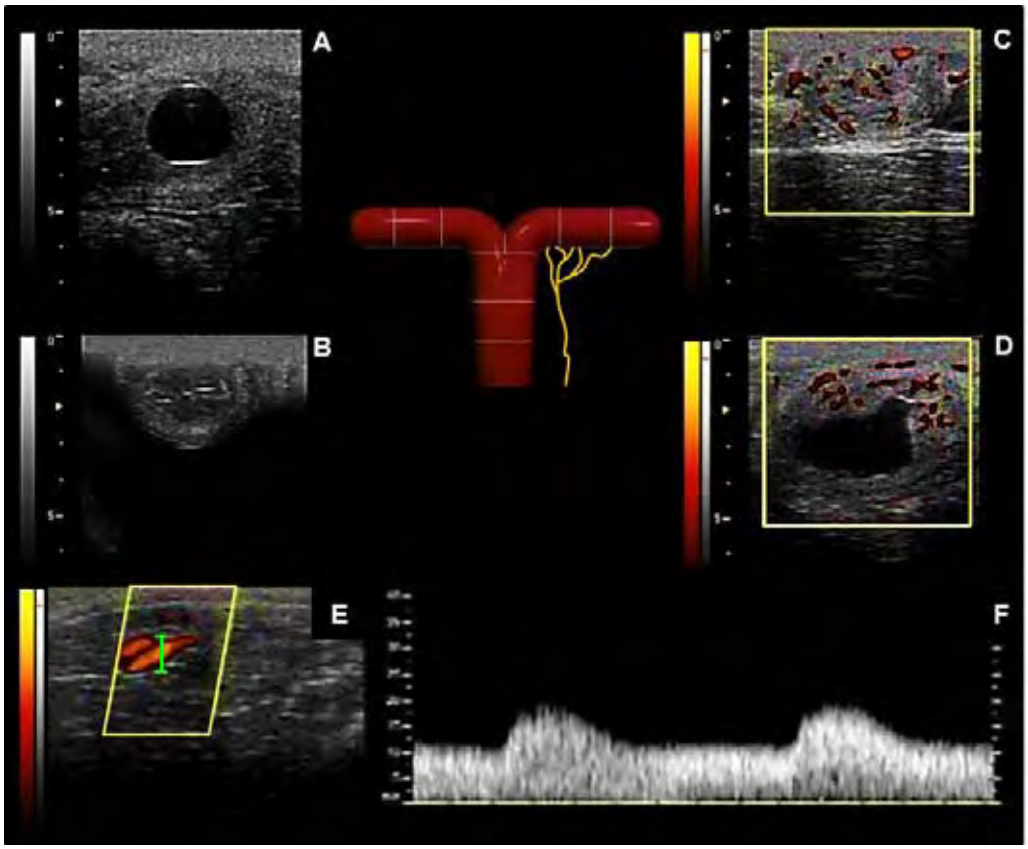

Figure 1. A diagram of the equine uterus with representative ultrasonograms. Longitudinal and cross-sectional images of uterine body (A) and horns (B, C and D), respectively, are shown. Uterus is divided into nine identical segments to evaluate the embryonic mobility and determine the day of fixation. (A) Ultrasonic visualization of the embryonic vesicle between D9-12 was performed to diagnose the pregnancy. Uterine vascular perfusion from non-pregnant (C) and pregnant (D) mares was estimated using Power-flow Doppler imaging. Mesometrium attachment is the area of entry of arteries into the uterus. The sample gate (green) was placed in an artery of the mesometrium attachment (E) to generate a Doppler frequency spectral graph (F) with a minimum of three identical cardiac cycles. The spectrum graph was used to measure mesometrial blood flow velocities and uterine Doppler indices.

Vascular perfusion from both uterine horns (ipsilateral and contralateral to ovulation) were subjectively estimated by one operator considering the extension of uterine tissue (endometrium and myometrium) with colored signals of blood flow, as recently described by Ferreira et al. (2008). Evaluations were performed using Power-flow Doppler mode (Figure 2). Only color signals that appeared to be within the limits of the uterus were considered. Uterine vascular perfusion was scored from 1 to 4 (minimum to maximum, including fractional scores), based on the percentage of uterine tissue with color signals of blood flow, during real-time

cross-sectioning of the uterus in a continuous 1 minute scan. Different numbers and intensities of colored Doppler signals were detected in distinct segments of the same uterine horn. Therefore, the uterine vascularity was based on the maximum score observed during the ultrasonic exam of the three segments of the uterine horn (distal, central, and corneal-body junction segments). Multiple cross sections were viewed because of animal movement, intestinal peristalsis and uterine contractility.

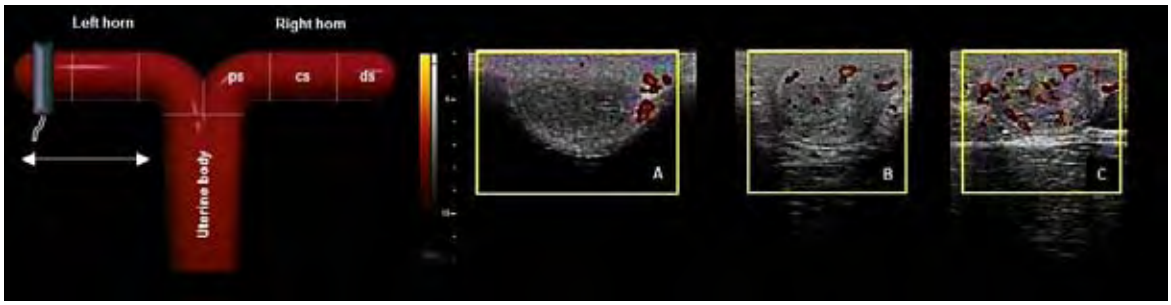

Figure 2. The position of the ultrasound transducer and the direction of scanning (white arrow) along the uterine horn, for vascularity evaluation, are represented. Uterine horn is divided into three identical segments: proximal (ps), central (cs) and distal segments(ds) segments. Cross-sectional images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

The evaluated spectral end points were the pulsatility index (PI), resistance index (RI), peak systolic velocity (PSV) and end diastolic velocity (EDV). The formulas for spectral data are well established (Zwiebel & Pellerito 2005; Ginther 2007). Spectral assessment of blood flow velocities and Doppler indexes were performed as described previously by Silva et al. (2005). To produce a spectral waveform, each entire mesometrium attachment was initially scanned in a slow, continuous motion using the Power-flow Doppler mode. Subsequently, in spectral mode, the sample-gate cursor was placed on an artery of the mesometrium

attachment (Figure 1). Spectral waveform, with a minimum of three cardiac cycles, was generated and one of the cycles was used to measure the spectral end points. The procedure was repeated twice more, and the average was used for statistical analyses.

Statistical analyses

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

Results

The mean ages of the pregnant (10.3±0.9 years, ranging from 5 to 18 years) and non-pregnant (9.7±0.9 years, ranging from 5 to 12 years) groups were similar ($P > 0.1$). A significant presence of intrauterine fluid was not detected during the first days after artificial insemination. The mean follicular diameter and uterine edema at the moment of hCG treatment was 36.6±0.5 and 2.1±0.2, respectively.

In the pregnant group, the embryonic vesicle was first detected by D9 or 10 (9.72±0.1). The embryo almost always remained in the uterine body between D9 and 11. Therefore, the statistical analysis for Doppler end points, according to the position of the embryonic vesicle (uterine horns with and without embryo), was

performed after D12. In all mares from the pregnant group, the cessation of embryo mobility occurred in the caudal segment of one of the uterine horns. No effect on side (left horn *versus* right horn) or CL position (ipsilateral *versus* contralateral to the CL) was detected ($P>0.1$).

The uterine vascular perfusion of pregnant (1.23±0.05) and non-pregnant (1.3±0.12) groups did not differ ($P>0.1$) at the moment of ovulation induction. No difference ($P>0.5$) between uterine horns (ipsilateral *versus* contralateral to the CL) was found for uterine vascular perfusion, mesometrial Doppler indices (PI and RI) and blood flow velocities (PSV and EDV) of pregnant and non-pregnant mares between D0-12. Therefore, the average was used for subsequent statistical analyses.

The variations of uterine vascular perfusion in pregnant and non-pregnant mares was similar ($P>0.1$) during the first 11 days post-ovulation. In both groups, uterine vascularity was constant and low from D0 to D3 and between D5 and D11. However, a pronounced increase in uterine vascular perfusion was observed on D4 ($P<0.001$; Figure 3) in pregnant and non-pregnant mares. Additionally, a second increase in uterine vascularity was detected on D12 in pregnant mares (Figure 3).

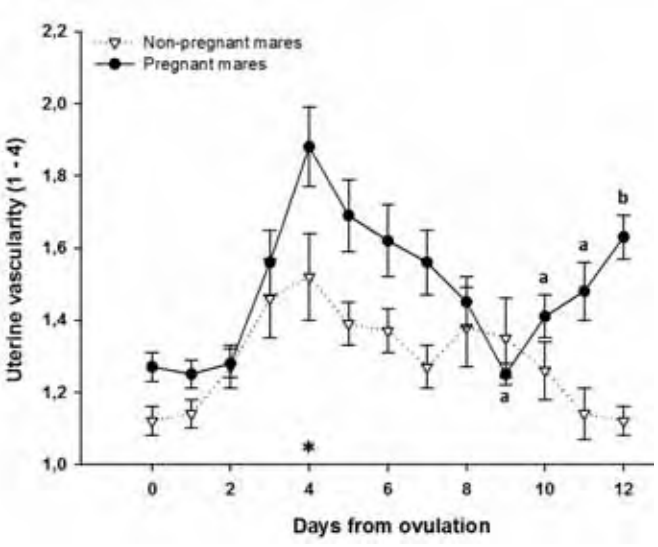

Figure 3. The mean±SEM uterine vascularity of pregnant and non-pregnant mares (n=18 and 7 mares/group, respectively) during the first 12 days after ovulation. Asterisk symbols indicate a day with significant differences (*P*<0.05) to D0 in both groups. The means with different letters (a,b) within the same group are different (*P*<0,05).

An effect of the number of days post-ovulation was observed for mesometrial Doppler indices (PI and RI) in pregnant and non-pregnant mares. A decreased mesometrial PI was detected (*P*<0,001) in D3-4 and D7-8 of non-pregnant mares. Mesometrial PI of pregnant mares decreased on D3-4 compared to D1, and a progressive decrease was observed from D9 to D12 (*P*<0.001). Relative to D1, decreased values of mesometrial RI were detected (*P*<0.001) on days 3-4 and 7-8 in non-pregnant mares, while pregnant mares showed a decreased RI only on D12. The mean±SEM for mesometrial Doppler indices (PI and RI) of pregnant and non-pregnant groups during the first 12 days post-ovulation are presented in Table 1. In both groups, no effect of CL location (CL), day (D) or the interaction CL:D was detected for mesometrial blood flow velocities (PSV and EDV) between D0 and D12 (data not showed).

No effect of CL location (*P*>0.01) was observed for uterine vascular perfusion in pregnant mares through the first 20 days of gestation and a progressive increase in vascularity was detected (*P*<0.05) starting on D14 (figure 4). However, considering the position of the embryo, an effect of the uterine horn (ipsilateral *versus* contralateral to the embryo) was detected (*P*<0.001) on uterine vascular perfusion and the mesometrial Doppler indices (PI and RI) of pregnant mares from D12 to D20.

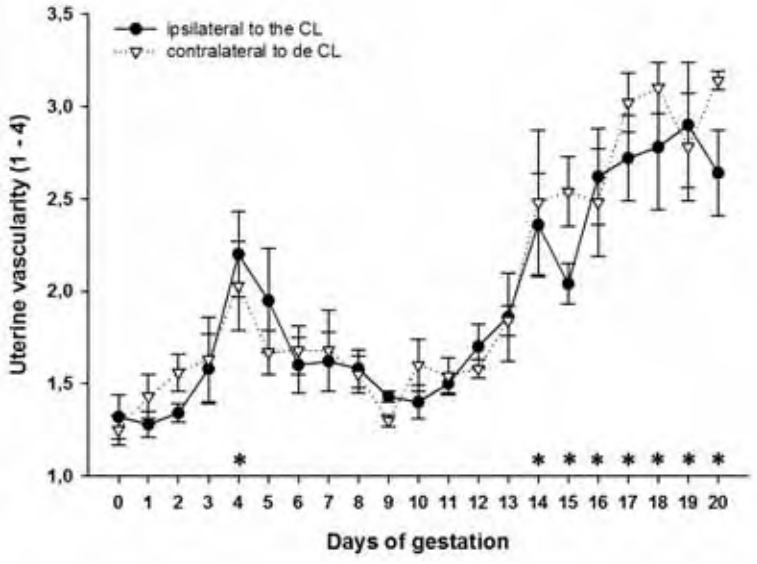

Figure 4. The mean±SEM vascularity of ipsilateral and contralateral horns to the CL during the first 20 days of gestation in mares (n=18). Asterisk symbols indicate a day with significant differences (*P*<0.05) to D0.

A progressive increase in uterine vascular perfusion was observed in both uterine horns, both ipsilateral and contralateral to the embryo. The uterine vascularity of horns with and without an embryo did not differ from D12 to D14. However, a more pronounced increase in vascular perfusion was detected in the horn ipsilateral to the embryo from D15 (Figure 5). The mean vascularity of the

uterine horn without an embryo was significantly lower than the observed vascularity in the uterine horn with an embryo from D12 to D20 (1.94±0.01 and 2.39±0.01, respectively).

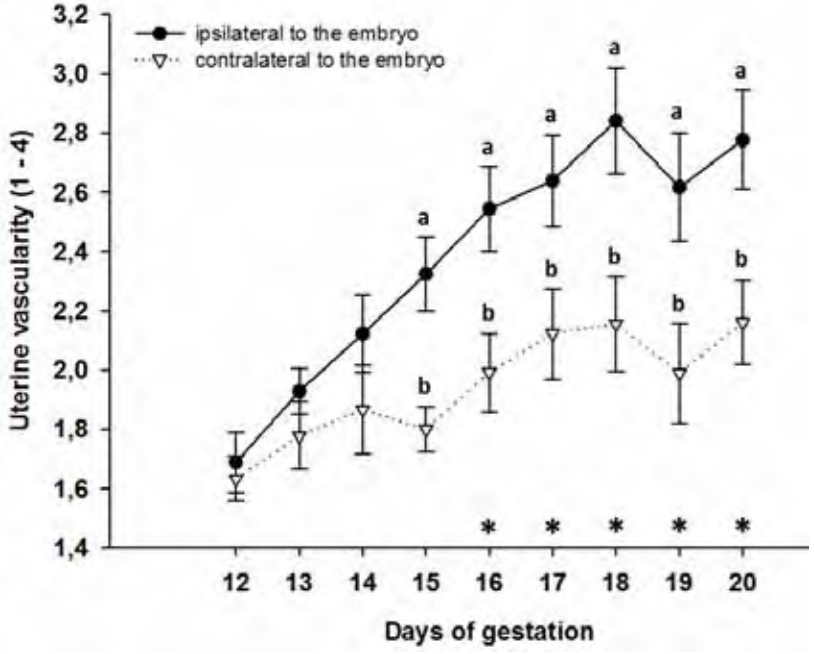

Figure 5. The mean±SEM vascularity of ipsilateral and contralateral (to the embryo) horns from D12 to 20 of gestation in mares (n=18). Asterisk symbols indicate a day with significant differences (P<0.05) to D12. Different letters (a,b) indicate significant differences (P<0.05) between uterine horns in that day.

Mean values (±SEM) for mesometrial Doppler indices (PI and RI), according to the position of the embryo from D12 to D20 of gestation are presented in Table 2. The effect of the uterine horn (H) and the day of gestation (D) was observed (P<0.004) for PI and RI (Figure 6 and 7, respectively). Additionally, no significant difference was detected for the interaction H:D of mesometrial Doppler indices. Between D12-20 of gestation, greater values for mean PI and RI were observed in the horn ipsilateral to the embryo compared to the contralateral horn (Table 2).

The position of the embryo and the time of gestation did not affect the mesometrial blood flow velocities (PSV and EDV) from D12 to D20 (data not showed).

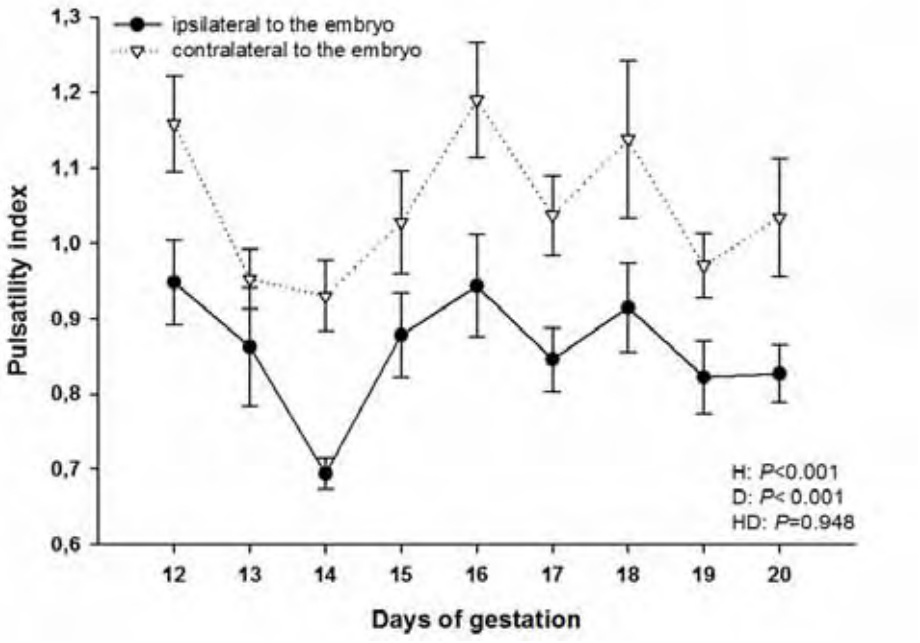

Figure 6. The mean±SEM mesometrial Pulsatility index of ipsilateral and contralateral (to the embryo) horns from D12 to D20 of gestation in mares (n=18). The probability of *P* for the effect on horn (G), day (D) and their interaction (HD) are shown.

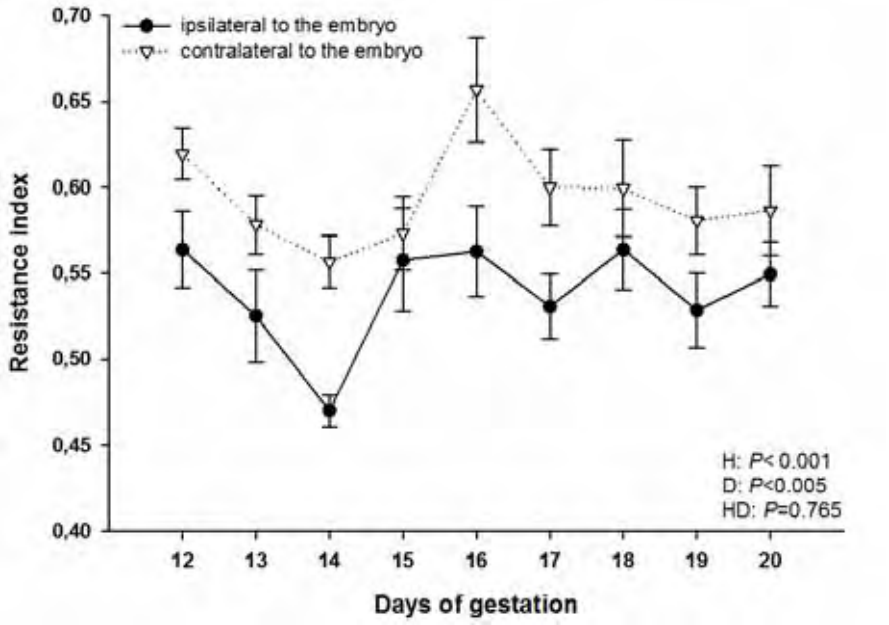

Figure 7. The mean±SEM mesometrial Resistance index of ipsilateral and contralateral (to the embryo) horns from D12 to D20 of gestation in mares (n=18). The probability of *P* for the effect on horn (G), day (D) and their interaction (HD) are shown.

Table 1. The mean±S.E.M Pulsatility and Resistance indices (PI and RI, respectively) from mesometrial attachment arteries of pregnant (n=18) and non-pregnant (n= 7) mares during the first 12 days after ovulation.

	Pregnant mares		Non-pregnant mares	
Day#	PI	RI	PI	RI
0	1,44±0,07ab	0,70±0,01a	1,42±0,08a	0,69±0,02ab
1	1,56±0,07a	0,72±0,02a	1,63±0,08a	0,75±0,02a
2	1,23±0,11abc	0,67±0,02abc	1,29±0,08ab	0,67±0,02ab
3	1,16±0,07bcde	0,64±0,02abcde	1,17±0,07b	0,62±0,03b
4	1,19±0,06bcde	0,63±0,02abcde	1,19±0,11b	0,63±0,04b
5	1,28±0,08abcde	0,63±0,02abcde	1,25±0,10ab	0,66±0,03ab
6	1,40±0,07abc	0,66±0,02abcd	1,29±0,12ab	0,66±0,03ab
7	1,29±0,07abcde	0,69±0,01ab	1,06±0,07b	0,62±0,03b
8	1,36±0,07abcd	0,70±0,04ab	1,02±0,09b	0,63±0,02b
9	1,24±0,07bcde	0,66±0,02abcd	1,29±0,11ab	0,67±0,03ab
10	1,22±0,08bcde	0,66±0,02abcd	1,61±0,10a	0,75±0,02a
11	1,11±0,07cde	0,64±0,02abcde	1,42±0,11ab	0,70±0,03ab
12	1,00±0,05e	0,61±0,02cde	1,40±0,08ab	0,70±0,02ab

a, b, c, d, e Means with different letters within a column are different (P<0,05)
Days after ovulation

Table 2. The mean±S.E.M mesometrial Pulsatility and Resistance indices of uterine horns with and without an embryo from D12 to D20 in mares (n=18).

	Pusatility index		Resistance index	
Day[#]	Horn with embryo	Horn without embryo	Horn with embryo	Horn without embryo
12	0,95±0,06	1,16±0,06	0,56±0,02	0,62±0,01
13	0,86±0,08	0,95±0,04	0,53±0,03	0,58±0,02
14	0,69±0,02	0,93±0,05	0,47±0,01	0,56±0,02
15	0,88±0,06	1,03±0,07	0,56±0,03	0,57±0,02
16	0,94±0,07	1,19±0,08	0,56±0,03	0,66±0,03
17	0,85±0,04	1,04±0,05	0,53±0,02	0,60±0,02
18	0,92±0,06	1,14±0,10	0,56±0,02	0,60±0,03
19	0,82±0,05	0,97±0,04	0,53±0,02	0,58±0,02
20	0,83±0,04	1,03±0,08	0,55±0,02	0,59±0,03
Mean	0,86±0,01a	1,05±0,01b	0,53±0,002c	0,60±0,002d

a, b Means with different letters within a row are different (P<0,05).
c, d Means with different letters within a row are different (P<0,05).
[#] Dias of gestation.

Discussion

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

This is the first report of uterine Doppler indices in pregnant and non-pregnant mares during the first 12 days post-ovulation. Arteries from mesometrium

attachments were efficient at producing a velocity spectrum in both groups. Endometrial vessels of non-pregnant mares generate inadequate colored Doppler signals for spectral evaluation (Ginther, 2007), and satisfactory wave forms have been produced only after D12 of gestation using the conventional Color-Doppler mode (Silva et al., 2005).

Scoring endometrial vascularity has been validated in mares (Silva et al. 2005) and heifers (Araujo & Ginther 2009). Doppler indices can be related to the hemodynamics of a tissue supplied by an artery (Ginther & Utt, 2004) and a decrease in the pulsatility or resistance index indicates lower arterial resistance. Consequently, there is increased vascular perfusion on the tissue supplied by the respective vessel (Ginther, 2007). Mesometrium attachment is the area of entry of arteries into the uterus. Therefore, the simultaneous increase and decrease in uterine vascular perfusion and mesometrial PI, respectively, through the first 20 days of gestation and from D0 to D12 post-ovulation of non-pregnant mares validated the subjective evaluation of the uterine tissue (endometrium and myometrium).

An effect of embryo position on uterine blood flow velocities during the early gestation (Silva et al., 2005) was not observed. However, blood flow velocities (PSV, EDV or TAMV) of arteries from mesometrium attachment or uterine tissues (endometrium or myometrium) should not be considered for hemodynamic evaluation of the reproductive tract in mares. An angle of insonation of 30º to 60º is required to measure arterial blood flow velocities with high accuracy (Ginther & Utt, 2004). In the present study, the Doppler angle was not determined during the spectral exam due to the intense tortuosity of mesometrial attachment vessels. In

this case, a spectral exam must be based on the Doppler indices (Ginther, 2007), as recently reported for the evaluation of pregnant heifers (Silva & Ginther, 2010).

The description of a transient increase in uterine vascularity accompanied by decreased Doppler indices on D4 post-ovulation is a new finding that contrasts previous studies (Silva et al., 2005). The early detection of increased uterine blood perfusion in this study may be due to the use of a more advantageous technique to evaluate the endometrium and myometrium, as suggested by Ferreira et al. (2008). A recent study using Color-Doppler function, for the evaluation of endometrial tissue, described a decreased and continuous vascularity of the endometrium from D0 to 12 post-ovulation in pregnant and non-pregnant mares (Silva et al., 2005). The Power-flow Doppler recognizes intensities of blood flow velocities (Ginter & Utt, 2004), showing a greater sensitivity to weak blood flow and reduced blooming artifacts when compared to the conventional Color-mode imaging (Ginther, 2007). Additionally, this is the first report that evaluates the entire uterine tissue (endometrium and myometrium) through the first days post ovulation in pregnant and non-pregnant mares. Therefore, examining the complete uterine tissue using Power mode Doppler may improve the evaluation of vessels with small diameters and slow blood flow present in the equine uterus.

The reason for the early, transient increases in uterine vascularity is not clear. The absence of intrauterine fluid during the first days post-breeding and the decreased uterine blood flow perfusion observed from D0 to D3 suggest that the vascular changes detected on D3-4 are not associated with an inflammatory process initiated by semen (Bollwein et al., 2003a). The increased uterine blood flow between D3-5 may be associated with hemodynamic changes made in the equine uterus to receive the embryo. All mares were inseminated and some of the

non-pregnant mares may have suffered pregnancy loss before the embryonic vesicle could be visualized (Ball, 1988). Normally, only viable embryos are transported to the uterus, and unfertilized oocytes and degenerate embryos are retained in the oviducts (Betteridge et al., 1974; Flood et al., 1979). The embryonic vesicle enters the uterus between D5-6 (Betteridge et al., 1982; Oguri et al., 1972) and prostaglandin E2 (PGE2), released by the oviductal transport-stage embryo (Robinson et al., 2000; Weber et al., 1991a, 1991b), can be associated with the earlier changes in the uterine vascular perfusion because of its vasodilatory effects.

Conventionally, estrogen is considered to be uterotrophic and a promoter of angiogenesis and vascular permeability (Girlin & Rogers, 2005). According to Ford (1982), estradiol stimulates increased vascular perfusion of the gravid uterus in cattle and sheep. An increase in follicular activity among D4-6, described in some mares (Ginther et al., 2004) could be associated with a transient increase in estradiol and, consequently, greater uterine vascularity on D4. However, our findings did not support this hypothesis because a lower uterine vascularity was observed in all mares with follicles ≥35 mm and uterine edema at the time of hCG treatment. Additionally, decreased genital perfusion in five cycling mares, supplied with exogenous estrogen, has been recently reported by Bollwein et al. (2004). The equine conceptus produces significant quantities of estrogens starting from D12 (Choi et al., 1995; Flood et al., 1987; Raeside et al., 2004; Zavi et al., 1984), but embryo steroidogenesis appears to begin previously on D6 (Paulo & Tischner, 1985). Therefore, the earlier increase in uterine perfusion may be associated with a local effect due to the embryonic estradiol, but not with an increased peripheral blood concentration of estrogens.

The progressive increase in the uterine perfusion through the first days of gestation, and the local effect of the embryo in the hemodynamics of the gravid uterus, supports a previous study in mares (Silva et al., 2005) and cows (Silva & Ginther, 2010). The nature of the maternal recognition signal in mares is currently unknown. However, the pronounced increase in blood perfusion in the uterine horn with the embryo, supporting the hypothesis that direct contact between the uterus and conceptus stimulates local changes in uterine vascularity (Silva et al., 2005). The equine conceptus secretes significant quantities of prostaglandins and estradiol during the first days of gestation (Weber et al., 1992; Vanderwall et al., 1993) and PGE2 levels remain high until D32 (Stout & Allen, 2002). In human *in vitro* assays, estradiol stimulated the proliferation of angiogenic patterns (Kayisli et al., 2004) and increased the response of endometrial cells to VEGF (Iruela-Arispe et al., 1999). A greater abundance of VEGF mRNA, VEGFR2 transcript and blood vessel proliferation has been found in the uterine tissue of mares during early pregnancy (Silva et al., 2011), supporting the hypothesis that the embryo plays an essential role in directing vasculogenesis of the equine uterus.

In conclusion, Power-Doppler technology associated with a Spectral mode generated adequate color signals for measuring the Doppler indices of mesometrial attachment arteries during the diestrus and early pregnancy of mares. Early and transient changes in uterine vascular perfusion and the mesometrial Doppler indices were detected in pregnant and non-pregnant mares. The positive effect of the embryo on the blood supply of the gravid uterus was confirmed.

Acknowledgements

This research (Project P2-JCF-11) was supported by FAPESP, SP, Brazil. The authors thank J. G. Lalla for assistance with the statistical analyses. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

Allen, W.R., 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. Reproduction, 121, 513-527.

American Association of Equine Pratitioners Manual Official Guide for Determining the age of the Horses. 2002. *AAEP*, Lexington, KY, pp 26.

Araujo, R.R., Ginther, O.J., 2009. Vascular perfusion of reproductive organs in pony mares and heifers during sedation with detomidine or xylazine. American Journal of Veterinary Research, 70, 141–148.

Ball, B.A., 1988. Embryonic loss in mares: Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 4, 263-290.

Betteridge, K.J., Eaglesome, M.D., Mitchell, D., Flood, P.F., Berlault, P., 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. Journal of Anatomy, 135, 191-209.

Betteridge, K.J., Mitchell, D., 1974. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare, Journal of Reproduction, 39, 145-148.

Bollwein, H., Kolberg, B., Stolla, R., 2004. The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. Theriogenology, 61, 1137-1146.

Bollwein, H., Sowade, C., Stolla, R., 2003a. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. Theriogenology, 60, 607-616.

Bollwein, H., Mayer, R., Stolla, R., 2003b. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. Theriogenology, 60, 597-605.

Choi, S.J., Anderson, G.B., Roser, J.F., 1997. Production of free estrogens and estrogen conjugates by the preimplantation equine embryo. Theriogenology, 47, 457–466.

Ferreira, J.C., Gastal, E.L., Ginther, O.J., 2008. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of size of the cystic area and age. Reproduction, 135, 541-550.

Flood, P.F., Betteridge, K.J., Irvine, D.S., 1987. Oestrogens and androgens in blastocoelic fluid and cultures of cells from equine conceptuses of 10–22 days gestation. Journal of Reproduction and Fertility, 27, 414–420.

Flood, P.F., Jong, A., Betteridge, K.J., 1979. The location of eggs retained in the oviducts of mares. Journal of Reproduction and Fertility, 57, 291-294.

Ford, S.P., 1982. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of the ewe, sow and cow. Journal of Animal Science, 55(SII), 32–42.

Gastal, E.L., Gastal, M.O., Ginther, O.J., 1998. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. Theriogenology, 50, 1025–1038.

Ginther, O.J., 2007. Producing color-flow images. In: Ginther, O.J. (Ed.), Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography, Cross Plains, Equiservices Publishing, pp 39–60.

Ginther, O.J. 1995. Transrectal Imaging and Ovariaes and Uterus. In: Ginther, O.J. (Ed.), Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses. Cross Plains, Equiservices Publishing , pp13-42.

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

Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Bergfelt, D.R., Baerwald, A.R., Pierson, R.A., 2004. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. Biology of Reproduction, 71, 1105–1201.

GIRLING, J.E., ROGERS, P.A., 2005. Recent advances in endometrial angiogenesis research. Angiogenesis, 8, 89-99.

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

Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L., Yeates, B.F., 1983. Relationship between condition score, physical meansurements and body fat percentage in mares. Equine Veterinary Journal, 15, 371-372.

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

Kayisli, U.A., LUK, J., Guzeloglu-Kayisli, O., Seval, Y., Demir, R., Arici, A., 2004. Regulation of angiogenic activity of human endometrial endothelial cells in culture by ovarian steroids. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89, 5794-802.
Leith, G.S., Ginther, O.J, 1984.. Characterization of intrauterine mobility of the early conceptus. Theriogenology, 22, 401–408.

Oguri, n., Tsutsumi, Y., 1972. Non.surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non.surgical egg transfer in horses. Journal of Reproduction and Fertility, 31, 187-195.

Paulo, E., Tischner, M., 1985. Activity of delta(5)3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and steroid hormones content in early preimplantation horse embryos. Folia Histochem Cytobiol, 23, 81-84.

Raeside, J.I., Christie, H.L., Renaud, R.L., Waelchli, R.O., Betteridge, K.J., 2004. Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium during early pregnancy in relation to estrogen concentrations in yolk-sac fluid. Biology of Reproduction, 71, 1120–1127.

Silva, L.A., Ginther, O.J., 2010. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. Reproduction, 139, 453-463.

Silva, L.A., Ginther, O.J., 2006. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. Biology of Reproduction, 74, 337–343.

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

Starbuck, G.R., Stout, T.A., Lamming, G.E., Allen, W.R., Flint, A.P., 1998. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. Journal of Reproduction and Fertility, 13, 173-179.

Stout, T.A., Allen, W.R., 2002. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. Reproduction, 123, 261-268.

Vanderwall, D.K., Woods, G.L., Weber, J.A., Lichtenwalner, A.B., 1993. PGE2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. Equine Veterinary Journal Supplement, 15, 24–27.

Weber, J.A., Woods, G.L., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., 1992. Prostaglandin E2 secretion by day 6 to day 9 equine embryos. Prostaglandins, 43, 55–59.

Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Woods, G.L., 1991a. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. Biology of Reproduction, 45, 544-546.

Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Woods, G.L., 1991b. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. Biology of Reproduction, 45, 540-543.

Zavy, M.T., Vernon, M.W., Asquith, R.L., Bazer, F.W., Sharp, D.C., 1984. Effect of exogenous gonadal steroids and pregnancy on uterine luminal prostaglandin F in mares. Prostaglandins, 27, 311–320.

Zwiebel, W.J., Pellerito, J.S. 2005 Basic concepts of Doppler frequency spectrum analisys and ultrasound blood flow imaging. In: Zwibel, W.J., Pellerito, J.S. (Eds.), Introduction to Vascular Ultrassongraphy. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.