

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**LUTEÓLISE INDUZIDA EM JUMENTA: AVALIAÇÃO DO FLUXO
SANGUÍNEO LUTEAL E EFEITOS COLATERAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO
DE DINOPROST OU CLOPROSTENOL**

FELIPE ERISON MEDRADO ROCHA DE SOUSA

BOTUCATU – SÃO PAULO
SETEMBRO/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**LUTEÓLISE INDUZIDA EM JUMENTA: AVALIAÇÃO DO FLUXO
SANGUÍNEO LUTEAL E EFEITOS COLATERAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO
DE DINOPROST OU CLOPROSTENOL**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dell’Aqua Junior

Botucatu – São Paulo

Setembro/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sousa, Felipe Erison Medrado Rocha de.

Luteólise induzida em jumenta : avaliação do fluxo sanguíneo luteal e efeitos colaterais após administração de Dinoprost ou Cloprostenol / Felipe Erison Medrado Rocha de Sousa. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antonio Dell'Aqua Junior

Capes: 50504002

1. Asinino. 2. Luteólise. 3. Corpo lúteo. 4. Doppler, Ultrassonografia. 5. Prostaglandinas.

Palavras-chave: Asininos; Corpo lúteo; Prostaglandinas; Ultrassonografia doppler.

Nome do autor: Felipe Erison Medrado Rocha de Sousa

Data de Defesa da Dissertação: 16 de Setembro de 2019.

Titulo: LUTEÓLISE INDUZIDA EM JUMENTA: AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO LUTEAL E EFEITOS COLATERAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DINOPROST OU CLOPROSTENOL.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP

- Botucatu /SP

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP

- Botucatu /SP

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Médico Veterinário responsável pelo Haras Lub Breeding – Cesário Lange/SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais. Elias e Dineia, por todo amor, incentivo apoio dedicado a mim todos esses anos. Vocês são minha fonte de orgulho e inspiração.

Ao meu avô, Moisés Medrado de Assis (*in memorian*), que sempre me apoiou e foi meu maior incentivador, sempre fez muito por mim e nunca mediu esforços para me ver feliz. Sei que está ao lado de Deus olhando por mim, com o cuidado, carinho e amor de sempre. Você é o maior exemplo de caráter, seriedade, honestidade e ser humano que tive. Saudade eterna meu avô.

Ao meu querido amigo, professor, mestre e grande incentivador, Pro. Dr. Diogo Antonio da Silva Santos (*in memorian*), que me incentivou a seguir essa carreira e me apoiou sempre. Obrigado por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que sempre guiou meus passos no melhor caminho, por toda proteção e pela família que tenho.

Aos meus pais, que são minha base, que sempre torceram e confiaram em minha capacidade. Obrigado por me proporcionarem toda estrutura necessária para que chegasse até aqui.

À minha avó, Jacira, que nunca mediu esforços para me ajudar, apoiar e incentivar sempre.

Á minha segunda mãe, Francisca, que cuidou sempre de mim desde quando ainda criança e sempre me apoiou incondicionalmente.

À toda minha família que mesmo de longe sempre torceu por mim.

Aos meus irmãos, Fernanda, Eduardo, Emanuel, Beto e Cristina, que sempre me acompanharam, me apoiaram e estão no meu coração.

Aos meus tios, Medrado, Clóvis e Jair, por todo apoio e confiarem em mim durante essa jornada.

As minha tias, Ray, Dinair, Sônia, por sempre me acompanharem e por todo apoio.

As minhas primas, Beatriz, Byanca, Jayne, Juliane, Sara, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu primo Matheus, que mesmo de longe sempre esteve comigo.

À Fernanda, por companheirismo, amor e carinho, e que apesar da distância, sempre esteve comigo me incentivando, apoiando, acreditando e me dando forças nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior, pela oportunidade concedida e por acreditar em mim. Obrigado por todo conhecimento e ensinamentos durante esse período.

Aos meus amigos e colegas de longa data, amigos da faculdade, da minha turma de medicina veterinária 2010.2 da UEMA, amigos e colegas pós-graduandos da Unesp-

Botucatu, em especial ao Humberto, por toda colaboração e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Felipe, Cabeça, Evandro e Dona Raquel. Guardarei sempre vocês comigo.

Aos residentes, estagiários, colaboradores e amigos que sempre ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Joao, Prof. Marco Alvarenga, Prof. Sony e Profª Eunice por toda parceria e incentivo, e em especial ao Prof. Nereu, grande amigo e parceiro, por toda amizade, companheirismo, apoio, incentivo, e conhecimento transmitido, muito obrigado Mestre.

À Universidade Estadual do Maranhão por ter tornado possível realizar o sonho de ser médico veterinário, pela grande formação acadêmica que tive, aos professores que participaram dessa etapa e aos amigos que fiz durante essa trajetória, levarei vocês sempre na minha memória e em meu coração.

Ao meu orientador de iniciação científica durante a graduação, Prof. Leonidas Chow Castillo, pelo incentivo e parceria de sempre.

Ao meu amigo e mestre, Prof. Diogão, sei que de onde estiver sempre estará torcendo por mim. Muito obrigado por tudo.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/UNESP, Botucatu/SP pelo meu crescimento profissional e oportunidades oferecidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGPT2: Angiopietina 2
Ang II: Angiotensia 2
CL: Corpo lúteo
PGFM: 13,14-diidro 15-ceto prostaglandina F2 α
PGF2 α : Prostaglandina F2 α
P4: Progesterona
 μ g: Micrograma
CE: Células endoteliais
LH: Hormonio luteinizante
hCG: Gonadotrofina coriônica humana
EDN1: Endotelina 1
EDN2: Endotelina 2
ON: Óxido nítrico
EROs: Espécies reativas de oxigênio
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
VEGFA: Fator de crescimento endotelial A
FGF2: Fator de crescimento de fibroblastos
PA: Ativador de plasminogênio
MMPs: metaloproteinases de matriz
PGE2: Prostaglandina 2
AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais
MEC: Matrix extracelular
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
Ang 1: Angiopietina 1
HIF1: Fator induzido por hipóxia 1
E2: Estrógeno
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
HDL: Lipoproteína de baixa densidade
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
PKA: Proteína quinase A
PKC: Proteína quinase C
StAR: Proteína reguladora aguda esteroidogênica

PBR: Receptor de benzodiazepínicos periférico

IL-8: Interleucina 8

INF- γ : Interferon gama

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: . Imagens e histograma representativo das avaliações efetuadas. (A) Área total do corpo lúteo. (B) Região de maior perfusão vascular. (C) Quantificação do número pixels.

FIGURA 2: Valores médios e SEM da perfusão vascular do corpo lúteo (CL) nos grupos dinoprost e cloprostenol, avaliados 15 minutos antes até 24 horas após administração dos farmacos, momento representado pela seta ($\downarrow$) indicando a hora do tratamento (hora 0). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento foram destacadas por (*), enquanto que nos minutos -15 a 60 observou-se tendência ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) representada por (**). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os momentos dentro de um mesmo grupo foram destacadas por (#).

FIGURA 3: Valores médios e SEM da área total do corpo lúteo (CL) nos grupos dinoprost e cloprostenol, avaliados 15 minutos antes até 24 horas após administração das drogas luteolíticas, momento representado pela seta ($\downarrow$) indicando a hora dos tratamentos (hora 0). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento foram destacadas por (*).

Figura 4: Mediana (limite superior e inferior) de sudorese, desconforto abdominal e diarreia das jumentas tratadas com Dinoprost (n=8; barras brancas) e Cloprostenol (n=8; barras cinzas). Letras diferentes (^a, ^b, ^c, ^d) indicam diferenças estatísticas entre os momentos dentro de um mesmo grupo. Letras maiúsculas (^{A,B}) indicam diferenças estatísticas entre os momentos nos diferentes grupos.

Figura 5: Imagens representativas do fluxo sanguíneo luteal avaliadas por ultrassonografia Doppler antes (0 h) e depois (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h) da administração de Dinoprost.

Figura 6: Imagens representativas do fluxo sanguíneo luteal avaliadas por ultrassonografia Doppler antes (0 h) e depois (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h) da administração de Cloprostenol.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	xiii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.2 Ovulação	17
2.3 Corpo lúteo.....	20
2.3.1 Angiogênese e desenvolvimento.....	20
2.3.2 Composição celular.....	23
2.3.3 Esteroidogênese.....	23
2.3.4 Luteólise.....	26
2.4 Ultrassonografia na avaliação da funcionalidade do corpo lúteo.....	29
3. HIPÓTESE	30
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivos Gerais.....	30
4.2 Objetivos Específicos.....	30
5. REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2.....	43
Luteal blood flow and side effects in jennies after luteolysis induction with Dinoprost and Cloprostenol.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e Métodos	46
2.1 Animais e delineamento experimental	46
2.2 Análise das imagens	48
2.3 Efeitos colaterais das drogas	48
2.4. Análise estatística.....	49
3. Resultados.....	50
4. Discussão	53
5. Conclusões.....	56
6. Referências.....	57

SOUSA, F.E.M.R. LUTEÓLISE INDUZIDA EM JUMENTA: AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO LUTEAL E EFEITOS COLATERAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DINOPROST OU CLOPROSTENOL. Botucatu-SP. 2019. 59p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o fluxo sanguíneo luteal e os efeitos colaterais em jumentas após administração de dois agentes luteolíticos. Cinco dias após a ovulação, oito fêmeas asininas foram *randomizadas* em *crossover design*, em dois grupos experimentais. No grupo 1 (G1) foi utilizado Dinoprost Trometamina, e no grupo 2 (G2) Cloprostenol sódico. Foram realizados exames ultrassonográficos modo B e modo Doppler 15 minutos antes (-15) da administração dos análogos da $PGF2\alpha$, e nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos e 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24 horas pós-aplicação. Já os efeitos colaterais foram observados nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos pós-administração dos agentes luteolíticos. O fluxo sanguíneo e a área do corpo lúteo reduziram gradativamente durante as primeiras 24 horas em ambos os grupos. Em relação a observação dos efeitos colaterais, a aplicação de Dinoprost Trometamina provocou um maior grau de sudorese, enquanto que, após aplicação de Cloprostenol Sódico, maior desconforto abdominal e diarreia foram observados como efeitos colaterais. Conclui-se que ambos os tratamentos (dinoprost e cloprostenol) são eficientes na promoção da luteólise, entretanto os efeitos colaterais diferem em resposta à administração de cada ativo. Novos estudos se fazem necessários, com redução das doses luteolíticas efetivas visando minimizar os efeitos colaterais observados.

Palavras-chave: asininos, corpo lúteo, ultrassonografia Doppler, prostaglandinas.

SOUSA, F.E.M.R. LUTEOLYSIS INDUCED IN JENNIES: EVALUATION OF LUTEAL BLOOD FLOW AND SIDE EFFECTS AFTER ADMINISTRATION OF DINOPROST OR CLOPROSTENOL. Botucatu – SP. 2019. 59p. São Paulo State University - School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the blood flow and side effect in jennies after treatment with two luteolytic drugs. Five days after ovulation, eight jennies included were randomized in crossover design into two experimental groups. In group 1 (G1) Dinoprost Tromethamine was used, and in group 2 (G2) Cloprostenol sodium. Mode B and Doppler ultrasound examinations were performed 15 minutes before (-15) administration of $\text{PGF}_2\alpha$, and at times 0, 15, 30, 45 and 60 minutes and 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 and 24 hours after application. Side effects were observed at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes after luteolytic agents administration. Blood flow and corpus luteum area decreased gradually during the first 24 hours in both groups. Regarding the observation of side effects, G1 presented major score of sweating, while in G2, greater abdominal discomfort and diarrhea was evidenced as a major side effect. It is concluded that both treatments (dinoprost and cloprostenol) are efficient in promoting luteolysis, however side effects differ between each active. Further studies are needed to determine whether low doses may be effective in inducing luteolysis to minimize side effects.

Keywords: jennies, corpus luteum, Doppler ultrasonography, prostaglandins.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2017), estima-se que o rebanho mundial de asininos é de 45.798.365 animais. No Brasil, entre os anos de 1996 a 2017, houve uma redução significativa no número de jumentos, passando 1.231.893, para 841.307 cabeças, correspondendo a 1,83 % da população mundial de asininos aproximadamente. Esses dados são alarmantes, uma vez que a redução no número desses animais pode resultar em perda de variabilidade genética das espécies, restringindo sua capacidade de adaptação e evolução (NOBRE, 1980).

Mesmo com essa redução na população de asininos, esses animais contribuem de forma relevante para a equideocultura brasileira. Essa atividade movimenta anualmente, dentre mais de 30 segmentos, R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por aproximadamente 3 milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016). No Brasil, existem três raças de jumentos que foram originadas a partir de cruzamentos com as raças trazidas pelos colonizadores. São elas o Jumento Nordestino, o Jumento Brasileiro e o Jumento Pêga.

Estima-se que 86,7% da população Brasileira de asininos encontra-se na região nordeste, 5,03% na região sudeste, 4,78% na região norte, 2,1% na região centro-oeste e 0,65% na região sul (IBGE, 2017). A raça Jumento Nordestino, compõem quase que a totalidade dos animais presentes no norte e nordeste brasileiro. As demais regiões são ocupadas principalmente pela raça Pêga, seguida pela raça Jumento Brasileiro “Paulista”.

O jumento Nordestino foi durante muitos anos, desde a época da colonização, responsável por ajudar nos serviços agrícolas e pecuários na região nordeste do país. No entanto, com a mecanização e industrialização dessas atividades, deixaram de ser utilizados pelo homem e foram substituídos por máquinas pesadas e motocicletas. Ao perderem suas funções de trabalho, esses animais são vistos como um problema, pois passam por um processo de abandono e se reproduzem de forma indiscriminada, causando acidentes em estradas e rodovias daquela região. Soma-se a esses fatores, o abate ilegal e descontrolado desses animais, contribuindo de forma significativa para a redução da sua população (CARNEIRO; LUCENA; BARROS, 2018).

No nordeste Brasileiro, as condições para os pequenos agricultores e pecuaristas produzirem são, em sua grande maioria, desumanas, devido à seca e falta de incentivo econômico, causando abandono de propriedades e despovoamento de comunidades rurais por inteira. Acrescenta-se a isso, o avanço dos grandes latifundiários que compram as poucas terras produtivas que restam, contribuindo para um processo de migração do sertanejo para as grandes cidades a procura de empregos e melhores condições de vida.

A sobrevivência das raças de jumentos nordestinos e a possibilidade de um aumento no número desses animais estão relacionadas ao interesse econômico neles e em seus produtos. Portanto, é preciso redescobrir o papel do desse animal na sociedade e na região nordeste, evitando a extinção dessa raça e levando novas perspectivas para a população e para esses animais, gerando emprego, renda e diminuindo os problemas causados pela sua não utilização.

Na Europa, além da utilização para serviços de tração, transporte e produção de mulas, os asininos podem ser utilizados para a conservação do solo e pastagens, turismo e lazer, fabricação de cremes de beleza, sabonetes (CAMILLO et al., 2018), terapia assistida a pessoas com deficiência (BORIONI et al., 2012), produção de leite para fabricação de queijos, sorvetes, bolos e licores (SALIMEI, 2016), na alimentação de crianças que sofrem de alergia à proteína do leite de vaca (ALTOMONTE et al., 2019), produção de diversos tipos de carnes com maior quantidade de proteínas e menos gordura que suínos e bovinos (MARINO et al., 2015; POLIDORI et al., 2015).

A china, país que tem uma população de 4.568.500 de asininos (FAO, 2017), o que representa aproximadamente 10% da população mundial de jumentos, são grandes consumidores da carne desses animais e produzem uma gelatina “ejiao” a partir da sua pele, não consegue atender sua demanda interna apenas com seu rebanho, e por isso, se tornou o maior exportador de pele de asininos do mundo, eles acreditam que o “ejiao” tem propriedades para tratar diversas doenças, sendo recomendada pela medicina tradicional chinesa.

Com tantas alternativas surgindo em vários países em relação à criação e produção de asininos, pode-se visualizar um novo nicho econômico para a região nordeste do Brasil e para a raça Jumento Nordestino, além da preservação da variabilidade genética da espécie, evitando sua extinção. No entanto, vários estudos

devem ser realizados para que isso se torne possível, além de quebrar paradigmas culturais em relação ao consumo da carne e leite desses animais, dentre outros produtos.

Conhecer as características e peculiaridades desses animais é de fundamental importância para aumentar os índices produtivos e reprodutivos dessa espécie. No Brasil, nas últimas décadas tem sido realizadas pesquisas em asininos sobre gestação (MEIRA et al., 1998a, 1998b), dinâmica folicular (MAGALHÃES, 2019), caracterização das populações de folículos pré-antrais (LOPES et al., 2017), comportamento reprodutivo (CANISSO, 2008; HENRY; LAGO, 2010; HENRY; LODI; GASTAL, 1998), parâmetros seminais (CANISSO et al., 2010) efeito sazonal e frequência ejaculatória (GASTAL et al., 1996), e biotecnologias e fertilidade de sêmen (OLIVEIRA et al., 2015, 2006).

Apesar dessas pesquisas realizadas em diferentes raças de asininos presentes no Brasil, ainda há uma escassez de trabalhos envolvendo bem-estar desses animais frente à administração de alguns fármacos, bem como explicar alguns fenômenos relacionados à regressão do corpo lúteo no Jumento Nordestino; sendo esse órgão responsável pela duração do ciclo estral e o controle da luteólise, fator fundamental para aumentar os índices reprodutivos e, conseqüentemente, os de produção.

Portanto, o objetivo desse estudo foi caracterizar a luteólise em jumentas nordestinas, por meio do fluxo sanguíneo, área total do corpo lúteo e concentração plasmática de progesterona após a administração de Dinoprost e Cloprostenol, bem como seus efeitos sobre o bem-estar animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2 Ovulação

A ovulação, a luteinização e a maturação do complexo cumulus-oócito dependem da presença de vários fatores intrafoliculares. A maioria deles é produzida pelas células foliculares em resposta à estimulação do hormônio luteinizante (LH) (GÉRARD; ROBIN, 2019), que após se ligar aos seus receptores presentes nas células da teca e da granulosa, irá desencadear uma cascata de eventos (RUSSELL; ROBKER, 2018).

Os folículos primordiais e primários não são vascularizados, sendo formado um plexo vascular nas células da teca a partir do recrutamento de células endoteliais (CE) do estroma ovariano durante o crescimento contínuo dos folículos (JIANG et al., 2003; WOAD; ROBINSON, 2016), e está diretamente relacionado com os processos de dominância, ovulação ou atresia, desenvolvimento do CL e produção de progesterona (P4) (ACOSTA et al., 2004; DE TARSO et al., 2017).

As CE representam 40 % da população de células em proliferação presentes na camada das células da teca (MARTELLI et al., 2009), produzindo e liberando fatores pró-angiogênicos. Em resposta ao LH endógeno ou exógeno (hCG), as células da teca interna ficam edemaciadas devido ao aumento fluxo sanguíneo e hiperemia do folículo pré-ovulatório (KERBAN; DORE; SIROIS, 1999; LEE; NOVY, 1978; MURDOCH; NIX; DUNN, 1983). O principal fator angiogênico liberado pelas CE no a partir do folículo secundário estimulado por gonadotrofinas é o de crescimento endotelial vascular (VEGF) (TAYLOR; HILLIER; FRASER, 2004).

Com o aumento da concentração plasmática de LH no período pré-ovulatório, ocorre uma constrição e redução no fluxo sanguíneo seguido de apoptose, inflamação e necrose nas células epiteliais da região apical do folículo (BRANNSTORM et al., 1998; MURDOCH; WILKEN; YOUNG, 1999), que somada a hiperemia e atividade contrátil do músculo liso presente na região basal folicular (CACIOPPO et al., 2017; KO et al., 2006), contribuem para que ocorra a ovulação. Essa contração é mediada pela endotelina 2 (EDN2) produzida nas células da granulosa (KO et al., 2006). Estudos comprovam a importância da vasoconstrição e da EDN2 para a ovulação, uma vez que folículos que não tem músculo liso ao seu redor falham em ovular (MIGONE et al., 2016), e a atividade contrátil do folículo é induzida com administração de (EDN2), bem

como a administração de seus antagonistas bloqueiam a ovulação (BRIDGES et al., 2010; KO et al., 2006).

A presença de células imunes em folículos pré-ovulatórios parecem ser um fator importante na ovulação, seja por alterações físicas provocadas por elas ou pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (RUSSELL; ROBKER, 2018). A adição de neutrófilos e macrófagos no meio de perfusão ovariana *in vitro* aumentou a taxa de ovulação de folículos pré-ovulatórios, demonstrando sua importância nesse processo (HELLBERG et al., 1991), sendo encontrados em grande número no ápice do folículo (BRÄNNSTRÖM; MAYRHOFFER; ROBERTSON, 1993).

As células imunes (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) produzem e/ou liberam diversas substâncias envolvidas na ovulação, como o óxido nítrico (ON), espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas (fator de necrose tumoral α (TNF- α e interleucinas), e fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA)), dentre outros (BRÄNNSTRÖM; ENSKOG, 2002; PUXEDDU et al., 2005).

O ON liberado por meio dos neutrófilos (ZACKRISSON et al., 1996), é uma substância vasoativa, responsável pela proliferação de células endoteliais e pela secreção de VEGF (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2000), atuando para promover a dilatação e permeabilidade dos vasos sanguíneos, recrutamento de leucócitos durante a ovulação e contribuindo na angiogênese inicial do CL (BONELLO et al., 1996; FERREIRA-DIAS et al., 2011), sendo que sua inibição resulta na redução na taxa de ovulação (BONELLO et al., 1996).

O TNF- α produzido por neutrófilos e macrófagos aumenta a secreção de ON quando adicionado a células endoteliais (YOSHIOKA; ACOSTA; OKUDA, 2012) e consequentemente também a taxa de ovulação (BRÄNNSTRÖM et al., 1995), comprovando ser um fator necessário para nesse processo. Também são produzidas por células do sistema imune e sua inibição três horas antes do pico de LH prejudica a ovulação, expansão das células do cúmulos e produção de P4 (MIYAZAKI et al., 1981; SHKOLNIK et al., 2011). Seu mecanismo de ação funciona como indutores da degradação tecidual por sua capacidade de aumentar a susceptibilidade das proteínas de membrana à degradação por agentes proteolíticos (BRÄNNSTRÖM; ENSKOG, 2002).

As Interleucinas são citocinas quimiotáticas específicas para neutrófilos, sendo altamente expressa no CL recém-formado (ROBINSON; WOAD, 2016). Acredita-se que as interleucinas estimulam a atividade enzimática proteolítica, a produção de prostaglandinas e óxido nítrico (TERRANOVA; MONTGOMERY RICE, 1997), e a maturação do complexo cúmulos-oócito (TAKEHARA et al., 1994). Dentre as diversas classes de interleucinas, na égua, a interleucina-1, sub-unidade IL1B, contribui para que ocorra a ovulação (CAILLAUD; DUCHAMP; GÉRARD, 2005; MARTORIATI; DUCHAMP; GÉRARD, 2003).

Os eosinófilos também desempenham funções no processo de ovulação e desenvolvimento inicial no corpo lúteo, estando presentes em grande número nos folículos pré-ovulatórios, contribuindo por meio da liberação de fatores pró-angiogênicos, citocinas e quimiocinas, como VEGF e interleucinas (KLIEM et al., 2013; PUXEDDU et al., 2005). Para que ocorra a ruptura do ápice folicular, também é necessária a ação proteolítica de várias proteases, e nesse contexto, entra a ação do ativador de plasminogênio (PA), que transforma o plasminogênio em plasmina, e esta irá desencadear a ativação de várias collagenases responsáveis pela degradação do tecido da região apical do folículo e da membrana basal que separa as células da teca das células da granulosa (BEERS, 1975), e nos equinos as principais collagenases são as metaloproteinases de matriz (MMPs) MMP2 e MMP9 (RILEY et al., 2004; SESSIONS; VICK; FITZGERALD, 2009).

A produção de prostaglandinas nos folículos por estímulo do LH, principalmente a prostaglandina E2 (PGE2), demonstra ter um papel importante na ovulação, uma vez que sua inibição através da administração de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) no período pré-ovulatório bloqueou a ovulação em 83% das éguas (CUERVO-ARANGO; DOMINGO-ORTIZ, 2011). Seu mecanismo de ação pode estar envolvido com a estimulação da síntese e atividade das collagenases na degradação da matriz extracelular (MEC) durante a ruptura folicular e na angiogênese inicial do CL (KIM; HARRIS; DUFFY, 2014; REICH et al., 1991).

Nas éguas, as células foliculares da teca começam a degenerar-se imediatamente antes da ovulação e estão quase completamente degeneradas após 24 horas (BERGFETL; ADAMS, 2011). Posterior a ovulação, as células da granulosa passam rapidamente por um processo de hipertrofia, denotada por um aumento no diâmetro das

células de 10 μm para 40 μm (PINTO, 2015), passando de células produtoras de estrogênio para células produtoras de progesterona, a partir do corpo lúteo (CL) (BERGFETL; ADAMS, 2011).

2.3 Corpo lúteo

O CL é uma glândula endócrina e transitória, formada após a ovulação e um processo de reorganização celular, tendo como função primordial a produção de progesterona (P4) (NISWENDER et al., 2000). Ao contrário de outras espécies, nas éguas e nas jumentas, ele encontra-se totalmente no estroma ovariano, na região da fossa de ovulação, o que o torna de difícil avaliação por meio de palpação transretal, tornando o exame ultrassonográfico indispensável. Ele pode ter morfologia normal ou cavitário, fator que não interfere na produção de P4, hormônio responsável pela supressão do estro e não aceitação ao macho, proliferação das glândulas histiotróficas do endométrio para manutenção inicial da gestação, aumento do tônus uterino e determinar o comprimento do ciclo estral.

É um órgão altamente vascularizado, demandando a maior taxa fluxo sanguíneo no corpo das fêmeas (REDMER; REYNOLDS, 1996), podendo consumir até seis vezes mais oxigênio por unidade de peso do que outros órgãos, como fígado, rim ou coração (SWANN; BRUCE, 1987).

2.3.1 Angiogênese e desenvolvimento

Após a ruptura folicular, a degradação da membrana basal é o principal fator envolvido na angiogênese luteal. Como já citado anteriormente, são vários os fatores envolvidos na ruptura folicular e degradação da membrana basal. Após esse processo, ocorre invasão das células vascularizadas da teca nas células avasculares da granulosa, bem como migração de células imunes (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos), proliferação de células endoteliais, periócitos, fibroblastos e formação dos brotos vasculares do CL inicial a partir de vasos pré-existentes das células foliculares da teca (MONGIAT et al., 2016).

A angiogênese lutea é regulada por fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; KUWANO et al., 2001), sendo formados novos vasos sanguíneos a partir de uma vascularização pré-existente (MÜLLER;

ELLENBERGER; SCHOON, 2009). Os principais fatores pró-angiogênicos produzidos no CL é o fator de crescimento endotelial A (VEGFA), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e angiopoietina 1 (Ang1). Após a ovulação, ocorre a formação do corpo hemorrágico, uma estrutura preenchida com sangue, transudato, células do sistema imune e linfa formando um coágulo (BERGFELT; ADAMS, 2007), que é um potente estimulador na migração de células endoteliais (FURUKAWA et al., 2007), responsáveis por estabelecer a angiogenese no CL.

Em bovinos, os primeiros brotos capilares são observados 36 horas após a ovulação (AMSELGRUBER; SCHÄFER; SINOWATZ, 1999), e após 12 horas em ratos (MEYER; MCGEACHIE, 1988). A degradação da membrana basal é fundamental para o desenvolvimento inicial do CL, pois ela é um reservatório de fatores pró-angiogênicos e citocinas, que são liberados após sua ruptura, sendo essenciais para o estabelecimento vascularização e esteroidogênese lútea.

O VEGFA é considerado o principal fator pró-angiogênico, sendo encontrada a expressão gênica dos seus receptores (VEGF- R1 e VEGF-R2) nas células foliculares da teca e da granulosa, bem como no CL inicial após a ovulação (MÜLLER; ELLENBERGER; SCHOON, 2009). Após se ligar ao seu receptor VEGF – R2, ele aumenta a permeabilidade vascular (DVORAK et al., 1995) e induz a proliferação, migração e germinação endotelial, bem como a formação de novas redes endoteliais (GALE; YANCOPOULOS, 1999). No CL inicial ocorre a proliferação de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e macrófagos dentre outros, colaborando para angiogenese luteal por meio da liberação citocinas (GALVÃO; FERREIRA-DIAS; SKARZYNSKI, 2013; SHRESTHA et al., 2018).

A hipóxia tecidual é o principal fator que estimula respostas angiogênicas (NEEMAN et al., 2003; REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2000). As células respondem à hipóxia através da ativação do fator induzido por hipóxia 1 (HIF1), que é um fator de transcrição que se liga a elementos de resposta à hipóxia (HRE) na região promotora de genes regulados por hipóxia (WANG; SEMENZA, 1993). Os principais genes regulados pelo HIF1 são o VEGF e a END2. As concentrações de oxigênio no fluido folicular diminuem nos últimos estágios do desenvolvimento folicular antral (BOONYAPRAKOB et al., 2005; NISHIMURA; OKUDA, 2010, 2015)

e no estágio inicial de desenvolvimento do CL (SHRESTHA et al., 2018). Estes estudos comprovam os papéis fundamentais da END2 e VEGF nos processos de ovulação e luteogênese nos animais.

Apesar de o VEGF ser considerado o principal fator pró-angiogênico, nessa fase de desenvolvimento inicial do CL o FGF2 é o principal responsável pela migração e desenvolvimento das CE luteínicas. Esse fato é confirmado por meio de estudos, onde a administração de um inibidor do receptor (FGFR1) de FGF2 bloqueou quase completamente (94%) a formação de redes endoteliais luteais *in vitro* (WOAD et al., 2009), ocorrendo mesmo na presença de VEGFA exógeno, o que sugere que o FGF2 é crítico para a formação de redes endoteliais luteínicas (WOAD et al., 2009, 2012).

Para que ocorra uma angiogênese adequada é necessária à formação de redes vasculares estáveis e integras, nesse contexto, entra em ação o PDGF. Ele tem como função atuar de forma parácrina no recrutamento de pericitos (GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003). Estes são células murais que presentes ainda no folículo e são responsáveis pela orientação das CE por meio das fibras de fibronectina na formação dos brotos endoteliais e estabilização da rede vascular do CL (AMSELGRUBER; SCHÄFER; SINOWATZ, 1999; REDMER et al., 2001; ROBINSON et al., 2009). Além de estarem envolvidas na angiogênese inicial do CL (OZERDEM; STALLCUP, 2003), sintetizam também VEGF após estimulados pelo ON endotelial (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2000).

A Ang1 é fundamental nesse processo de estabilização da vascularização lútea (FRASER, 2006), e após se ligar ao seu receptor (Tie2) presentes nas CE (SATO et al., 2002), contribuem para a maturação de novos vasos em estruturas vasculares mais complexas e maiores (HANAHAHAN, 1997), colaborando para formação tubular das CE (HAYES et al., 1999; KOBLIZEK et al., 1998).

A luteinização e vascularização no corpo lúteo equino estão completas entre 3 a 5 dias após a ovulação. À medida que o CL amadurece, as células luteais são caracterizadas por um aumento no diâmetro, núcleos vesiculados e vacúolos finos no citoplasma, os quais indicam um aumento na proliferação celular e produção de progesterona (P4) (BERGFETL; ADAMS, 2011).

2.3.2 Composição celular

O CL é composto por diferentes tipos celulares, constituindo-se de células esteroideogênicas (células luteais pequenas e grandes), e não esteroideogênicas (células endoteliais, células musculares lisas, periócitos, fibroblastos e células imunes) (FARIN et al., 1986; O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989; WATSON; SERTICH, 1990; YOSHIOKA et al., 2013). Como foi mencionado anteriormente, embora tenham características distintas, ambas as linhagem celulares estão envolvidas na angiogênese e consequentemente na produção de P4. Dependendo do estágio de desenvolvimento do corpo lúteo, as células endoteliais podem representar entre 85 a 50% da sua composição (LEI; CHEGINI; RAO, 1991; O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989; REDMER et al., 2001; REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2000).

As células lúteas grandes e pequenas são formadas a partir das células da granulosa e da teca (NISWENDER et al., 2000). Nos equinos as células lúteas grandes apresentam diâmetro de 20 a 65 μm e são caracterizadas morfológicamente como poliédricas grandes, com citoplasma vacuolado, um único núcleo excêntrico redondo ou oval, contendo um ou mais nucléolos; as células lúteas pequenas apresentam diâmetro de 7 a 18 μm , são alongadas e com núcleos irregulares de coloração escura (WATSON; SERTICH, 1990).

2.3.3 Esteroidogênese

A ligação do hormônio luteinizante (LH) a receptores existentes nas células da teca estimulam a atividade da enzima P450 17 α -hidroxilase, que atua na conversão da pregnenolona em androstenediona. Essa é metabolizada em estrógeno (E2) por meio da enzima P450aromatase presente nas células da granulosa (FORTUNE; QUIRK, 1988). Este é o modelo descrito por esses autores em bovinos, que pressupõem-se ocorrer na maioria das espécies. O aumento pré-ovulatório do LH resulta em luteinização das células granulosas e teca e altera a via esteroideogênica, de modo que a progesterona é o principal hormônio esteróide produzido por cada um desses tipos de células após a luteinização (NISWENDER et al., 2000).

A redução na concentração de E2 é devido a menor quantidade de aromatase nas células da granulosa (BELIN et al., 2000), fator essencial nas éguas, uma vez que altas concentrações de E2 nesses animais no período pré-ovulatório inibem o aumento

gradual de LH (GINTHER et al., 2010). Foi observado no líquido folicular de éguas, altas concentrações de P4 e baixas concentrações de E2 no período pré-ovulatório (OKÓLSKI et al., 1995; WATSON; HINRICHS, 1988).

Após a ovulação e posterior reorganização das células da teca e da granulosa, à medida que o CL amadurece, as células lúteas são caracterizadas por um aumento no diâmetro, núcleos vesiculados e vacúolos finos no citoplasma, os quais indicam um aumento na síntese celular e secreção de progesterona (BERGFETL; ADAMS, 2011). Para que as células lúteas sejam capazes de produzir altas concentrações de P4, é necessário um aumento na expressão de proteínas envolvidas no transporte de colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria, e enzimas necessárias para conversão de colesterol em progesterona, ou seja, complexo de citocromo P-450 (P-450_{scc}) e 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase / $\Delta^5\Delta^4$ isomerase (3 β -HSD) (BAO; GARVERICK, 1998).

O colesterol é o principal substrato para a produção de P4, sendo transportado em forma de lipoproteínas para os tecidos (NISWENDER et al., 2000). Os principais mecanismos para a obtenção do colesterol são a endocitose da lipoproteína de baixa densidade (LDL) rica em colesterol ou a absorção seletiva de ésteres de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL) (CHRISTENSON; DEVOTO, 2003). Em suínos, macacos e humanos o LDL é utilizado para a síntese de P4 pelo CL, enquanto os ruminantes, ratos e camundongos utilizam o HDL (CHRISTENSON; DEVOTO, 2003; DEVOTO et al., 2002; STOUFFER; BRANNIAN, 1993).

O colesterol necessário para a produção de P4 pode ser encontrado em forma de ésteres de colesteróis ou ligado a lipoproteínas (CHRISTENSON; DEVOTO, 2003), sendo esta última a principal via na esteroidogênese lútea (AZHAR; REAVEN, 2002). A captação do LDL pelas células lúteas ocorre por endocitose por meio do seu receptor (LDLR) na membrana plasmática (BROWN; GOLDSTEIN, 1986; LA VOIE, 2017). Quando no interior da célula, após uma combinação dos endossomos com os lisossomos, local onde a LDL se dissocia do seu receptor e junto a ele são degradados, tornando assim o colesterol livre disponível para a célula (GRUMMER; CARROLL, 1988). A captação de HDL extracelular ocorre após se ligar ao seu receptor (SR-BI) (ACTON et al., 1996), e ao contrário da situação do LDL, a entrega do seu colesterol às células não é acompanhada pela degradação do seu componente proteico, esse processo

é conhecido como captação seletiva de lipídios (KOVANEN et al., 1979; LEITERSDORF et al., 1986; WISHART; MACKINNON, 1990).

Os ésteres de colesterol são armazenados no retículo endoplasmático rugoso em forma de gotículas lipídicas, característico das células lúteas. Estes ésteres não podem servir como substrato para esteroidogênese nem como parte estrutural da membrana plasmática, necessitam ser hidrolisados por uma enzima extralisossômica, denominada hidrolase de colesterol neutro (NCEH) ou colesterol esterase, também conhecida como lipase sensível a hormônio (CHRISTENSON; DEVOTO, 2003). Essa é uma das primeiras etapas da esteroidogênese regulada por meio das vias de segundo mensageiro (NISWENDER et al., 2000).

Após o LH se ligar a receptores específicos na membrana plasmática das células lúteas, ele ativa a adenilato ciclase aumentando as concentrações de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). Essa é responsável pela ativação da proteína quinase A (PKA) (BERTAN et al., 2006), que por meio da fosforilação ativa a enzima colesterol esterase, que disponibiliza mais lipídeos no citoplasma (CAFFREY et al., 1979; TRZECIAK; BOYD, 1974). Todo esse processo resulta em mais colesterol disponível para síntese de P4, somado aquele já disponibilizado por meio do LDL e HDL. Devido à sua natureza hidrofóbica, o colesterol, substrato necessário para a produção de P4, não pode se difundir livremente no citosol da célula e alcançar a mitocôndria, sendo necessário ligar-se às proteínas transportadoras para que esse processo ocorra (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

Três proteínas são essências para o transporte de colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana interna, são elas: a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), receptor de benzodiazepínicos periférico (PBR) e endozepina, o ligante natural da PBR (NISWENDER, 2002). A proteína StAR se liga ao colesterol no citosol da célula e o transporta até a membrana mitocondrial externa, onde se encontra o PBR (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007), que se encarrega do transporte de colesterol da membrana mitocondrial externa para membrana mitocondrial interna, funcionando como um poro, facilitando o transporte entre as membranas (CULTY et al., 1999). A endozepina esta envolvida na fosforilação da PKA, ocasionando maior o transporte de colesterol pela proteína StAR, e por meio da sua

ligação com PBR, regulando o transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna, contribuindo de forma significativa na esteroidogênese (NISWENDER, 2002).

Uma vez transportado para a membrana mitocondrial interna, o colesterol é convertido em pregnenolona, catalisado pela clivagem da sua cadeia lateral, promovida pela enzima P450 (P450_{scc}), e posteriormente, no retículo endoplasmático liso (SER), é convertida em progesterona (P4), por meio da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) (CHRISTENSON; DEVOTO, 2003).

2.3.4 Luteólise

A luteólise ou regressão do corpo lúteo, ocorre em duas etapas, à primeira é definida como (luteólise funcional) devido à redução na concentração plasmática de P4 até se encontrar menor que 1ng/ml (GINTHER; HANNAN; BEG, 2011), seguida pela (luteólise estrutural), quando ocorre apoptose das células lúteas, redução no tamanho e peso do CL, bem como substituição do tecido vascular por tecido conjuntivo e fibras de colágeno (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

Com base em coletas de sangue realizadas de hora em hora, constatou-se por meio de concentrações plasmáticas de P4, que o período luteolítico na égua é de aproximadamente 23 horas (GINTHER; HANNAN; BEG, 2011). A luteólise pode ser fisiológica, quando ocorre falha na concepção ou reconhecimento materno da gestação, ocorrendo síntese e liberação prostaglandina F2 α (PGF2 α) do endométrio, atingindo concentração máxima entre os dias 10 e 14 do ciclo estral (D0=Ovulação) (DOUGLAS; GINTHER, 1976), ou pode ser induzida, através da administração de drogas luteolíticas (COFFMAN; PINTO, 2016; DOUGLAS; GINTHER, 1972).

As prostaglandinas são membros de uma grande família de compostos endógenos, os eicosanoides, e derivados de ácidos graxos oxigenados e insaturados que apresentam 20 átomos de carbono. Exercem diversas atividades biológicas nos tecidos e células, estando relacionadas à função reprodutora, controle da pressão sanguínea, processos inflamatórios, fluxo sanguíneo regional, função da musculatura lisa e atividade neuronal dentre outras (PALERMO-NETO; ARRUDA; MADUREIRA, 2011). A primeira etapa para a biossíntese de PGF2 α é a clivagem do ácido araquidônico presente da membrana fosfolipídica pela enzima fosfolipase A2 (COFFMAN; PINTO, 2016; MATSUOKA; NARUMIYA, 2007). A segunda etapa é pela ação das enzimas clicoxigenases 1 e 2

(COX-1 e COX-2), que irão realizar a conversão do ácido araquidônico e desencadear a síntese de prostaglandinas (COFFMAN; PINTO, 2016; YU et al., 2008).

A sensibilidade maior do CL de equinos que o de bovinos, pode ser explicada em parte devido a taxa de metabolização da droga ser 5 vezes mais lenta e a meia vida e o tempo de distribuição serem 3 vezes maiores do que bovinos (SHRESTHA et al., 2012). Em um estudo realizado por (KIMBALL; WYNGARDEN, 1977), demonstrou que as células lúteas equinas tem 5 vezes mais afinidade pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ do que as células lúteas bovinas, e 13 vezes mais que as ovinas. Estes estudos demonstram que uma série de fatores estão envolvidos na maior sensibilidade do CL equinos em relação a outras espécies.

O efeito da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a regressão do CL e síntese de P_4 depende da idade dessa glândula, do análogo da droga luteolítica e sua posologia, dentre outros. A utilização de 10 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse) no dia 3 após a ovulação, resultou em na luteólise e reduziu o intervalo interovulatório (IOI) em éguas, mesmo com um aumento transitório de P_4 três dias após a administração da droga (BERGFELT; PIERSON; GINTHER, 2006). A administração de duas doses de 0,5 mg de Lutalyse, com intervalo de 24 horas, sete dias após a ovulação, resultou em luteólise em todas as éguas, sendo esse tratamento tão efetivo quanto a administração de uma única dose de 10 mg, minimizando os efeitos colaterais causados pela droga (IRVINE et al., 2002).

Ao estudar o efeito de uma única dose (0,075 mg) de Cloprostenol em jumentas da raça Martina Franca, nos dias 3, 5, 7 e 9 após a ovulação, (CARLUCCIO et al., 2006, 2008) observaram que 95,5% a 100% dos animais apresentaram luteólise completa. (PANZANI et al., 2018) ao utilizarem 3 mg de alfaprostol, outro análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$, nos dias 3 e 6 pós ovulação em jumentas, observaram que a luteólise total ocorreu em 1/6 (16,6%) e 6/6 (100%) dos animais respectivamente.

As prostaglandinas exercem suas funções de acordo com o tipo de receptor que se ligam. Após se ligar a seus receptores (PTGFR) presentes nas células endoteliais e nas células lúteas grandes e pequenas, desencadeiam uma série de alterações que levam a ocorrência da luteólise (MEIDAN et al., 2017). Para que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ exerça seu efeito luteolítico, é necessário que o estágio de desenvolvimento do CL seja responsivo a ela.

Em asininos e equinos o CL se torna responsível 3º e 4º dia após a ovulação (BERGFELT; PIERSON; GINTHER, 2006; CARLUCCIO et al., 2006, 2008).

A concentração plasmática de P4 é reduzida antes da apoptose das células esteroidogênicas (BRADEN; GAMBONI; NISWENDER, 1988; JUENGEL et al., 1993), demonstrando que essas células não participam desse processo luteolítico inicial, e que a PGF2 α exerce outros efeitos locais diminuindo diretamente a concentração desse hormônio (HUGHES; PATE, 2018). Acredita-se que o agente luteolítico exerça efeitos regulando o fluxo sanguíneo, diminuindo a oferta de nutrientes, oxigênio e substrato para a produção de P4, e também reduzindo a capacidade esteroidogênica das células lúteas (NISWENDER et al., 2000).

Em vacas e jumentas após administração de PGF2 α exógena ocorre um aumento no fluxo sanguíneo do CL que persistiu por 2 e 3 horas respectivamente (ACOSTA et al., 2002; MIRÓ et al., 2015). Esse aumento na vascularização é mediado pelo ON (SHIRASUNA et al., 2008), que é produzido pelas células endoteliais após estimulação pela PGF2 α . O ON é um potente vasodilatador, que estimula a migração de células de defesa (leucócitos, macrófagos, linfócitos T) e citocinas (IL-8, TNF α , INF- γ) (ADASHI, 1990; SHIRASUNA et al., 2012), provocando um processo inflamatório e desencadeando a cáscara luteolítica.

Após o aumento do fluxo sanguíneo, ocorre uma vasoconstrição promovida pela EDN1, Ang II e ANGPT2, produzidas nas células endoteliais do CL (MEIDAN et al., 2017; MIYAMOTO; SHIRASUNA, 2009), limitando o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células lúteas. Após administração exógena de PGF2 α reduziu a expressão de um importante fator mitogênico (VEGF) nas células endoteliais de bovinos e equinos (AL-ZI'ABI; WATSON; FRASER, 2003; NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004), sendo as células endoteliais as primeiras a sofrer apoptose (SAWYER et al., 1990).

A PGF2 α atua na regulação da esteroidogênese lútea por meio da sua ligação com receptores específicos na membrana das células luteínicas grandes, estimulando a ação da proteinoquinase C (PKC), que atua de diversas maneiras: downregulation nos receptores de LH, diminuição na captação e no transporte de colesterol através da célula e/ou através das membranas mitocondriais, e diminuição da atividade das enzimas

esteroidogénicas fundamentais para biosíntese de P4 (NISWENDER, 2002; NISWENDER et al., 2000; PALERMO-NETO; ARRUDA; MADUREIRA, 2011).

2.4 Ultrassonografia na avaliação da funcionalidade do corpo lúteo

Apesar da ultrassonografia modo B ter sido usada por muito tempo para avaliação do CL (KASTELIC; PIERSON; GINTHER, 1990; RIBADU; WARD; DOBSON, 1994), vários estudos demonstraram que a ultrassonografia Doppler é mais precisa nessa avaliação (HERZOG et al., 2010), uma vez que o fluxo sanguíneo está diretamente relacionado com a concentração plasmática de P4 (BOLLWEIN et al., 2002; GINTHER et al., 2007), ocorrendo uma regressão funcional do CL antes da estrutural (ACOSTA et al., 2002).

A ultrassonografia Doppler é a única técnica atualmente disponível por meio da qual é possível realizar estudos *in vivo* e de forma não invasiva sobre a hemodinâmica do sistema reprodutivo concomitante com o acompanhamento do desenvolvimento, da manutenção e da regressão do CL (FERREIRA, 2013). Baseia-se nas frequências de deslocamento Doppler, em que a frequência de ecos de células vermelhas (hemácias) em movimento é aumentada ou diminuída à medida que essas células se movem em direção ao transdutor ou se afastam dele (GINTHER; UTT, 2004).

O modo Power Doppler permite a avaliação de vasos com pequeno diâmetro ou baixo fluxo, aumentando sensibilidade para exibir o fluxo sanguíneo dentro do tecido mole de 3 a 5 vezes quando comparado ao Color Doppler convencional (AMSO et al., 2001; GINTHER; UTT, 2004; MIYAZAKI et al., 1998). Independentemente da direção do fluxo sanguíneo, o modo Doppler produz uma imagem graduada cor única sobre a imagem em modo B, onde a intensidade da cor varia de acordo com a potência emitida pelo sinal doppler (GINTHER; UTT, 2004), sendo que a potência refere-se ao número de substâncias refletoras (hemácias) a uma determinada velocidade (YORK; KIM, 1999).

3. HIPÓTESE

Os dois agentes luteolíticos (dinoprost e cloprostenol) são eficazes na promoção da luteólise em jumentas podendo apresentar diferenças nas características ultrassonográficas do corpo lúteo e na manifestação dos efeitos colaterais em resposta à administração dos análogos da prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a resposta da administração intramuscular de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina na indução luteólise em jumentas nordestinas
- Determinar qual a melhor fármaco para induzir a luteólise em jumentas nordestinas minimizando seus efeitos colaterais

4.2 Objetivos Específicos

- Mensurar o tamanho do corpo lúteo e fluxo sanguíneo por meio exame ultrassonográfico modo B e modo Doppler
- Avaliar os efeitos adversos das drogas luteolíticas sobre o comportamento dos animais
- Avaliar diferença no tempo de redução no tamanho do corpo lúteo e no fluxo sanguíneo após a administração das diferentes drogas

5. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J. et al. Local Changes in Blood Flow Within the Early and Midcycle Corpus Luteum after Prostaglandin F₂ α Injection in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 651–658, 2002.
- ACOSTA, T. J. et al. Differential Blood Flow Changes Between the Future Dominant and Subordinate Follicles Precede Diameter Changes During Follicle Selection in Mares¹. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 502–507, 2004.
- ACTON, S. et al. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. **Science**, v. 271, p. 518–520, 1996.
- ADASHI, E. Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. **Endocrine Reviews**, v. 11, n. 3, p. 454–464, 1990.
- AL-ZI'ABI, M. O.; WATSON, E. D.; FRASER, H. M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 259–270, 2003.
- ALTOMONTE, I. et al. Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. **International Dairy Journal**, v. 89, p. 111–118, 2019.
- AMSELGRUBER, W. M.; SCHÄFER, M.; SINOWATZ, F. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: An immunocytochemical and ultrastructural study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 28, n. 3, p. 157–166, 1999.
- AMSO, N. N. et al. Quantification of power Doppler energy and its future potential. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 3, p. 583–587, 2001.
- AZHAR, S.; REAVEN, E. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: Partners in the regulation of steroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 195, n. 1–2, p. 1–26, 2002.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves : a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. August, p. 1903–1921, 1998.
- BEERS, W. H. Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 379–386, 1975.
- BELIN, F. et al. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1335–1343, 2000.
- BERGFELT, D. R.; ADAMS, G. P. Ovulation and Corpus Luteum Development. **Current Therapy in Equine Reproduction**, p. 1–13, 2007.
- BERGFELT, D. R.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Regression and resurgence of the CL following PGF₂ α treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1605–1619, 2006.
- BERGFETL, D. .; ADAMS, G. . Luteal Development. In: MCKINNON, A. . et al.

(Eds.). . **Equine Reproduction**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 2055–2064.

BERTAN, C. M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824–840, 2006.

BOLLWEIN, H. et al. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 65, p. 2043–2051, 2002.

BONELLO, N. et al. Inhibition of Nitric Oxide: Effects on Interleukin-1 β -Enhanced Ovulation Rate, Steroid Hormones, and Ovarian Leukocyte Distribution at Ovulation in the Rat1. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 436–445, 1996.

BOONYAPRAKOB, U. et al. Expression and localization of hypoxia inducible factor-1 α mRNA in the porcine ovary. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 215–222, 2005.

BORIONI, N. et al. Effect of equestrian therapy and onotherapy in physical and psychosocial performances of adults with intellectual disability: a preliminary study of evaluation tools based on the ICF classification. v. 34, n. July 2011, p. 279–287, 2012.

BRADEN, T. D.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Effects of Prostaglandin F $_{2\alpha}$ -Induced Luteolysis on the Populations of Cells in the Ovine Corpus Luteum1. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 245–253, 1988.

BRANNSTORM, M. et al. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 435–442, 1998.

BRANNSTROM, M. et al. Effects of tumour necrosis factor α (Tnf α) on ovulation in the rat ovary. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 1, p. 67–73, 1995.

BRÄNNSTRÖM, M.; ENSKOG, A. Leukocyte networks and ovulation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1–2, p. 47–60, 2002.

BRÄNNSTRÖM, M.; MAYRHOFER, G.; ROBERTSON, S. A. Localization of Leukocyte Subsets in the Rat Ovary during the Perioovulatory Period. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2, p. 277–286, 1993.

BRIDGES, P. J. et al. Production and binding of endothelin-2 (EDN2) in the rat ovary: endothelin receptor subtype A (EDNRA)-mediated contraction. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 780–787, 2010.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34–47, 1986.

CACIOPPO, J. A. et al. Granulosa cell endothelin-2 expression is fundamental for ovulatory follicle rupture. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

CAFFREY, J. . et al. during of Ovine Several Cholesterol Conditions ' Experimental have pools. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 601–608, 1979.

CAILLAUD, M.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. In vivo effect of interleukin-1 β and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 26, n. 3, p. 1–

9, 2005.

CAMILLO, F. et al. The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 44–49, 2018.

CANISSO, I. F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (Equus asinus) da raça Pêga**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia. p. 189. Dissertação de Mestrado., 2008.

CANISSO, I. F. et al. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (Equus asinus) mounting estrous horse mares (Equus caballus). **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 56–63, 2010.

CARLUCCIO, A. et al. Corpus luteum sensitivity to PGF2 α administration in the Martina Franca Jenny. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 171–173, 2006.

CARLUCCIO, A. et al. Luteal function in jennies following PGF2 α treatment 3 days after ovulation. **Theriogenology**, v. 70, p. 121–125, 2008.

CARNEIRO, G. F.; LUCENA, J. E. C.; BARROS, L. DE O. The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 106–110, 2018.

CHRISTENSON, L. K.; DEVOTO, L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 90, p. 1–9, 2003.

COFFMAN, E. A.; PINTO, C. R. A Review on the Use of Prostaglandin F2 α for Controlling the Estrous Cycle in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 40, p. 34–40, 2016.

CONWAY, E.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 7, p. 507–521, 2001.

CUERVO-ARANGO, J.; DOMINGO-ORTIZ, R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 707–714, 2011.

CULTY, M. et al. In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 123–130, 1999.

DE TARSO, S. G. S. et al. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 3, p. 448–457, 2017.

DEVOTO, L. et al. Control of human luteal steroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 137–141, 2002.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F2 α on length of diestrus in mares. **PROSTAGLANDINS**, v. 2, n. 4, p. 265–268, 1972.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy.

Prostaglandins, v. 11, n. 2, p. 251–260, 1976.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 5, p. 1029–39, 1995.

FAO. **Statistical database website, food and agriculture organization**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

FARIN, C. E. et al. Morphometric Analysis of Cell Types in the Ovine Corpus Luteum throughout the Estrous Cycle1. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 5, p. 1299–1308, 1986.

FERREIRA-DIAS, G. et al. Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E2 secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2011.

FERREIRA, J. C. Avaliação ultrassonográfica Doppler pré e pós-cobertura do trato reprodutivo de éguas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 37, n. 2, p. 108–114, 2013.

FORTUNE, J. .; QUIRK, S. . Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1–8, 1988.

FRASER, H. M. Regulation of the ovarian follicular vasculature. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1–9, 2006.

FURUKAWA, K. et al. Platelets are novel regulators of neovascularization and luteinization during human corpus luteum formation. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3056–3064, 2007.

GALE, N. W.; YANCOPOULOS, G. D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. **Genes and Development**, v. 13, n. 9, p. 1055–1066, 1999.

GALVÃO, A. M.; FERREIRA-DIAS, G.; SKARZYNSKI, D. J. Cytokines and Angiogenesis in the Corpus Luteum. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

GASTAL, M. O. et al. SEXUAL BEHAVIOR OF DONKEY JACKS: INFLUENCE OF EJACULATORY FREQUENCY AND SEASON. **Theriogenology**, v. 46, p. 593–603, 1996.

GÉRARD, N.; ROBIN, E. Cellular and molecular mechanisms of the preovulatory follicle differentiation and ovulation: What do we know in the mare relative to other species. **Theriogenology**, v. 130, p. 163–176, 2019.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell and Tissue Research**, v. 314, n. 1, p. 15–23, 2003.

GINTHER, O. J. et al. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1–2, p. 213–220, 2007.

GINTHER, O. J. et al. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17 β -estradiol at the time of ovulation in mares. **Animal Reproduction**

Science, v. 117, n. 1–2, p. 178–182, 2010.

GINTHER, O. J.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF 2α , progesterone, LH, and estradiol in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, p. 174–184, 2011.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: Principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516–526, 2004.

GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. **Journal of animal science**, v. 66, n. 12, p. 3160–3173, 1988.

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science**, v. 277, n. July, p. 48–50, 1997.

HAYES, A. J. et al. Angiopoietin-1 and its receptor tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. **Microvascular Research**, v. 58, n. 3, p. 224–237, 1999.

HELLBERG, P. et al. Leukocyte Supplementation Increases the Luteinizing Hormone-Induced Ovulation Rate in the in Vitro-Perfused Rat Ovary¹. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 5, p. 791–797, 1991.

HENRY, M.; LAGO, L. A. Asininos : animais com características sociais e reprodutivas próprias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 223–230, 2010.

HENRY, M.; LODI, L. D.; GASTAL, M. M. F. O. Sexual behaviour of domesticated donkeys *Equus asinus* / breeding under controlled or free range management systems. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, p. 263–276, 1998.

HERZOG, K. et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 691–697, 2010.

HUGHES, C. K.; PATE, J. L. Luteolysis and the Corpus Luteum of Pregnancy. In: **The Ovary**. [s.l: s.n.], p. 269–292.

IBGE. **Censo Agropecuário. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística**, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 26 abr. 2019

IRVINE, C. H. G. et al. Effectiveness of a two-dose regimen of prostaglandin administration in inducing luteolysis without adverse side effects in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 2, p. 191–194, 2002.

JIANG, J. Y. et al. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 211–223, 2003.

JUENGEL, J. . et al. Apoptosis during Luteal Regression in Cattle. **Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 249–254, 1993.

KASTELIC, J. .; PIERSON, R. .; GINTHER, O. . ULTRASONIC MORPHOLGGY OF

CORPORA LUTEA AND CENTRAL LUTEAL CAVITIES DURING THE ESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY IN HEIFERS. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 487–498, 1990.

KERBAN, A.; DORE, M.; SIROIS, J. Characterization of cellular and vascular changes in equine follicles during hCG-induced ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 115–123, 1999.

KIM, S. O.; HARRIS, S. M.; DUFFY, D. M. Prostaglandin E2 (EP) receptors mediate PGE2-specific events in ovulation and luteinization within primate ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1466–1475, 2014.

KIMBALL, F. .; WYNGARDEN, L. . PROSTAGLANDIN F2 α SPECIFIC BINDING IN EQUINE CORPORA LUTEA. **PROSTAGLANDINS**, v. 13, n. 3, p. 553–564, 1977.

KLIEM, H. et al. Dexamethasone-Induced Eosinopenia is Associated with Lower Progesterone Production in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 137–148, 2013.

KO, C. M. et al. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. **Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 1770–1779, 2006.

KOBLIZEK, T. I. et al. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. **Current Biology**, v. 8, n. 9, p. 529–532, 1998.

KOVANEN, P. . et al. Separate mechanisms for the uptake of high and low density lipoproteins by mouse adrenal gland in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 12, p. 5498–5505, 1979.

KUWANO, M. et al. Angiogenesis factors. **Internal medicine (Tokyo, Japan)**, v. 40, n. 7, p. 565–72, 2001.

LA VOIE, H. A. Luteal Steroidogenesis. In: MEIDAN, R. (Ed.). . **The Life Cycle of the Corpus Luteum**. [s.l: s.n.]. p. 37–55.

LEE, W.; NOVY, M. J. Effects of Luteinizing Hormone and Indomethacin on Blood Flow and Steroidogenesis in the Rabbit Ovary. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 799–807, 1978.

LEI, Z. M.; CHEGINI, N.; RAO, C. V. Quantitative Cell Composition of Human and Bovine Corpora Lutea from Various Reproductive States. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 1148–1156, 1991.

LEITERSDORF, E. et al. The role of apolipoproteins of HDL in the selective uptake of cholesteryl linoleyl ether by cultured rat and bovine adrenal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 878, n. 3, p. 320–329, 1986.

LOPES, K. R. F. et al. Characterization of the ovarian preantral follicle populations and its correlation with age and nutritional status in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus assinus*). **Animal Reproduction Science**, v. 187, n. November, p. 193–202, 2017.

MAGALHÃES, H. B. **FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL DA JUMENTA NORDESTINA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2019.

MAPA. **Revisão do estudo do complexo do Agronegócio do Cavalo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Brasília, DF, Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em: 26 abr. 2019

MARINO, R. et al. Nutritional properties and consumer evaluation of donkey bresaola and salami: Comparison with conventional products. **Meat Science**, v. 101, p. 19–24, 2015.

MARTELLI, A. et al. Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 7, p. 72, 2009.

MARTORIATI, A.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. In Vivo Effect of Epidermal Growth Factor, Interleukin-1 β , and Interleukin-1RA on Equine Preovulatory Follicles1. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1748–1754, 2003.

MATSUOKA, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **The Scientific World Journal**, v. 7, p. 1329–1347, 2007.

MEIDAN, R. et al. Luteolysis in ruminants: Past concepts, new insights, and persisting challenges. In: MEIDAN, R. (Ed.). . **The life cycle of the corpus Luteum**. Springer I ed. Jerusalem: [s.n.]. p. 159–182.

MEIRA, C. et al. ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF THE CONCEPTUS FROM DAYS 10 TO 60 OF PREGNANCY 1N JENNIES. **Theriogenology**, v. 49, p. 1475–1482, 1998a.

MEIRA, C. et al. OVARIAN ACTIVITY AND PLASMA CONCENTRATIONS OF PROGESTERONE AND ESTRADIOL DURING PREGNANCY IN JENNIES. **Theriogenology**, v. 49, p. 1465–1473, 1998b.

MEYER, G. T.; MCGEACHIE, J. K. Angiogenesis in the developing corpus luteum of pregnant rats: A stereologic and autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 222, n. 1, p. 18–25, 1988.

MIGONE, F. F. et al. In vivo imaging reveals an essential role of vasoconstriction in rupture of the ovarian follicle at ovulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 8, p. 2294–2299, 2016.

MIRÓ, J. et al. Color Doppler provides a reliable and rapid means of monitoring luteolysis in female donkeys. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 485–490, 2015.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 47–59, 2009.

MIYAZAKI, T. et al. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 207–212, 1981.

MIYAZAKI, T. et al. Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. **Human Reproduction**, v. 13, n. 10, p. 2836–2841, 1998.

- MONGIAT, M. et al. Extracellular matrix, a hard player in angiogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1–26, 2016.
- MÜLLER, K.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H. A. Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 3, p. 421–431, 2009.
- MURDOCH, W. J.; NIX, K. J.; DUNN, T. G. Dynamics of Ovarian to Periovarian Follicles of the Ewe. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 1001–1006, 1983.
- MURDOCH, W. J.; WILKEN, C.; YOUNG, D. A. Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 2, p. 325–329, 1999.
- NEEMAN, M. et al. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 78, n. 2, p. 57–70, 2003.
- NEUVIANS, T. P.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Fibroblast Growth Factor (FGF) Expression during Induced Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 4, p. 389–395, 2004.
- NISHIMURA, R.; OKUDA, K. Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 1, p. 110–6, 2010.
- NISHIMURA, R.; OKUDA, K. Multiple roles of hypoxia in ovarian function: Roles of hypoxia-inducible factor-related and -unrelated signals during the luteal phase. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 10, p. 1479–1486, 2015.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333–339, 2002.
- NOBRE, F. V. **Os equideos no Brasil, especialmente, no Nordeste**. I congresso brasileiro de zootecnia – XVII reunião da sociedade brasileira de zootecnia. **Anais...**Fortaleza, CE, Brasil: Mimeo: 1980
- O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 483–487, 1989.
- OKÓLSKI, A. et al. Successive Puncture of the Dominant Follicle followed by Ovulation and Fertilization: A New Experimental Model for the Study of Follicular Maturation in the Mare. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. monograph_series1, p. 385–392, 1995.
- OLIVEIRA, J. V. et al. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. **Theriogenology**, v. 85, p. 1267–1273, 2015.
- OLIVEIRA, J. V. et al. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and

fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 82–84, 2006.

OZERDEM, U.; STALLCUP, W. B. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. **Angiogenesis**, v. 6, n. 3, p. 241–249, 2003.

PALERMO-NETO, J.; ARRUDA, R. P. DE; MADUREIRA, E. H. Prostaglandinas. In: SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIK, S. L.; BERNADI, M. M. (Eds.). . **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. [s.l: s.n.]. p. 230–244.

PANZANI, D. et al. Effect of the administration of alfaprostol 3 or 6 days after ovulation in jennies: ultrasonographic characteristic of corpora lutea and serum progesterone concentration. **Theriogenology**, v. 121, p. 175–180, 2018.

PINTO, C. R. F. Early development of the corpus luteum in mares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 121–122, 2015.

POLIDORI, P. et al. A comparison of the carcass and meat quality of Martina Franca donkey foals aged 8 or 12 months. **Meat Science**, v. 106, p. 6–10, 2015.

PUXEDDU, I. et al. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 3, p. 628–636, 2005.

REDMER, D. A. et al. Evidence for a Role of Capillary Pericytes in Vascular Growth of the Developing Ovine Corpus Luteum1. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 879–889, 2001.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of reproduction**, v. 1, n. 3, p. 182–92, 1996.

REICH, D. et al. Preovulatory Changes in Ovarian Expression of Collagenases and Tissue Metalloproteinase Inhibitor Messenger Ribonucleic Acid: Role of Eicosanoids. **Endocrinology**, v. 129, n. 4, p. 1869–1875, 1991.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. <18 Reynolds y col 2000.pdf>. v. 12, n. 1, p. 1–9, 2000.

RIBADU, A. ; WARD, W. ; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **The Veterinary Record**, v. 135, n. 19, p. 452–457, 1994.

RILEY, S. C. et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3–4, p. 329–339, 2004.

ROBINSON, R. ; WOAD, K. . The life cycle of the corpus luteum. In: MEIDAN, R. (Ed.). . **The Life Cycle of the Corpus Luteum**. [s.l: s.n.]. p. 1–283.

ROBINSON, R. S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 869–881, 2009.

RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. **Ovulation: The Coordination of Intrafollicular Networks to Ensure Oocyte Release**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

SALIMEI, E. Reference Module in Food Science. **Reference Module in Food Science**,

p. 1–10, 2016.

SATO, T. N. et al. Selective functions of angiopoietins and vascular endothelial growth factor on blood vessels: The concept of “vascular domain”. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 67, n. February 2002, p. 171–180, 2002.

SAWYER, H. R. et al. NUCLEAR CHANGES IN OVINE LUTEAL CELLS IN RESPONSE TO PGF2 α . **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 229–237, 1990.

SESSIONS, D. R.; VICK, M. M.; FITZGERALD, B. P. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and their inhibitors in equine granulosa cells in vivo and in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 12, p. 3955–3966, 2009.

SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F2 α increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: The possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. **Reproduction**, v. 135, n. 4, p. 527–539, 2008.

SHIRASUNA, K. et al. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 2, p. 198–211, 2012.

SHKOLNIK, K. et al. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1462–1467, 2011.

SHRESTHA, H. K. et al. Plasma Clearance and Half-Life of Prostaglandin F2 α : A Comparison Between Mares and Heifers. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 18, p. 1–6, 2012.

SHRESTHA, K. et al. **Corpus Luteum Formation**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117–149, 2007.

STOUFFER, L. .; BRANNIAN, J. . and Modified by Macaque Cells Collected before and after the Ovulatory Stimulus : Correlation with Fluorescent Lipoprotein Uptake *. **Society**, v. 132, n. 2, p. 591–597, 1993.

SWANN, R. T.; BRUCE, N. W. Oxygen consumption, carbon dioxide production and progesterone secretion in the intact ovary of the Day-16 pregnant rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, n. 2, p. 599–605, 1987.

TAKEHARA, Y. et al. Effect of interleukin-1 β on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. **Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 1788–1793, 1994.

TAYLOR, P. D.; HILLIER, S. G.; FRASER, H. M. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 183, n. 1, p. 1–17, 2004.

TERRANOVA, P. F.; MONTGOMERY RICE, V. Review: Cytokine involvement in ovarian processes. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 1, p. 50–63, 1997.

TRZECIAK, W. H.; BOYD, G. S. Activation of Cholesteryl Esterase in Bovine Adrenal Cortex. **European Journal of Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 201–207, 1974.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 9, p. 4304–4308, 1993.

WATSON, E. D.; HINRICHS, K. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mare after administration of hCG. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 557–561, 1988.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 223–229, 1990.

WISHART, R.; MACKINNON, M. Uptake and metabolism of high-density lipoproteins by cultured rabbit hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1044, p. 375–381, 1990.

WOAD, K. J. et al. FGF2 is crucial for the development of bovine luteal endothelial networks in vitro. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 581–588, 2009.

WOAD, K. J. et al. Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. **Reproduction**, v. 143, n. 1, p. 35–43, 2012.

WOAD, K. J.; ROBINSON, R. S. Luteal angiogenesis and its control. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 221–228, 2016.

YORK, G.; KIM, Y. Ultrasound Processing and Computing: Review and Future Directions. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 1, p. 559–588, 1999.

YOSHIOKA, S. et al. Proliferation of luteal steroidogenic cells in cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

YOSHIOKA, S.; ACOSTA, T. J.; OKUDA, K. Roles of cytokines and progesterone in the regulation of the nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 10, p. 689–696, 2012.

YU, L. et al. E Series of Prostaglandin Receptor 2-Mediated Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase/Activator Protein-1 Signaling Is Required for the Mitogenic Action of Prostaglandin E2 in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 1, p. 258–267, 2008.

ZACKRISSON, U. et al. Ovary and ovulation: Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. **Human Reproduction**, v. 11, n. 12, p. 2667–2673, 1996.

CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo as normas do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, ISSN 1678-4162, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2016. Normas disponíveis no link: <https://www.scielo.br/revistas/abmvz/pinstruc.htm>

Luteal blood flow and side effects in jennies after luteolysis induction with Dinoprost and Cloprostenol

Felipe Erison Medrado Rocha de Sousa^{*1}

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

* Autor para correspondência: felipeerison@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o fluxo sanguíneo luteal e os efeitos colaterais em jumentas após administração de dois agentes luteolíticos. Cinco dias após a ovulação, oito fêmeas asininas foram *randomizadas* em *crossover design*, em dois grupos experimentais. No grupo 1 (G1) foi utilizado Dinoprost Trometamina, e no grupo 2 (G2) Cloprostenol sódico. Foram realizados exames ultrassonográficos modo B e modo Doppler 15 minutos antes (-15) da administração dos análogos da PGF2 α , e nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos e 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24 horas pós-aplicação. Já os efeitos colaterais foram observados nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos pós-administração dos agentes luteolíticos. O fluxo sanguíneo e a área do corpo lúteo reduziram gradativamente durante as primeiras 24 horas em ambos os grupos. Em relação a observação dos efeitos colaterais, a aplicação de Dinoprost Trometamina provocou um maior grau de sudorese, enquanto que, após aplicação de Cloprostenol

Sódico, maior desconforto abdominal e diarreia foram observados como efeitos colaterais. Conclui-se que ambos os tratamentos (dinoprost e cloprostenol) são eficientes na promoção da luteólise, entretanto os efeitos colaterais diferem em resposta à administração de cada ativo. Novos estudos se fazem necessários, com redução das doses luteolíticas efetivas visando minimizar os efeitos colaterais observados.

Palavras-chave: asininos, corpo lúteo, ultrassonografia Doppler, prostaglandinas.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the blood flow and side effect in jennies after treatment with two luteolytic drugs. Five days after ovulation, eight jennies included were randomized in crossover design into two experimental groups. In group 1 (G1) Dinoprost Tromethamine was used, and in group 2 (G2) Cloprostenol sodium. Mode B and Doppler ultrasound examinations were performed 15 minutes before (-15) administration of PGF₂ α , and at times 0, 15, 30, 45 and 60 minutes and 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 and 24 hours after application. Side effects were observed at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes after luteolytic agents administration. Blood flow and corpus luteum area decreased gradually during the first 24 hours in both groups. Regarding the observation of side effects, G1 presented major score of sweating, while in G2, greater abdominal discomfort and diarrhea was evidenced as a major side effect. It is concluded that both treatments (dinoprost and cloprostenol) are efficient in promoting luteolysis, however side effects differ between each active. Further studies are needed to determine whether low doses may be effective in inducing luteolysis to minimize side effects.

Keywords: jennies, corpus luteum, Doppler ultrasonography, progesterone, prostaglandins.

1. Introdução

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina e temporária responsável pela produção de progesterona (P4) (NISWENDER et al., 2000), hormônio responsável por determinar comprimento do ciclo estral. Sua capacidade esteroidogênica está diretamente relacionada com a sua vascularização (GINTHER et al., 2007; MIYAMOTO et al., 2005), podendo ser afetada pela prostaglandina F2 α (PGF2 α) endógena após falha na concepção ou reconhecimento materno da gestação, sendo liberada pelo endométrio entre os dias 13 a 16 do ciclo estral (CRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; DOUGLAS; DEL CAMPO; GINTHER, 1976; GINTHER, 2009; WEEMS; WEEMS; RANDEL, 2006) ou por meio da sua administração exógena ou de seus análogos (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2012; DOUGLAS; GINTHER, 1973; IRVINE et al., 2002; KUHL et al., 2016).

A utilização de uma única aplicação de diferentes agentes luteolíticos em asininos tem sido relatado com sucesso na promoção da luteólise (CARLUCCIO et al., 2006; MIRÓ et al., 2015; PANZANI et al., 2018), utilizando sempre as mesmas doses recomendadas para equinos. No entanto, não existem estudos avaliando os efeitos colaterais da PGF2 α e seus análogos, bem como da menor dose luteolítica efetiva em jumentas, deixando lacunas a serem preenchidas na compreensão do mecanismo luteolítico em relação as reações adversas de curto prazo provocadas pelos agentes indutores sobre a fisiologia desses animais.

Na manipulação do ciclo estral de éguas, após aplicação de PGF2 α , 20 a 40% dos animais apresentam reações adversas (COFFMAN; PINTO, 2016; NELSON, 1976), sendo relatados efeitos colaterais como sudorese, aumento na temperatura da pele, queda na temperatura retal, comportamento agitado, taquicardia, diarreia e desconforto abdominal, ocorrendo logo após aplicação e são de curta duração (ALLEN; STEWART, 1974; KUHL et al., 2016; MILLER; LAUDERDALE; GENG, 1976; NELSON, 1976), sendo que a manifestação e duração dessas reações podem variar entre os animais e são doses dependentes (ALLEN; STEWART, 1974; COFFMAN; PINTO, 2016; IRVINE et al., 2002; NELSON, 1976).

Após a indução da luteólise, é importante monitorar a regressão do CL nos animais, e nesse contexto, a ultrassonografia Doppler tem mostrado ser uma ferramenta fundamental para avaliar o status funcional do CL, uma vez que o fluxo sanguíneo está

diretamente relacionado com níveis séricos de progesterona (P4) em éguas (GINTHER et al., 2007), jumentas (MIRÓ et al., 2015) e vacas (ACOSTA et al., 2002), sendo um método não invasivo, acessível e preciso no diagnóstico e no monitoramento de eventos reprodutivos coordenados pelo CL (BOLLWEIN et al., 2002; BOLLWEIN; HEPPELMANN, 2016; GINTHER, 2014; GINTHER; UTT, 2004).

Existem poucas pesquisas sobre luteólise em jumentas (MIRÓ et al., 2015; PANZANI et al., 2018), e para conhecimento dos autores, não existe nenhum estudo comparando diferentes agentes luteolíticos em relação aos efeitos colaterais provocados por eles sobre a fisiologia das jumentas e com o fluxo sanguíneo e morfologia do CL relacionado a concentração plasmática de P4. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos colaterais provocados em jumentas e as alterações na morfologia e no fluxo sanguíneo do corpo lúteo após aplicação de uma única dose de dinoprost e cloprostenol no 5º dia pós-ovulação.

2. Material e Métodos

Os aspectos éticos desse experimento foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo, sob protocolo CEUA 0028/2019.

O estudo foi realizado entre o março e abril de 2019, os animais ficaram alojados no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - Unesp, campus de Botucatu, São Paulo, Brasil, localizado a 22°53'09" de latitude Sul, 48°26'42" de longitude Oeste, estando a 840 metros de altitude e possui clima subtropical úmido.

2.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizadas 8 jumentas da raça Nordestina, com idade média entre 7 e 9 anos, peso entre 95 e 116 Kg, altura de cernelha entre 95,5 e 113 cm (105.8 ± 5.2 cm). Os animais foram mantidos em piquetes de 200 m² e alimentados com feno de tifton (*Cynodon spp*) *ad libitum*.

Inicialmente o ciclo estral dos animais foi avaliado diariamente por exame ultrassonográfico modo B até a detecção de uma ovulação (D0) através do equipamento (MyLab Five VET; Esaote, Genoa, Itália), equipado com uma sonda linear transretal de

7,5 MHz (Modo B) e 5 MHz (Modo Doppler). Cinco diasb(D5) após a ovulação ter sido constatada as jumentas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos em *crossover design*:

Grupo 1 (G1) – aplicação de 5 mg (1mL/IM) de Dinoprost trometamina (Lutalyse[®], Zoetis Saúde animal. São Paulo – SP – Brasil).

Grupo 1 (G2) – aplicação de 0,250 mg (1mL/IM) de Cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal. Cravinhos - SP - Brasil).

Trinta dias antes do início do experimento os animais foram submetidos a um período de adaptação em relação ao manejo de palpações retais e exames ultrassonográficos a cada 48 horas para minimizar os efeitos relacionados ao estresse comportamental.

A avaliação da área total e do fluxo sanguíneo do corpo lúteo foi realizada por ultrassonografia modo B e Doppler respectivamente, utilizando um setup pré-programado pelo equipamento. Após a identificação do maior diâmetro do CL sem presença de artefatos a imagem era congelada e as dimensões do CL (área) eram efetuadas através da média das duas maiores medidas horizontal e vertical.

Após mensuração da área do corpo lúteo, o modo Power Doppler foi ativado para o escaneamento e mapeamento do fluxo sanguíneo do corpo lúteo. Com o objetivo de minimizar as variações nas análises, foi padronizado a utilização de um preset fixo no sistema de controle do Power Doppler (profundidade: 6 cm, persistência 4, Acoustic Power: 58%, densidade: High, Pulse Repetition Frequency: 0.8 KHz). Os escaneamentos do corpo lúteo tiveram duração de 1 a 2 minutos e os vídeos foram salvos no aparelho para posterior análise.

As avaliações foram realizadas 15 minutos antes da administração dos análogos da PGF2 α , e nos tempos 0, 30 e 60 minutos e 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24 horas após aplicação. Os mesmos momentos foram utilizados para coleta de sangue para dosagem da progesterona sérica, a qual foi dosada também 48, 72 e 96 horas após a aplicação. Já os efeitos colaterais foram observados nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos pós-administração dos agentes luteolíticos.

2.2 Análise das imagens

Inicialmente para avaliar a área total do corpo lúteo foi selecionada uma imagem com o maior diâmetro do CL, e a média obtida a partir das mensurações realizadas pelo sistema de medição do aparelho ultrassonográfico nos sentidos vertical e horizontal (Figura 1A) determinou sua área (cm²). A vascularização lútea foi determinada após uma imagem sem a presença de artefatos ser selecionada no momento que o CL apresentava maior perfusão vascular (sístole), sendo digitalizada para o software Adobe Photoshop (versão 2014.2.1) onde foram selecionadas as regiões que apresentavam fluxo sanguíneo (Figura 1B) e, por meio do software ImageJ ® - National Institutes of Health, foi obtido o HEC para quantificação do número total de pixels, disponível pela variável *Count* (Figura 1C).

Posteriormente o número total de pixels foi transformado em porcentagem (0-100%) por meio de uma fórmula matemática pré-estabelecida no software excel, onde o tempo -15 minutos antes da administração dos análogos da PGF2 α foi definido como momento em que o CL apresentava maior perfusão vascular (100%).

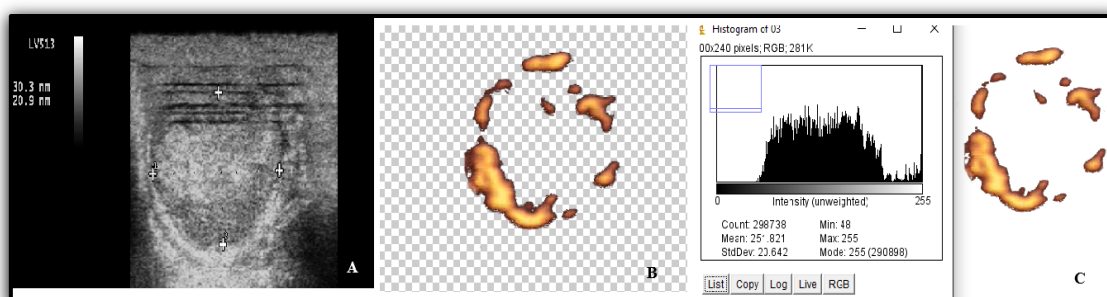


Figura. 1. Imagens e histograma representativo das avaliações efetuadas. (A) Área total do corpo lúteo. (B) Região de maior perfusão vascular. (C) Quantificação do número pixels.

2.3 Efeitos colaterais das drogas

Para avaliar os efeitos colaterais do Dinoprost Trometamina e Cloprostenol Sódico foram determinados os seguintes escores para os diferentes parâmetros:

Sudorese: observada nas regiões da base da orelha, peitoral, pescoço, escápula, dorso e flanco.

(0) Ausência de sudorese

- 177 (1) Leve sudorese em apenas uma região do corpo
178 (2) Moderada sudorese em duas ou três regiões do corpo
179 (3) Intensa em mais de quatro regiões do corpo
- 180 Desconforto abdominal:
- 181 (0) Ausência de desconforto abdominal
182 (1) Leve desconforto animal quando o animal olhava para o flanco (esquerdo e direito)
183 com ausência de contrações abdominais
184 (2) Moderado desconforto abdominal quando o animal olhava constantemente para o
185 flanco (esquerdo e direito) com contrações abdominais suaves e movimentos de cavar o
186 chão com as patas
187 (3) Intenso desconforto abdominal quando o animal apresentava inquietação,
188 movimentos de cavar o chão com as patas e olhava constantemente para o flanco
189 (esquerdo e direito) com contrações abdominais severas (mímica de micção sem urinar)
- 190 Diarreia:
- 191 (0) Ausência de diarreia
192 (1) Leve quando o animal eliminava fezes bem formadas (síbalas)
193 (2) Moderada quando o animal eliminava constantemente fezes pastosas e não formadas
194 (3) Intensa quando eliminava fezes aquosas em padrões de jatos

195 2.4. Análise estatística

196 As distribuições de homogeneidade e normalidade foram testadas utilizando o test
197 de Levene e Shapiro Wilk, respectivamente. As comparações da área do corpo lúteo,
198 fluxo sanguíneo (número de pixels e porcentagem) foram realizadas utilizando uma
199 análise de medidas repetidas no tempo com o PROC MIXED do pacote SAS versão 9.4.
200 O momento (M), tratamento (T) e a sua interação (M:T) foram estabelecidos como
201 efeitos fixos. Comparações com efeitos do fator ou interações foram ajustadas com o
202 test de TUKEY-KRAMER. A melhor matriz foi estimada empregando o critério de
203 informação AKAIKE, onde o valor menor é o melhor. Diferença estatística significativa
204 foi considerada quando $p < 0.05$; tendência quando $p > 0.05 \leq 0.1$. Os dados são
205 apresentados como $\text{media} \pm \text{SEM}$.

As variáveis sudorese, desconforto abdominal e diarreia foram analisadas empregando o teste não paramétrico de Wilcoxon e Man Withney quando tratou-se de comparações entre o mesmo grupo e entre os diferentes grupos, respectivamente. Os resultados são mostrados como mediana (limite superior e inferior) Diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0.05$.

3. Resultados

As duas drogas estudadas Dinoprost e Cloprostenol foram eficazes na promoção da luteólise a regressão da área total e perfusão vascular do corpo lúteo (CL) 24 horas após o início do tratamento. Foi observado um aumento no fluxo sanguíneo do CL 60 minutos após aplicação da droga (hora 0) no grupo tratado com Cloprostenol, persistindo até a hora 5, com redução progressiva nos momentos posteriores. Já no grupo tratado com Dinoprost, um aumento na perfusão vascular ocorreu 60 minutos pós aplicação e persistiu até a hora 3, sendo reduzida nos momentos seguintes. Nas horas 8, 12 e 24 pós tratamento, a perfusão sanguínea foi reduzida para (40,5%), (24,5%) e (9,8%) no grupo tratado com Dinoprost, enquanto que no grupo tratado com Cloprostenol foi para (52,5%), (27,8%) e (10,1%) respectivamente, quando comparados ao momento anterior a administração das drogas, onde o fluxo era de 100%. (Figura 2).

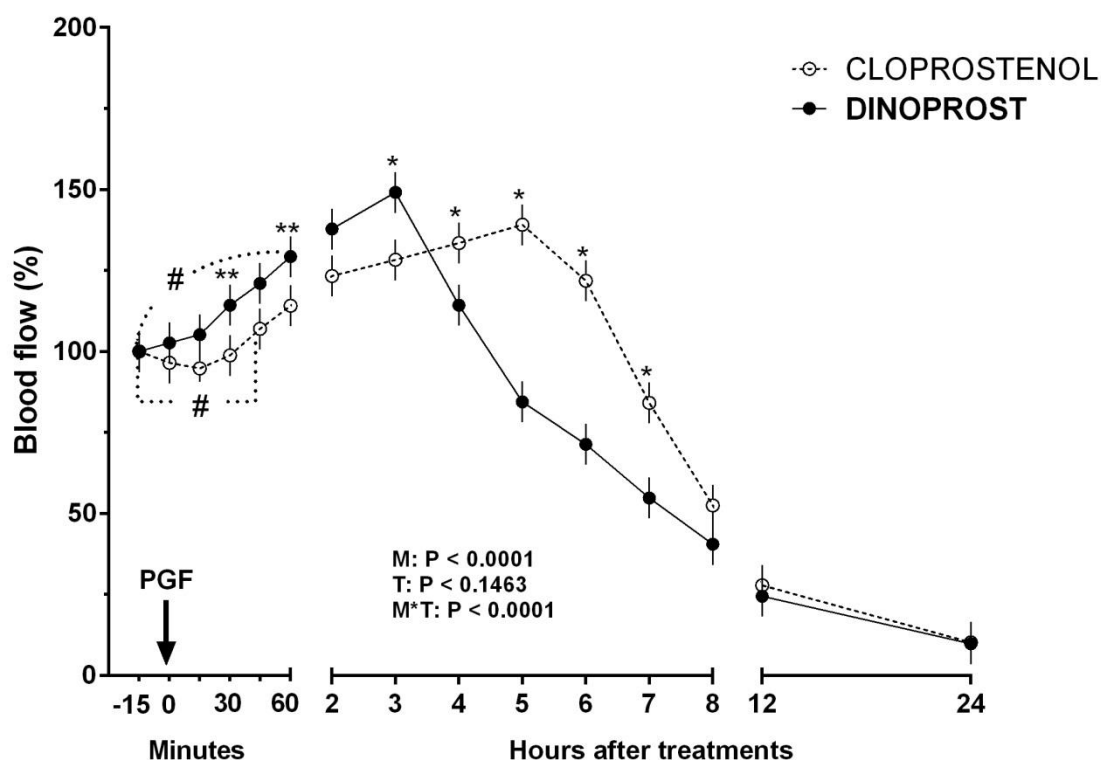


Figura 2: Valores médios e SEM da perfusão vascular do corpo lúteo (CL) nos grupos Dinoprost e Cloprostenol, avaliados 15 minutos antes até 24 horas após administração dos fármacos, (↓) indica a hora do tratamento (hora 0). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento foram destacadas por (*), enquanto que nos minutos -15 a 60 observou-se tendência ($p > 0,05$ e $\leq 0,1$) representada por (**). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os momentos dentro de um mesmo grupo foram destacadas por (#).

O Dinoprost e o Cloprostenol promoveram redução na área total do corpo lúteo (CL) 24 horas pós aplicação. No momento 60 minutos pós tratamento a área do CL começa a regredir progressivamente independente do tratamento, apresentando diferença estatística na hora 7 pós aplicação, onde o grupo tratado com dinoprost a área do CL é de $1,7 \text{ cm}^2$, e no grupo tratado com cloprostenol, $1,8 \text{ cm}^2$. Entre as horas 8 e 12 não foi observada diferenças estatística, enquanto que na hora 24 pós-tratamento, o grupo tratado com dinoprost apresentou área do CL de $1,3 \text{ cm}^2$, e no grupo tratado com cloprostenol, de $1,2 \text{ cm}^2$.(Figura 3).

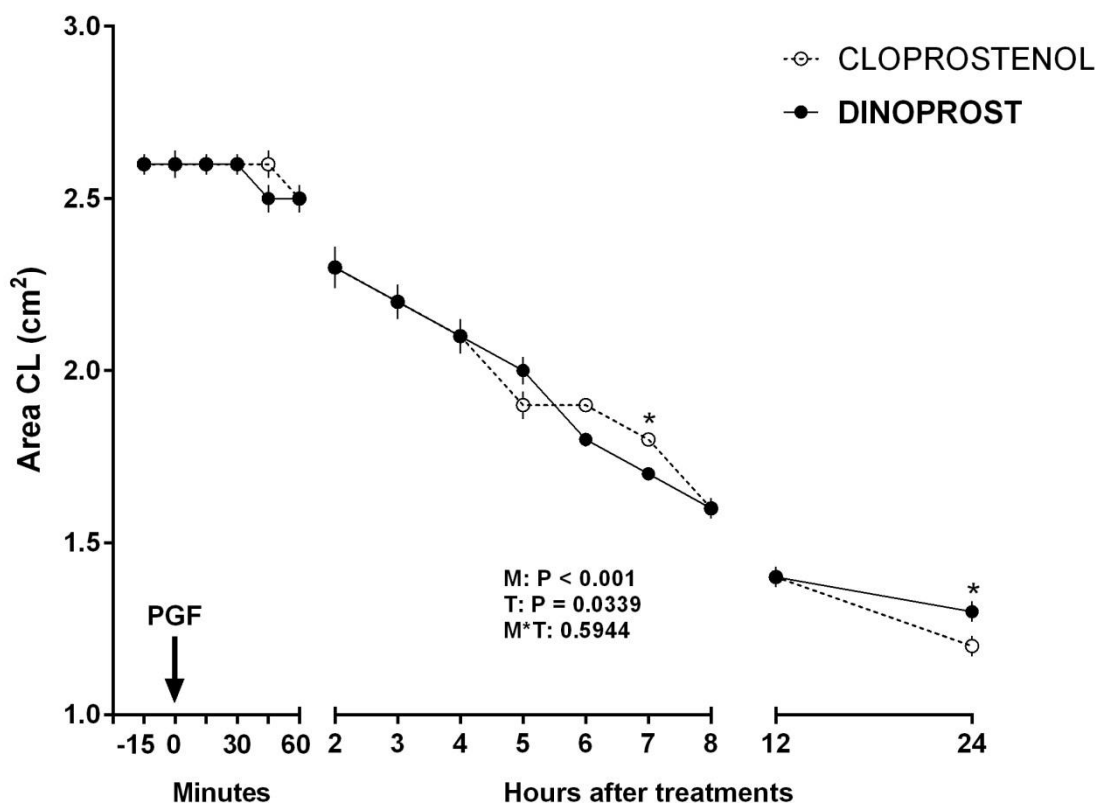


Figura 3: Valores médios e SEM da área total do corpo lúteo (CL) nos grupos Dinoprost e Cloprostenol, avaliados 15 minutos antes até 24 horas após administração das drogas luteolíticas, momento representado pela seta (↓) indicando a hora dos tratamentos (hora 0). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento foram destacadas por (*)

Na avaliação dos efeitos colaterais das drogas luteolíticas, o grupo tratado com Cloprostenol apresentou maior desconforto abdominal e maior grau de diarreia, enquanto o grupo tratado com Dinoprost apresentou maior grau de sudorese (Figura 4).

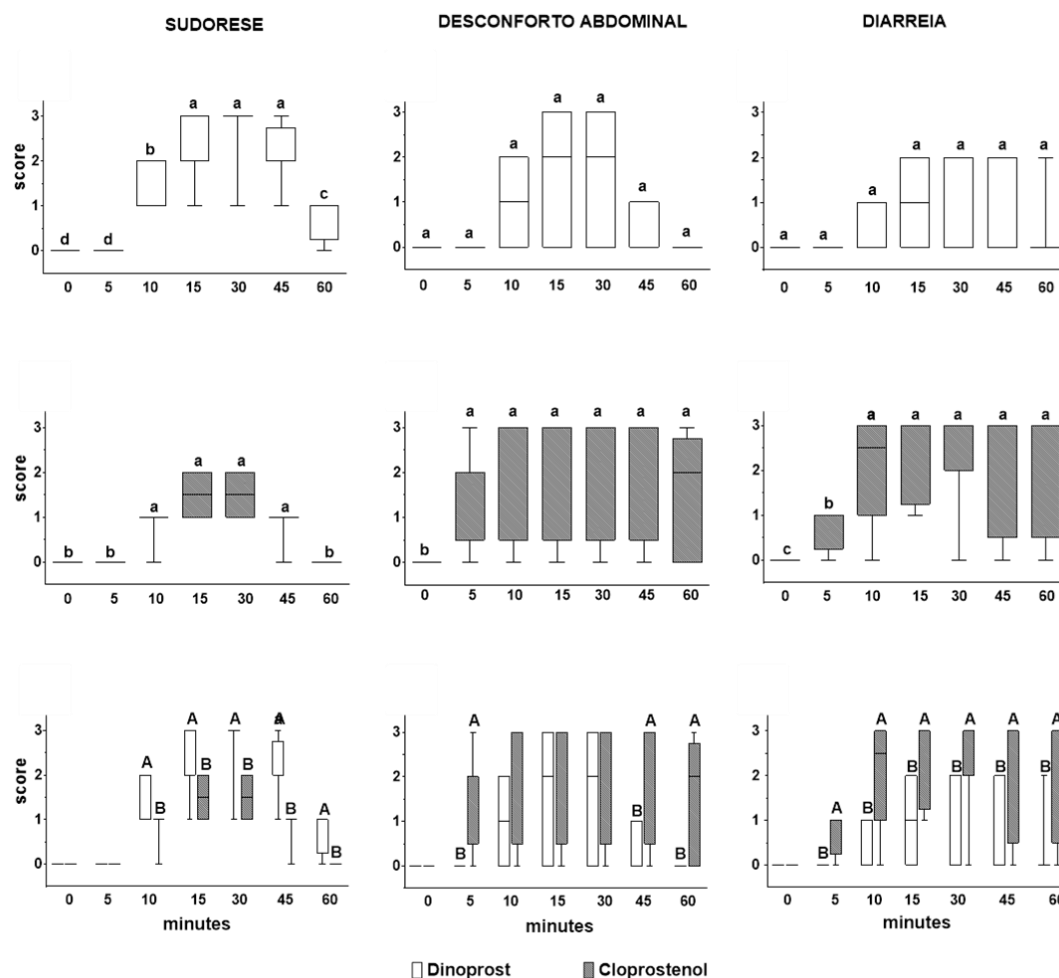


Figura 4: Mediana (limite superior e inferior) de sudorese, desconforto abdominal e diarreia das jumentas tratadas com Dinoprost (n=8; barras brancas) e Cloprostenol (n=8; barras cinzas). Letras diferentes (^a, ^b, ^c, ^d) indicam diferenças estatísticas entre os momentos dentro de um mesmo grupo. Letras maiúsculas (^A,^B) indicam diferenças estatísticas entre os momentos nos diferentes grupos.

4. Discussão

A prostaglandina F2 α (PGF2 α) é amplamente utilizada na reprodução de grandes animais, sendo a principal droga utilizada na manipulação farmacológica do ciclo estral de éguas (COFFMAN; PINTO, 2016) e jumentas (CARLUCCIO et al., 2008; MIRÓ et al., 2015; PANZANI et al., 2018), promovendo a luteólise e consequentemente menor intervalo interovulatório (DOUGLAS; GINTHER, 1972). No presente estudo, o aumento pronunciado no fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) dos animais tratados tanto com Dinoprost quanto Cloprostenol no 5º dia pós-ovulação, foi similar ao relatado por outros autores em bovinos e asininos (ACOSTA et al., 2002; MIRÓ et al., 2015). No grupo tratado com Dinoprost, a perfusão vascular do CL permaneceu aumentada até a hora 3 pós-aplicação (Fig. 5), sendo comparável ao relatado na literatura, ao utilizar o

mesmo agente luteolítico em jumentas da raça catalã (MIRÓ et al., 2015). No entanto, no grupo tratado com Cloprostenol, o fluxo sanguíneo permaneceu aumentado até a hora 5 pós-aplicação (Fig. 6). Essa persistência na vascularização, pode ser devido a uma menor sensibilidade das células lúteas grandes de asininos ao cloprostenol, retardando a redução no fluxo sanguíneo.

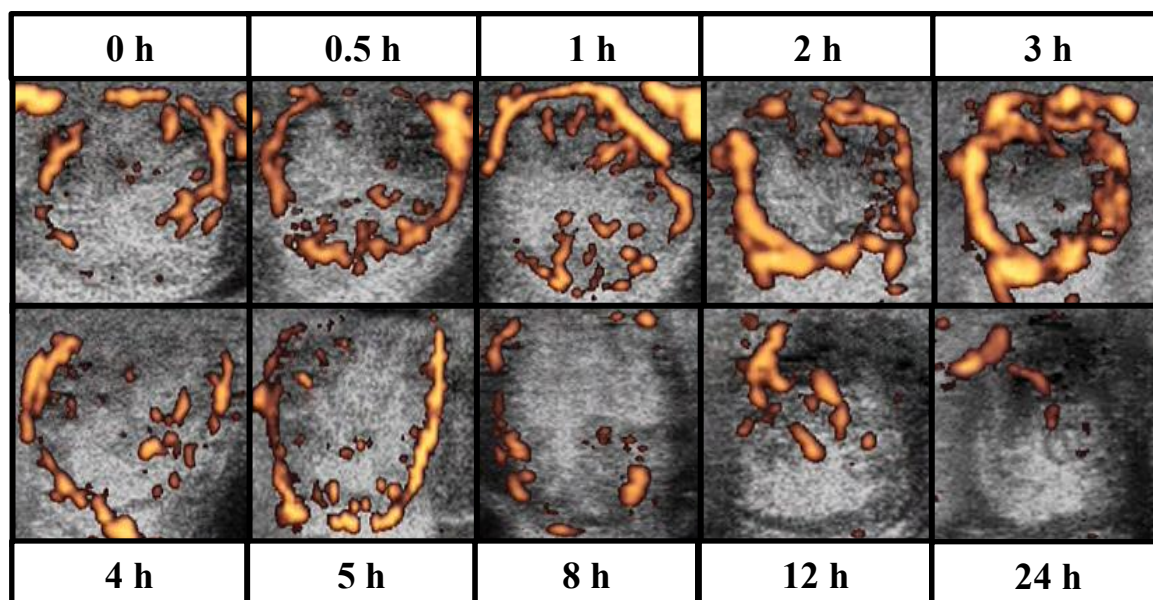


Figura 5: Imagens representativas do fluxo sanguíneo luteal avaliadas por ultrassonografia Doppler antes (0 h) e depois (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h) da administração de Dinoprost.

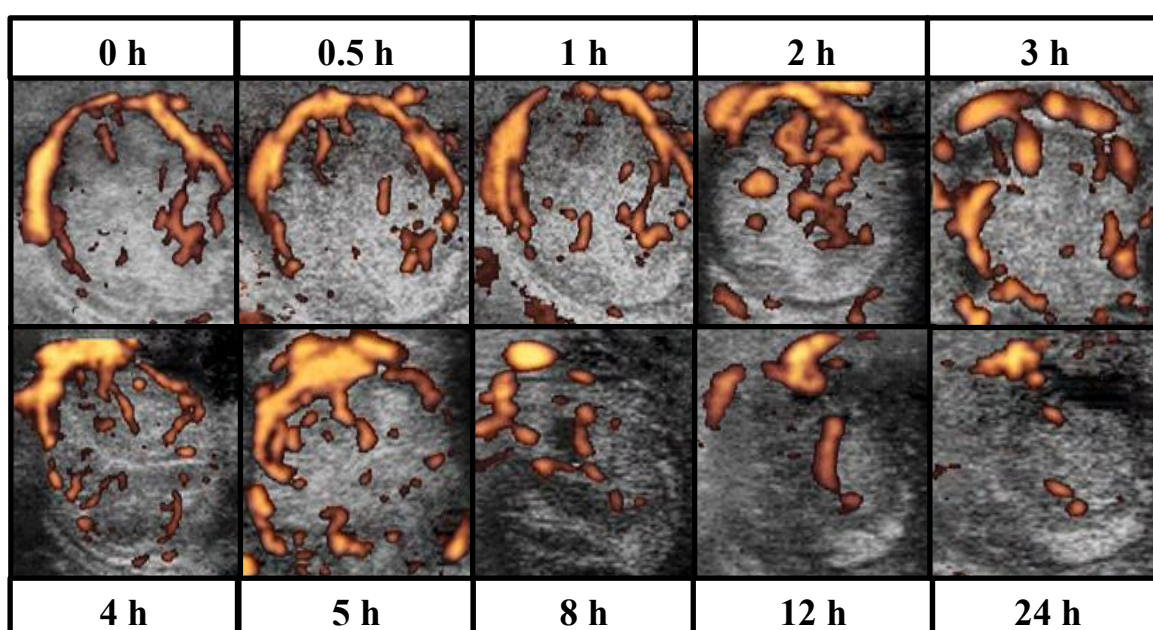


Figura 6: Imagens representativas do fluxo sanguíneo luteal avaliadas por ultrassonografia Doppler antes (0 h) e depois (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h, 12 h e 24 h) da administração de Cloprostenol.

Em relação ao tamanho do CL, tanto os grupos tratados com Cloprostenol e Dinoprost responderam de forma semelhante à droga, ocorrendo uma redução progressiva na área do CL a partir de 60 minutos até a hora 24 pós-tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados em jumentas, onde se observou regressão na área do CL e nas contrações plasmáticas de P4 60 minutos pós-administração do agente luteolítico (MIRÓ et al., 2015). Em bovinos, a área do CL permanece inalterada até a hora 8 pós-aplicação da $\text{PGF2}\alpha$, enquanto que a progesterona (P4) começa a decrescer após 30 minutos, demonstrando que a luteólise funcional acontece antes que a estrutural nessa espécie. O início da luteólise estrutural 60 minutos após a aplicação da droga luteolítica independente do grupo tratado (Cloprostenol ou Dinoprost) em asininos, pode ser devido a menor capacidade em resistir à degradação tecidual das células luteas, quando comparado aos bovinos.

No presente estudo, no grupo tratado com Dinoprost, foi observado graus mais intensos de sudorese, quando comparado ao grupo tratado com Cloprostenol. A sudorese é um mecanismo termoregulatório regulada por vários fatores como óxido nítrico e prostaglandinas, que irão promover uma vasodilatação cutânea (CHARKOUDIAN, 2010; MCCORD; CRACOWSKI; MINSON, 2006). A ocorrência da sudorese mais pronunciada no grupo tratado com Dinoprost pode ter acontecido devido a maior estímulo na liberação de substâncias vasoativas, quando comparada ao Cloprostenol, e em equinos, a sudorese ser mostrou ser dose dependente (IRVINE et al., 2002; MILLER; LAUDERDALE; GENG, 1976).

Neste estudo, o grupo tratado com Cloprostenol apresentou maior grau de desconforto abdominal e diarreia, enquanto o grupo tratado com dinoprost apresentou maior grau de sudorese. Em relação a diarreia, relatos similares em equinos são encontrados na literatura, onde após aplicação de $\text{PGF2}\alpha$, 50 a 64% das éguas apresentam quadros diarreia (ALCÁNTARA; BOETA; PORRAS, 2005; KUHL et al., 2016), sendo esses efeitos purgativos das prostaglandinas também relatados em humanos (HORTON; MAIN, 1963; HORTON; SQUARE, 1968; SMITH; MASON, 1974), e são provocados provavelmente por ação direta nos músculos lisos intestinais (BENNETT; FLESHLER, 1970; HEDQVIST, 1977; WALLER, 1973). A $\text{PGF2}\alpha$ parece exercer ainda efeito indireto sobre a motilidade gastrointestinal estimulando a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e cortisol, provocando mudanças na consistência fecal, uma vez que CRH retarda o esvaziamento gástrico, mas

acelera o transito no cólon (KUHL et al., 2016; TACHÉ; KIANK; STENGEL, 2009). Já em relação ao desconforto abdominal, efeitos semelhantes também relatados em equinos após aplicação de PGF2 α , ocorrendo devido a hipermotilidade intestinal (COFFMAN; PINTO, 2016).

Neste estudo, devido a modificações na molécula de PGF2 α que aumentam afinidade pelos receptores das células lúteas (KUHL et al., 2016), acreditava-se que o efeitos colaterais provocado pelo cloprostenol fossem menos evidentes, quando comparados aos provocados dinoprost. No entanto, ambos os grupos (dinoprost e cloprostenol) provocaram reações adversas em todos os animais, nos levando a acreditar que dose utilizada para éguas, é muito alta para ser usada em jumentas da raça nordestina, uma vez que todos os animais apresentaram alguma reação adversa.

Devido à semelhança dos asininos com a espécie equina, que possui maior sensibilidade a PGF2 α devido a uma metabolização mais lenta da droga, maior meia vida e distribuição nos tecido comparado aos bovinos (SHRESTHA et al., 2012), pode ser que esses fatores associados ao menor porte e peso corporal das jumentas, podem ter potencializado a ação dos agente luteolíticos nesses animais, tornando os efeitos colaterais muito mais evidentes.

5. Conclusões

Com base nos achados ultrassográficos, conclui-se que tanto o Dinoprost quanto o Cloprostenol são efetivos na indução da luteólise em jumentas nordestinas. Ambos os agentes luteolíticos causaram reações adversas sobre comportamento animal, sendo que o Dinoprost provocou maior sudorese, e o Cloprostenol maior desconforto abdominal e diarreia. Ambos os tratamentos (dinoprost e cloprostenol) provocaram diarreia nos animais. Novos estudos são necessários para ajustar a menor dose luteolítica efetiva em jumentas nordestinas, minimizando seus efeitos colaterais.

6. Referências

- ACOSTA, T. J. et al. Local Changes in Blood Flow Within the Early and Midcycle Corpus Luteum after Prostaglandin F_{2α} Injection in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 651–658, 2002.
- ALCÁNTARA, B.; BOETA, M.; PORRAS, A. Luteolysis, Estrus Induction, and Clinical Side Effects in Mares Treated With a PGF_{2α} Analog, Cloprostenol (Sinocrel 11-21). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, n. 9, p. 384–386, 2005.
- ALLEN, W. .; STEWART, F. Further Studies on the Use of Synthetic Prostaglandin Analogues for Inducing Luteolysis in Mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 6, n. 1, p. 31–35, 1974.
- BENNETT, A.; FLESHLER, B. Progress in gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 59, n. 5, p. 790–800, 1970.
- BOLLWEIN, H. et al. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 65, p. 2043–2051, 2002.
- BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 32, p. 149–164, 2016.
- CARLUCCIO, A. et al. Corpus luteum sensitivity to PGF_{2α} administration in the Martina Franca Jenny. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 171–173, 2006.
- CARLUCCIO, A. et al. Luteal function in jennies following PGF_{2α} treatment 3 days after ovulation. **Theriogenology**, v. 70, p. 121–125, 2008.
- CHARKOUDIAN, N. Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, p. 1221–1228, 2010.
- COFFMAN, E. A.; PINTO, C. R. A Review on the Use of Prostaglandin F_{2α} for Controlling the Estrous Cycle in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 40, p. 34–40, 2016.
- CRACKEN, J. A. M. C.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis : A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263–324, 1999.
- CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. Relationship Between Dose of Cloprostenol and Age of Corpus Luteum on the Luteolytic Response of Early Dioestrous Mares: A Field Study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 660–665, 2012.
- DOUGLAS, R. H.; DEL CAMPO, M. R.; GINTHER, O. J. Luteolysis Following Carotid or Ovarian Arterial Injection of Prostaglandin F_{2α} in Mares. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 473–477, 1976.
- DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F_{2α} on length of diestrus in mares. **PROSTAGLANDINS**, v. 2, n. 4, p. 265–268, 1972.

- DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. LUTEOLYSIS FOLLOWING A SINGLE INJECTION OF PROSTAGLANDIN F2 α IN SHEEP. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 990–993, 1973.
- GINTHER, O. J. et al. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1–2, p. 213–220, 2007.
- GINTHER, O. J. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. **Theriogenology**, v. 72, p. 591–598, 2009.
- GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112–125, 2014.
- GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: Principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516–526, 2004.
- HEDQVIST, P. BASIC MECHANISMS OF PROSTAGLANDIN ACTION ON AUTONOMIC NEUROTRANSMISSION. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 17, p. 259–279, 1977.
- HORTON, E. W.; MAIN, I. H. M. A COMPARISON OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FOUR PROSTAGLANDINS. **British Journal of Pharmacology**, v. 21, p. 182–189, 1963.
- HORTON, E. W.; SQUARE, B. Effect of orally administered prostaglandin EB on gastric secretion and gastrointestinal motility in man. **Gut**, v. 9, p. 655–658, 1968.
- IRVINE, C. H. G. et al. Effectiveness of a two-dose regimen of prostaglandin administration in inducing luteolysis without adverse side effects in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 2, p. 191–194, 2002.
- KUHL, J. et al. The PGF2 α agonists luprostirol and D -cloprostenol reliably induce luteolysis in luteal phase mares without evoking clinical side effects or a stress response. **Animal Reproduction Science**, v. 168, p. 92–99, 2016.
- MCCORD, G. R.; CRACOWSKI, J.; MINSON, C. T. Prostanoids contribute to cutaneous active vasodilation in humans. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, p. 596–602, 2006.
- MILLER, P. .; LAUDERDALE, J. W.; GENG, S. Effects of various doses of Prostin F2 alpha® on estrous cycles, rectal temperature, sweating, heart rate and respiration rate in mares. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 901–911, 1976.
- MIRÓ, J. et al. Color Doppler provides a reliable and rapid means of monitoring luteolysis in female donkeys. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 485–490, 2015.
- MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 329–339, 2005.
- NELSON, A. M. R. The Therapeutic Activity , Post-Treatment Fertility and Safety of Prostaglandin F2a Tham Salt in Clinically Anoestrous Mares : A Review. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, n. 2, p. 75–77, 1976.

- 435 NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the
436 Corpus Luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.
- 437 PANZANI, D. et al. Effect of the administration of alfaprostol 3 or 6 days after
438 ovulation in jennies: ultrasonographic characteristic of corpora lutea and serum
439 progesterone concentration. **Theriogenology**, v. 121, p. 175–180, 2018.
- 440 SHRESTHA, H. K. et al. Plasma Clearance and Half-Life of Prostaglandin F2alpha: A
441 Comparison Between Mares and Heifers. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 18, p. 1–
442 6, 2012.
- 443 SMITH, E. .; MASON, M. . TOXICOLOGY OF THE PROSTAGLANDINS.
444 **PROSTAGLANDINS**, v. 7, n. 3, p. 247–268, 1974.
- 445 TACHÉ, Y.; KIANK, C.; STENGEL, A. A Role for Corticotropin-releasing Factor in
446 Functional Gastrointestinal Disorders. **Current Gastroenterology Reports**, v. 11, p.
447 207–277, 2009.
- 448 WALLER, S. L. Prostaglandins and the gastrointestinal tract. **Gut**, p. 402–417, 1973.
- 449 WEEMS, C. .; WEEMS, Y. .; RANDEL, R. . Prostaglandins and reproduction in female
450 farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206–228, 2006.
- 451
- 452
- 453