

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

COMPARAÇÃO DA PERFUSÃO VASCULAR FOLICULAR,  
LUTEAL, UTERINA E PERFIL HORMONAL PLASMÁTICO  
ENTRE ÉGUAS JOVENS E IDOSAS SUPLEMENTADAS OU  
NÃO COM L-ARGININA

HÉLÈNE LACERDA DE RESENDE

Botucatu – SP  
Janeiro/ 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

COMPARAÇÃO DA PERFUSÃO VASCULAR FOLICULAR,  
LUTEAL, UTERINA E PERFIL HORMONAL PLASMÁTICO  
ENTRE ÉGUAS JOVENS E IDOSAS SUPLEMENTADAS OU  
NÃO COM L-ARGININA

HÉLÈNE LACERDA DE RESENDE

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia Animal para obtenção  
do título de Mestre.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga  
Co-Orientador: Luciano Andrade Silva

Botucatu/SP  
Janeiro/ 201

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

Resende, Hélène Lacerda de.

Comparação da perfusão vascular folicular, luteal, uterina e perfil hormonal plasmático entre éguas jovens e idosas suplementadas ou não com L-Arginina / Hélène Lacerda de Resende. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Marco Antônio Alvarenga

Coorientador: Luciano Andrade Silva

Capes: 50504002

1. Égua - Reprodução. 2. Hormônios. 3. Doppler, Ultrassonografia. 4. Perfusão. 5. Arginina. 6. Biotecnologia animal.

Palavras-chave: Arginina; Doppler; Égua; Senilidade; Vascularização.

Nome do autor: Hélène Lacerda de Resende

Título: Comparação da perfusão vascular folicular, luteal, uterina e perfil hormonal plasmático entre éguas jovens e idosas suplementadas ou não com L-Arginina.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Marco Antonio Alvarenga**

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

---

**Frederico Ozanam Papa**

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

---

**Julio Cesar Ferraz Jacob**

Membro

Departamento de Reprodução e Avaliação Animal

Instituto de Zootecnia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –  
Seropédica

Data da defesa: 15 de janeiro de 2014.

*“Senhor, dai-me serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar; dai-me coragem para mudar aquelas que eu posso, e principalmente, dai-me sabedoria para distinguir uma da outra.” Oração da Serenidade*

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Penha e Guilherme, com todo meu amor e gratidão,  
por todo apoio, incentivo e amor dedicado a mim.  
Vocês me fazem FELIZ!*

## *Agradecimentos*

Primeiramente agradeço à Deus, por sempre me amparar e se mostrar presente em minha vida, especialmente nas horas mais difíceis, renovando minha fé.

Ao meu orientador, Professor Marco Antonio Alvarenga, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Por todo auxílio, incentivo e orientação durante essa caminhada.

Ao meu co-orientador, Professor Luciano Andrade Silva, por sua disposição à ajudar e por todo auxílio com o Doppler.

Aos meus pais, Penha e Guilherme, por serem meu porto seguro onde eu sempre encontrarei colo. Obrigada por me apoiarem e tornarem meu sonho realidade. Graças à vocês eu sou feliz!

Ao Pedro Paulo, meu amor, pelo apoio durante toda a minha caminhada tornando-a mais fácil. Obrigada por sempre estar ao meu lado!

À Heloísa, por toda orientação, ajuda, discussão, conselhos e conversas. Não tenho palavras para agradecer toda a sua ajuda, essa dissertação também é sua.

Ao Carlinhos, por todo companheirismo, ajuda, conversas, brincadeiras e pelo suporte durante o experimento, não foi fácil eu sei!

Ao Fábio, por toda ajuda com o Doppler e com a estatística. Por estar sempre pronto para me socorrer.

Ao Juliano, pela ajuda com o PCR, conselhos e acolhida no Colorado.

Aos professores Elaine Carnevale e Gerrit Bouma da *Colorado State University* pelo auxílio na realização do PCR.

A professora Janet Roser da *University of California* pela realização das dosagens hormonais.

A Lil por toda ajuda e paciência nas dosagens hormonais.

A professora Maria Clara Bussiere da Universidade Estadual do Norte Fluminense pelas dosagens do óxido nítrico.

A todos estagiários, sem vocês seria impossível realizar esse experimento. Meu muito obrigada a cada um de vocês: Leandro, Jordana, João, Gabriela, Rossana, Karina, Fabiane, Bruno, Alexandre, Daniel, Priscila, Pollyanna, Isis, Susana, Manuella, Henrique, Mayara, Anderson, Victor, Jéssica e Fernanda.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ pela colaboração e conhecimento transmitido. Especialmente ao Prof. Frederico Ozanam Papa, por compartilhar a sua experiência, pelo auxílio e principalmente por abrir as portas do Ceran para mim.

Aos pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ pela ajuda, amizade e momentos inesquecíveis.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Júlio, Três, Vera e Marco, por participarem do meu crescimento profissional e pessoal. Saudades de todos da minha linda Rural.

À Priscilla, por todo incentivo para eu vir para Botucatu, pela acolhida, pela amizade e risadas.

Às éguas, a razão de eu estar aqui, por serem tão especiais e por terem sempre algo a nos ensinar.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro ao projeto.

Muito obrigada!

## LISTA DE TABELAS

## Página

**Tabela 1:** Média  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) da artéria ovariana ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, e perfusão vascular folicular subjetiva (PVF), dos três dias que antecederam a ovulação dos grupos de éguas jovens e idosas nos ciclos controle e tratado com arginina. .... 37

**Tabela 2:** Média  $\pm$  EPM do tamanho folicular, dos três dias que antecederam a ovulação dos grupos de éguas jovens e idosas nos ciclos controle e tratado com arginina. .... 37

## LISTA DE FIGURAS

Página

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1:</b> Imagem ultrassonográfica no modo Doppler espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O posicionamento do cursor Doppler está sobre o lúmen do vaso sanguíneo obtendo um gráfico espectral. A velocidade máxima é representada pelo pico sistólico (PSV) e a velocidade final de um ciclo cardíaco é representada pela velocidade diastólica final (EDV). <b>Fonte:</b> Ferreira et al., 2011. .... | 5  |
| <b>FIGURA 2:</b> Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria ovariana, em corte transversal do pedículo ovariano de égua. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. ....                                                                                                                                                                                                                   | 6  |
| <b>FIGURA 3:</b> Exame ultrassonográfico Doppler modo colorido. Corte transversal do folículo de égua, mostrando a perfusão vascular através dos sinais coloridos. <b>Fonte:</b> Gastal et al., 2006. ....                                                                                                                                                                                                                          | 7  |
| <b>FIGURA 4:</b> Exame ultrassonográfico Doppler modo colorido. Corte transversal do corpo lúteo de égua, mostrando a perfusão vascular através dos sinais coloridos. <b>Fonte:</b> McKinnon et al., 2011. ....                                                                                                                                                                                                                     | 8  |
| <b>FIGURA 5:</b> Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria uterina, em corte transversal do corno uterino de égua. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. ....                                                                                                                                                                                                                        | 9  |
| <b>FIGURA 6:</b> Média $\pm$ EPM dos valores da concentração plasmática de P4, área do CL, e percentual da área vascularizada do CL. Os asteriscos indicam valores médios do início ( $p < 0,05$ ) de um aumento ou decréscimo para cada ponto. 0 = dia da ovulação. <b>Fonte:</b> Adaptado de Ginther et al., 2007a. ....                                                                                                          | 11 |
| <b>FIGURA 7:</b> Média $\pm$ SD do índice de pulsatilidade (PI) encontrados nas artérias uterinas dominante (●) e não dominante (○) ao longo de dois ciclos estrais de éguas. <b>Fonte:</b> Adaptado de Bollwein et al. (2002a). ....                                                                                                                                                                                               | 13 |
| <b>FIGURA 8:</b> Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria ovariana, em corte transversal do pedículo ovariano de égua. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. ....                                                                                                                                                                                                                   | 28 |
| <b>FIGURA 9:</b> Exame ultrassonográfico modo color Doppler de folículos pré-ovulatórios de éguas. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular folicular, em uma classificação de 0 a 100%, onde A=10%, B= 20% e C=30% da parede folicular com pontos Doppler coloridos. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. ....                                                                                     | 28 |
| <b>FIGURA 10:</b> Exame ultrassonográfico modo color Doppler de corpos lúteos de éguas. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular luteal, em uma classificação de 0 a 100%, onde A=10%, B= 20% e C=50% do tecido luteal com pontos Doppler coloridos. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. ....                                                                                                      | 29 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 11:</b> Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria uterina, em corte transversal do corno uterino de égua. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal. ....                                                                                                                                                  | 30 |
| <b>FIGURA 12:</b> Exame ultrassonográfico modo color Doppler em corte transversal do corno uterino de éguas não gestantes. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular uterina, em um escore de classificação de 1 a 4, indicando 1=mínima, 2,5=moderada e 4,0=máxima perfusão vascular. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal..... | 30 |
| <b>FIGURA 13:</b> Médias $\pm$ EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e índices de resistência (RI), da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo, durante o início do diestro de éguas jovens e idosas, nos ciclos controle e tratado com arginina.....                                                                                                      | 38 |
| <b>FIGURA 14:</b> Médias $\pm$ EPM dos índices de pulsatilidade (PI) da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo, durante o início do diestro de éguas jovens e idosas tratadas com arginina. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ ). ....                                                                               | 39 |
| <b>FIGURA 15:</b> Médias $\pm$ EPM dos índices de resistência (RI) da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo, durante o início do diestro de éguas jovens e idosas tratadas com arginina. Asterisco (*) indica diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ )......                                                                                   | 40 |
| <b>FIGURA 16:</b> Médias $\pm$ EPM da perfusão vascular luteal subjetiva (PVCL), classificada em escala de 0 à 100%, por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler do corpo lúteo, durante o início do diestro, de éguas jovens e idosas, nos ciclos controle e tratado com arginina. ....                                                                   | 41 |
| <b>FIGURA 17:</b> Médias $\pm$ EPM da perfusão vascular luteal subjetiva (PVCL), classificada em escala de 0 à 100%, por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler do corpo lúteo, durante o início do diestro, de éguas idosas nos ciclos controle e tratado com arginina. Asterisco (*) indica diferença estatística entre os ciclos ( $p<0,05$ )......    | 42 |
| <b>FIGURA 18:</b> Médias $\pm$ EPM da área luteal (mm <sup>2</sup> ) avaliada por meio da ultrassonografia do corpo lúteo, durante o início do diestro, de éguas jovens e idosas, nos ciclos controle e tratado com arginina. ....                                                                                                                             | 43 |
| <b>FIGURA 19:</b> Médias $\pm$ EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) das artérias uterinas, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, considerando D0 o dia da ovulação. ....                                                                                         | 44 |
| <b>FIGURA 20:</b> Médias $\pm$ EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) das artérias uterinas, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ )......                       | 44 |
| <b>FIGURA 21:</b> Médias $\pm$ EPM dos índices de pulsatilidade (PI) das artérias uterinas, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral de éguas jovens e idosas tratadas com arginina, considerando D0 o dia da ovulação. Asterisco (*) indica diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ ). ....                                                            | 45 |

**FIGURA 22:** Médias  $\pm$  EPM da perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), classificada em um escore de 1 a 4, por meio da ultrassonografia Doppler dos cornos uterinos, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, considerando D0 o dia da ovulação..... 46

**FIGURA 23:** Médias  $\pm$  EPM da perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), classificada em um escore de 1 a 4, por meio da ultrassonografia Doppler dos cornos uterinos, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 47

**FIGURA 24:** Médias  $\pm$  EPM do grau de edema, classificada em um escore de 0 a 4, por meio da ultrassonografia dos cornos uterinos, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, considerando D0 o dia da ovulação. .... 48

**FIGURA 25:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de FSH do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. .... 49

**FIGURA 26:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de LH do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. .... 50

**FIGURA 27:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de P4 do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. .... 50

**FIGURA 28:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de E2 do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. .... 51

**FIGURA 29:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de FSH, LH, P4 e E2, do ciclo controle de éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 52

**FIGURA 30:** Médias  $\pm$  EPM da concentração de óxido nítrico mensurada no fluido uterino livre dos ciclos controle e tratado com arginina de éguas jovens e idosas no D8 pós ovulação..... 53

## SUMÁRIO

|                                                                               | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO.....                                                                   | xiii   |
| ABSTRACT.....                                                                 | xiv    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                           | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                | 3      |
| 2.1. Ultrassonografia Doppler.....                                            | 3      |
| 2.1.1. Avaliação ovariana por meio da ultrassonografia Doppler.....           | 6      |
| 2.1.2. Avaliação uterina por meio da ultrassonografia Doppler.....            | 8      |
| 2.2. Hemodinâmica do Sistema Reprodutivo .....                                | 9      |
| 2.2.1. Perfusão vascular folicular.....                                       | 9      |
| 2.2.2. Perfusão vascular luteal.....                                          | 10     |
| 2.2.3. Perfusão vascular uterina .....                                        | 12     |
| 2.3. Características Reprodutivas de Éguas Idosas.....                        | 14     |
| 2.4. Aminoácido L-Arginina e a perfusão vascular do Sistema Reprodutivo ..... | 17     |
| 3. OBJETIVOS .....                                                            | 22     |
| 4. MATERIAL e MÉTODOS.....                                                    | 23     |
| 4.1. Animais .....                                                            | 23     |
| 4.2. Delineamento experimental.....                                           | 23     |
| 4.3. Avaliação por meio da ultrassonografia Doppler .....                     | 27     |
| 4.4. Coleta de sangue .....                                                   | 31     |
| 4.5. Análises hormonais.....                                                  | 31     |
| 4.5.1. FSH.....                                                               | 31     |
| 4.5.2. LH .....                                                               | 32     |
| 4.5.3. E2.....                                                                | 32     |
| 4.5.4. P4.....                                                                | 33     |
| 4.6. Colheita de material uterino .....                                       | 33     |
| 4.7. Dosagem de óxido nítrico.....                                            | 34     |
| 4.8. Análise estatística .....                                                | 35     |
| 5. RESULTADOS .....                                                           | 36     |
| 5.1. Perfusão vascular folicular .....                                        | 36     |
| 5.2. Perfusão vascular luteal.....                                            | 38     |
| 5.3. Perfusão vascular uterina.....                                           | 43     |
| 5.4. Dosagens hormonais .....                                                 | 48     |
| 5.5. Dosagem de óxido nítrico.....                                            | 53     |
| 5.6. Correlação entre as variáveis resposta .....                             | 53     |
| 5.6.1. US Doppler x perfil hormonal .....                                     | 53     |
| 5.6.2. Concentração de óxido nítrico x US Doppler .....                       | 54     |
| 6. DISCUSSÃO .....                                                            | 55     |
| 7. CONCLUSÃO.....                                                             | 63     |
| 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....                                              | 64     |
| 9. TRABALHO CIENTÍFICO .....                                                  | 81     |
| 9.1. Trabalho enviado para revista “Veterinária e Zootecnia” .....            | 81     |
| 9.2. Normas da revista “Veterinária e Zootecnia” .....                        | 92     |

|                  |    |
|------------------|----|
| 10. ANEXOS ..... | 97 |
|------------------|----|

RESENDE, H.L. **Comparação da perfusão vascular folicular, luteal, uterina e perfil hormonal plasmático entre éguas jovens e idosas suplementadas ou não com L-arginina.** Botucatu, 2014. 103p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

A perfusão vascular do folículo pré-ovulatório vem sendo positivamente correlacionada com a fertilidade. De forma similar, o aumento da perfusão vascular do útero pode resultar em menores taxas de perda embrionária. A ultrassonografia Doppler permite uma avaliação não invasiva e em tempo real da hemodinâmica de tecidos e órgãos. Estudos recentes em éguas, assim como em outras espécies, demonstraram que o aminoácido L-arginina (Arg) aumenta a perfusão vascular do sistema reprodutivo. Os objetivos do presente estudo foram: a) comparar a perfusão vascular folicular, luteal e uterina e o perfil hormonal entre éguas jovens e idosas; b) avaliar o efeito da suplementação do aminoácido L-arginina sobre a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, e sobre o perfil hormonal de éguas de diferentes idades. Para tanto, foram utilizadas 10 éguas jovens (4-10 anos de idade) e 12 éguas idosas ( $\geq 20$  anos). Amostras de sangue foram coletadas diariamente para análise de FSH, LH, P4 e E2, por radioimunoensaio. A perfusão vascular folicular, luteal e uterina não diferiu entre éguas jovens e idosas no ciclo controle. As concentrações plasmáticas de FSH e LH foram maiores em éguas jovens; as concentrações plasmáticas de P4 foram superiores em éguas idosas, e não houve diferença nas concentrações plasmáticas de E2 entre os grupos no ciclo controle. A suplementação com o Arg apresentou um efeito positivo na vascularização uterina de éguas jovens entre o D-1 e D3 e no D6, e na vascularização do CL de éguas idosas no D8. Conclui-se que a suplementação com Arg não apresentou efeito, na maioria dos parâmetros avaliados sobre a perfusão vascular folicular, luteal e uterina tanto de éguas jovens como de idosas, tendo sido observado um efeito positivo em alguns momentos na perfusão vascular uterina de éguas jovens, e na perfusão vascular luteal de éguas idosas. A suplementação com Arg também apresentou um efeito positivo sobre o perfil hormonal das éguas.

**Palavras-chave:** Doppler, vascularização, arginina, égua e senilidade.

RESENDE, H.L. **Comparison of follicular, luteal, uterine vascular perfusion and plasmatic hormonal profile between young and old mares supplemented or not with L-arginine.** Botucatu, 2014. 103p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Vascular perfusion of preovulatory follicles has been positively correlated with the fertility. Similarly, increased uterine vascular perfusion can result in lower rates of embryonic loss. Doppler ultrasonography allows a noninvasive and real-time hemodynamic assessment of tissues and organs. Recent studies in mares, as well as in other species, have demonstrated that the amino acid L-arginine (Arg) increases vascular perfusion of the reproductive system. The aims of this study were: a) to compare follicular, luteal and uterine vascular perfusion and hormonal profile between young and old mares; b) to evaluate the effect of supplementation of the amino acid L-arginine on the follicular, luteal and uterine vascular perfusion and on the hormonal levels of mares of different ages. For this, 10 young mares (4-10 years old) and 12 old mares ( $\geq 20$  years) were used. Blood samples were collected daily for analysis of FSH, LH, E2 and P4 by RIA. The follicular, luteal and uterine blood flow did not differ between young and old mares in the control cycle. Plasma concentrations of FSH and LH were higher in young mares; P4 plasma concentrations were higher in older mares, and there was no difference in plasma concentrations of E2 between groups in the control cycle. Arg supplementation had a positive effect on the uterine vascularization of young mares between the D-1 and D3 and D6, and CL vascularization of the old mares in the D8. In conclusion, supplementation with Arg had no effect on most parameters assessed related with follicular, luteal and uterine vascular perfusion in both young and old mares, however a positive effect have been observed in some moments in uterine vascular perfusion of young mares and in the luteal vascular perfusion of old mares. Supplementation with Arg also had a positive effect on hormonal status of the mares.

**Keywords:** Doppler, vascularization, arginine, mare and senility.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitas são as inovações tecnológicas que permitem o avanço diagnóstico e terapêutico na Medicina Veterinária. A ultrassonografia em escala cinza (modo-B) revolucionou o diagnóstico e monitoramento dos eventos reprodutivos fisiológicos e patológicos em equinos, tanto na clínica como na pesquisa. A ultrassonografia Doppler é um método recente e emergente na Medicina Veterinária e vem sendo aplicada com sucesso na reprodução equina. A ferramenta Doppler associada à ultrassonografia convencional fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos, além de ser um método de diagnóstico não invasivo.

A ultrassonografia Doppler via transretal vem sendo utilizada em estudos clínicos da hemodinâmica ovariana e uterina em grandes animais (BOLLWEIN et al., 2002a; GINTHER & UTT, 2004; GINTHER, 2007).

A perfusão vascular do folículo pré-ovulatório apresentou uma associação positiva com o estabelecimento da gestação em éguas (SILVA et al., 2006). Da mesma forma, o aumento da perfusão vascular luteal foi relacionado ao desenvolvimento estrutural e funcional do corpo lúteo (GINTHER et al., 2007a). Ao passo que a perfusão vascular uterina tem um padrão ondular, com picos de irrigação entre os dias 4 e 6 após ovulação e no estro (BOLLWEIN et al., 2002a).

Em função do melhoramento genético lento na espécie equina, o plantel em atividade reprodutiva é composto, em grande parte, por animais idosos. Adicionalmente, a seleção nesta espécie não é realizada baseando-se nos critérios de fertilidade, e o alto valor da prole faz com que muitas éguas permaneçam em programas de reprodução assistida, mesmo com idade avançada, reduzindo os índices de fertilidade do plantel.

O declínio da fertilidade relacionado à idade em fêmeas tem pelo menos dois componentes básicos: a diminuição da taxa de gestação por ciclo e aumento das taxas de morte embrionária e abortamento. As éguas senis possuem uma reduzida população de folículos antrais (CARNEVALE, 2008), um prolongado período interovulatório (CARNEVALE et al., 1993a), e baixas concentrações plasmáticas de LH comparado à éguas jovens (JACOB, 2007), podendo estas serem algumas das

prováveis explicações para estes resultados insatisfatórios, como a queda da fertilidade.

A sub ou infertilidade foi associada a uma menor perfusão vascular uterina, onde éguas com fertilidade normal tiveram maior irrigação uterina comparada com as éguas sub ou inférteis (ESTELLER-VICO et al., 2010).

Adicionalmente, as éguas idosas podem apresentar uma maior porcentagem de deformidades anatômicas, prejudiciais para reprodução, como má coaptação e conformação de vulva. Além de serem mais susceptíveis a endometrite pós-cobertura, devido à falhas no processo de limpeza uterina e drenagem linfática (TROEDSSON et al., 1993).

A L-Arginina (Arg) é um aminoácido, sendo um dos aminoácidos essenciais na nutrição equina (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). A conversão da L-arginina em L-citrulina resulta na produção de óxido nítrico (NO) entre outros compostos (ROSSELLI et al., 1998). O NO é um potente vasodilatador e um mediador essencial para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e manutenção da função, do tônus e integridade vascular (SYNDER, 1995; JAROSZEWSKI et al., 2001; ALBRECHT et al., 2003). A suplementação de Arg tem demonstrado melhorar as funções reprodutiva, cardiovascular, pulmonar, renal, hepática, gastrointestinal e funções imunológicas em várias espécies (WU et al., 2009). No sistema reprodutivo, Battaglia et al. (1999) observaram que mulheres tratadas com Arg tiveram melhor resposta ao tratamento superovulatório com maior número de oócitos e embriões, além do aumento da perfusão vascular uterina, sugerindo uma melhor receptividade do útero ao embrião.

Em éguas, este aminoácido acelerou a involução uterina no puerpério, além de um aumento na perfusão vascular do útero e do folículo dominante, quando comparadas as éguas não suplementadas (MORTENSEN et al., 2011; KELLEY et al., 2013).

Em função do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, por meio da ultrassonografia Doppler, e o perfil hormonal (LH, FSH, E2 e P4) de éguas jovens e idosas; assim como avaliar o efeito da suplementação diária com o aminoácido L-arginina sobre a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, e perfil hormonal (LH, FSH, E2 e P4) de éguas jovens e idosas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ultrassonografia Doppler

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

Esta técnica é fundamentada no efeito Doppler, que se baseia em alterações nas frequências das ondas emitidas ou refletidas por um objeto em movimento, em relação a um observador estático (GINTHER & UTT, 2004). Na ultrassonografia, as hemácias são os corpos refletores em movimento e o transdutor corresponde ao observador. Deste modo, conforme a velocidade e a direção das hemácias mudam, as imagens ultrassonográficas apresentam cores e tonalidades diferentes (FEIGENBAUM, 1986; VERMILLON, 1997).

A ultrassonografia Doppler envolve duas modalidades, o Doppler espectral e o colorido, com avaliações diferentes da área de interesse.

No modo espectral ou pulsado, as informações do fluxo sanguíneo em função do tempo são demonstradas na forma de um gráfico, onde o eixo horizontal representa o tempo e o eixo vertical a frequência de deslocamento Doppler (FINN-BODNER & HUDSON, 1998; CARVALHO, 2009). Neste gráfico, a linha de base horizontal representa o fluxo zero, o fluxo em direção ao transdutor é representado acima da linha de base e abaixo desta linha é demonstrado o fluxo em direção oposta (FINN-BODNER & HUDSON, 1998; SZATMÁRI et al., 2001).

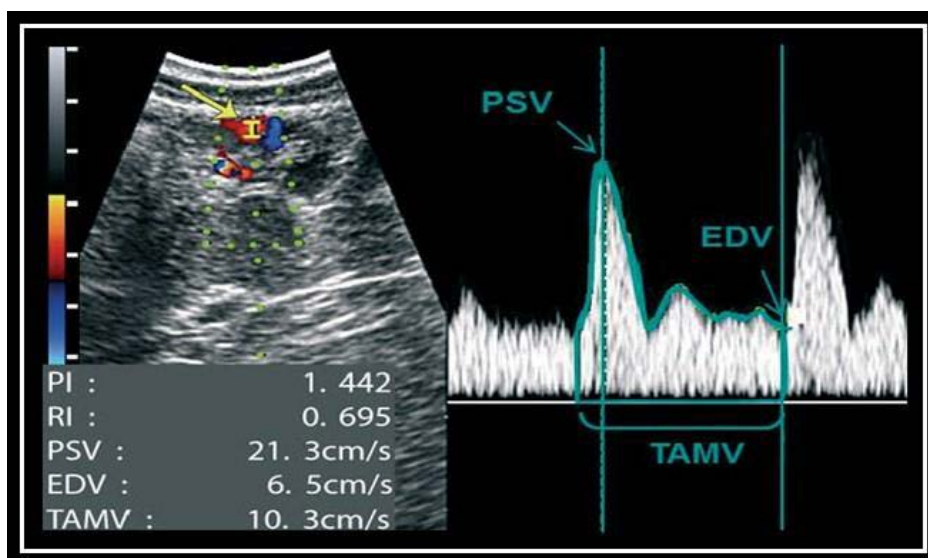
A análise quantitativa da onda espectral é baseada na mensuração das velocidades do fluxo sanguíneo de uma artéria específica: velocidade de pico sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV) e velocidade máxima média

(TAMV). O valor máximo ao longo do gráfico espectral é representado pelo PSV, a velocidade final de um ciclo cardíaco é representada pelo EDV e a média de todas as velocidades máximas de um ciclo cardíaco é indicada pelo TAMV (GINTHER, 2007).

Utilizando os valores das velocidades de fluxo sanguíneo é possível determinar os índices hemodinâmicos: índice de pulsatilidade (PI) e índice de resistência (RI). O PI possibilita a avaliação da resistência vascular (CERRI et al., 1996), enquanto o RI é um valor adimensional, que representa a resistência encontrada pelo fluxo sanguíneo durante a perfusão de um determinado órgão (RIVERS et al., 1996; SHOKEIR et al., 2002). Estes índices expressam a relação entre a extensão da resistência (RI) e extensão da perfusão vascular (PI), e apresentam uma relação inversamente proporcional com a perfusão vascular (ACOSTA et al., 2004a; GINTHER & UTT, 2004).

No Doppler espectral, as características do fluxo sanguíneo de um determinado vaso são acessadas por meio do posicionamento de um cursor de volume de amostra (*gate*) sobre o lúmen do vaso, sendo gerado o gráfico espectral (Figura 1; GINTHER & UTT, 2004).

As velocidades do fluxo sanguíneo são calculadas considerando-se, além do efeito Doppler, o ângulo Doppler, que é formado entre o eixo do vaso e da onda sonora. Assim, para adquirir uma imagem de qualidade, o posicionamento do transdutor é importante, preconizando-se a utilização de um ângulo Doppler entre 30° e 60° (GINTHER & UTT, 2004). No entanto, este ângulo é praticamente impossível de ser determinado em vasos tortuosos e de baixo calibre, como os encontrados no sistema reprodutivo. Deste modo, somente os índices Doppler (RI e PI) são utilizados, uma vez que não sofrem interferência do ângulo Doppler (SILVA et al., 2005).



**FIGURA 1:** Imagem ultrassonográfica no modo Doppler espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O posicionamento do cursor Doppler está sobre o lúmen do vaso sanguíneo obtendo um gráfico espectral. A velocidade máxima é representada pelo pico sistólico (PSV) e a velocidade final de um ciclo cardíaco é representada pela velocidade diastólica final (EDV). **Fonte:** Ferreira et al., 2011.

No Doppler colorido, diferentemente do Doppler espectral, o volume da amostra dentro de uma região circunscrita (caixa colorida) é maior. Cada sinal obtido passa por um processamento isolado que é codificado por cores em relação ao sentido do movimento e da velocidade de cada ponto analisado. Sobre a imagem em modo-B é apresentada uma outra imagem, colorida, que representa um mapeamento dos elementos móveis em relação à intensidade e ao sentido do movimento (KAWAKAMA et al., 1993). Por convenção, o fluxo que se direciona ao sentido do transdutor é representado em vermelho, enquanto o fluxo que se afasta em azul (FINN-BODNER & HUDSON, 1998; SZATMÁRI et al., 2001). Os fluxos mais rápidos apresentam tonalidades mais claras, como amarelo e laranja em direção ao transdutor, ou tons de azul claro e verde, quando em sentido contrário (CARVALHO et al., 2008).

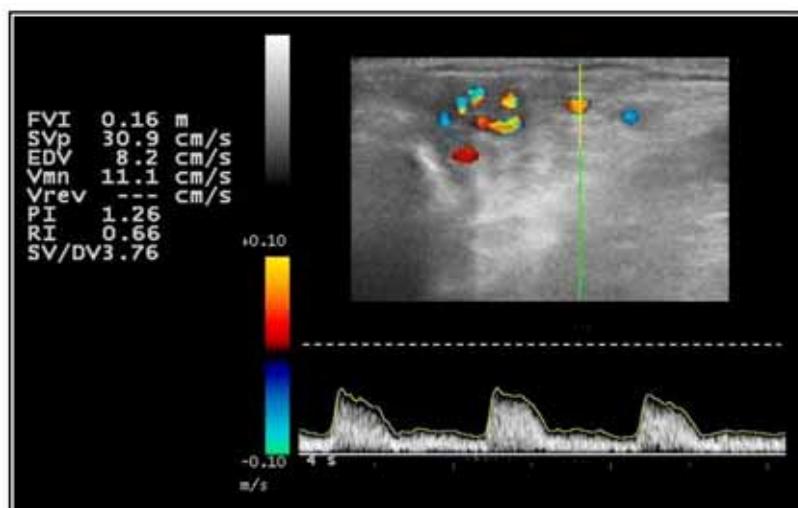
No *Power Doppler* a imagem obtida é semelhante ao Doppler colorido, entretanto a movimentação do fluxo sanguíneo é processada utilizando apenas uma escala de cor, laranja, e a intensidade dos pontos coloridos variam de acordo

com a força dos sinais Doppler (número de hemácias movendo-se em uma velocidade específica) (SZATMÁRI et al., 2001).

### 2.1.1. Avaliação ovariana por meio da ultrassonografia Doppler

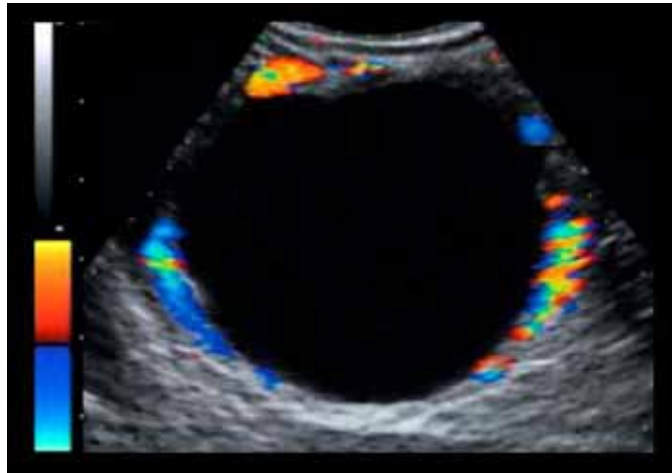
Em equinos, a camada medular do ovário e sua extensão vascular se encontram na porção externa, enquanto o córtex, onde há o crescimento folicular, é interno, exceto no ponto onde atinge a superfície, denominado fossa de ovulação, sendo esta oposta à fixação do mesovário na curvatura dorsal (GINTHER, 2007).

A perfusão vascular ovariana pode ser avaliada de forma objetiva e subjetiva. A primeira utiliza-se do modo Doppler espectral da artéria ovariana, localizada no pedículo ovariano, sendo este caracterizado por um conglomerado de vasos adjacentes ao ovário em sua porção lateral (Figura 2; BOLLWEIN et al., 2002a). Devido ao pequeno calibre e tortuosidade desta artéria, são utilizados apenas os índices Doppler (PI e RI), por não sofrerem influência do ângulo Doppler, como citado anteriormente (GINTHER, 2007).



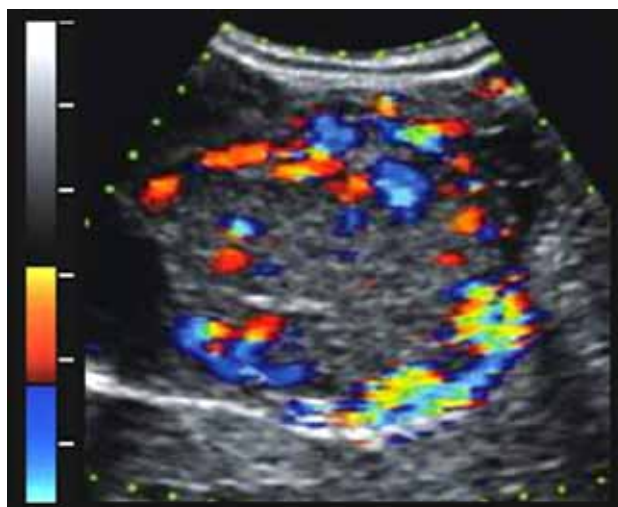
**FIGURA 2:** Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria ovariana, em corte transversal do pedículo ovariano de égua. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A análise subjetiva da perfusão vascular folicular utiliza o Doppler colorido, avaliando, em tempo real, a porcentagem da parede folicular que apresenta sinais Doppler coloridos (Figura 3; GASTAL et al., 2006; GINTHER, 2007).



**FIGURA 3:** Exame ultrassonográfico Doppler modo colorido. Corte transversal do folículo de égua, mostrando a perfusão vascular através dos sinais coloridos. **Fonte:** Gastal et al., 2006.

Da mesma forma, o corpo lúteo (CL) pode ser avaliado em tempo real de forma subjetiva, levando-se em consideração a porcentagem da área luteinizada com sinais Doppler coloridos (Figura 4; GINTHER & UTT, 2004). Adicionalmente, as imagens mais representativas do exame, caracterizadas por apresentarem maior quantidade de pixels coloridos em sua maior área luteal, podem ser selecionadas e o número total de pixels coloridos contados utilizando-se *softwares* específicos. (BOLLWEIN et al., 2002b).

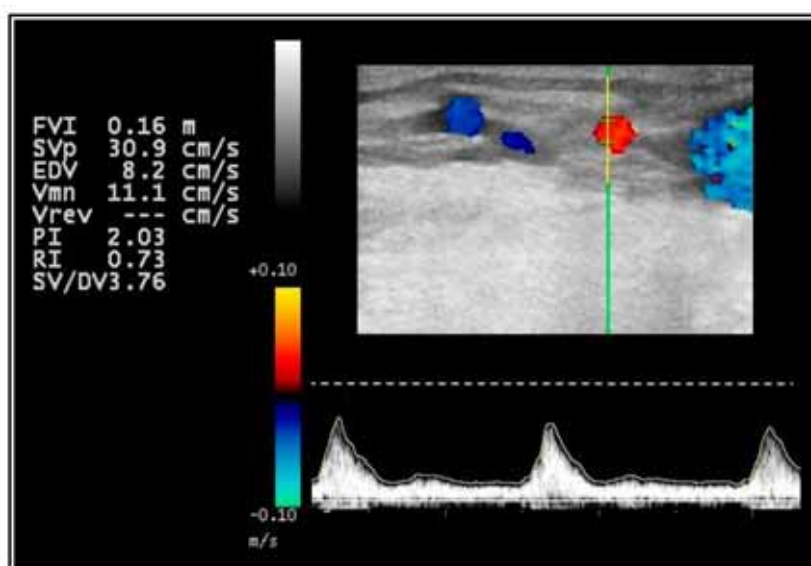


**FIGURA 4:** Exame ultrassonográfico Doppler modo colorido. Corte transversal do corpo lúteo de égua, mostrando a perfusão vascular através dos sinais coloridos. **Fonte:** Mckinnon et al., 2011.

#### 2.1.2. Avaliação uterina por meio da ultrassonografia Doppler

Similarmente à avaliação ovariana, a perfusão vascular uterina pode ser analisada de forma subjetiva e objetiva. A análise subjetiva é estimada de acordo com o número de sinais Doppler coloridos presentes no endométrio, miométrio e mesométrio. A classificação é realizada em escores de 1 a 4, indicando mínima e máxima vascularização, respectivamente, durante exame contínuo de no mínimo um minuto (SILVA et al., 2005). Adicionalmente, similar ao utilizado para CL, pode ser realizada a contagem de pixels das imagens mais representativas de cada exame (SILVA et al., 2005).

A análise objetiva da perfusão vascular uterina se faz por meio do modo Doppler espectral, onde são utilizados, assim como na avaliação objetiva ovariana, apenas os índices Doppler. Esta avaliação pode ser realizada em dois locais distintos: em vasos de grande calibre (artéria uterina), como descrito por Bollwein et al. (1998; Figura 5), ou em vasos locais de pequeno calibre presentes no mesométrio (SILVA et al., 2005).



**FIGURA 5:** Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria uterina, em corte transversal do corno uterino de égua. **Fonte:** Arquivo pessoal.

## 2.2. Hemodinâmica do Sistema Reprodutivo

### 2.2.1. Perfusão vascular folicular

A hemodinâmica folicular ainda não foi totalmente caracterizada ao longo de todo o ciclo estral em equinos, e quando o folículo pré-ovulatório é o foco dos estudos ainda são encontradas controvérsias entre os autores. De acordo com Acosta et al. (2004a), dois dias antes do desvio folicular há um aumento da perfusão vascular no futuro folículo dominante, ao passo que há uma diminuição desta nos folículos subordinados, quando analisadas as velocidades (PSV e TAMV) por meio da avaliação Doppler espectral de vasos presentes na parede folicular. Durante a fase de dominância folicular, Gastal et al. (2006) observaram, por meio da avaliação subjetiva, que a perfusão vascular do folículo pré-ovulatório continua a aumentar de acordo com a maturação folicular e atinge valores máximos (80 a 90% da parede folicular com pontos coloridos) entre 36 e 12 horas que antecedem a ovulação. Depois deste período, durante as quatro horas que

antecedem a ovulação, há uma diminuição progressiva da perfusão vascular até o momento da ovulação (GASTAL et al., 2006).

Quando correlacionada a perfusão vascular subjetiva do folículo pré-ovulatório com a taxa de gestação em éguas, Silva et al. (2006) observaram que, 30 horas após a indução da ovulação com hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana), o grupo que se tornou gestante apresentava maior perfusão vascular do folículo pré-ovulatório. Neste mesmo momento de avaliação, não foram observadas diferenças nas características da parede folicular à ultrassonografia modo-B entre os animais que se tornaram ou não gestantes.

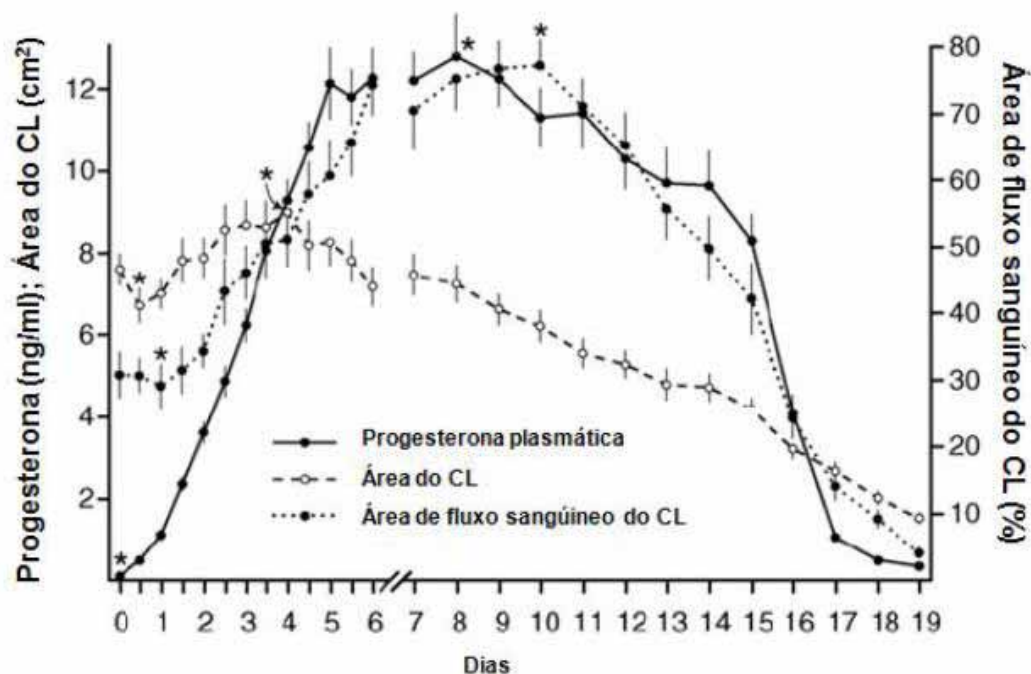
Em outro estudo, Acosta et al. (2004b), avaliaram subjetivamente a perfusão sanguínea de folículos dominantes ovulatórios e anovulatórios, durante o período de transição de primavera. Foi observado que os folículos ovulatórios de 30 mm de diâmetro apresentaram uma área média de fluxo sanguíneo na parede folicular duas vezes maior que os folículos anovulatórios de mesmo diâmetro.

#### 2.2.2. Perfusão vascular luteal

O corpo lúteo (CL) tem sua função dependente do seu suprimento sanguíneo, tanto para a obtenção de precursores esteróides, quanto para a liberação de progesterona (P4) na circulação sanguínea (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

Em éguas já foi demonstrada a relação existente entre a perfusão vascular luteal e o desenvolvimento estrutural e funcional do CL (BOLLWEIN et al. 2002b; GINTHER et al., 2007a). Após a ovulação, a perfusão vascular do CL aumenta de forma constante e progressiva, até envolver praticamente toda sua circunferência, no sexto dia após ovulação (GINTHER et al., 2007a). Durante a fase luteal intermediária (D8 a D14), a perfusão vascular do CL apresenta valores máximos, seguido por uma queda durante o período de luteólise (D15 a D17), caso não haja o reconhecimento materno da gestação (Figura 6; GINTHER et al., 2007a). Ao passo que a produção de P4 também aumenta progressivamente, até o D5, atinge seus níveis plasmáticos mais altos em torno do D8 e cai abruptamente após a luteólise, sendo, desta forma, caracterizada uma relação temporal entre a

vascularização luteal e o desenvolvimento estrutural do CL e a produção de P4 (GINTHER et al., 2007a).



**FIGURA 6:** Média  $\pm$  EPM dos valores da concentração plasmática de P4, área do CL, e percentual da área vascularizada do CL. Os asteriscos indicam valores médios do início ( $p < 0,05$ ) de um aumento ou decréscimo para cada ponto. 0 = dia da ovulação. **Fonte:** Adaptado de Ginther et al., 2007a.

A análise do CL por imunohistoquímica confirmou os achados obtidos por ultrassonografia Doppler. O período entre o D0 e D2 corresponde à luteogênese, apresentando ainda uma vascularização incompleta. Em seguida, ocorre uma invasão das células endoteliais na cavidade do corpo hemorrágico, iniciando o processo de vascularização entre as células luteais. Em torno do D10 há uma completa e densa rede de capilares que, no D14, durante a fase inicial da regressão luteal, apresenta um pequeno decréscimo em sua área e densidade dos micro vasos. Após a luteólise, por volta do D17, já ocorreu a regressão da rede vascular encontrada na fase lútea intermediária (AL-ZI'ABI et al, 2003).

Recentemente, Romano et al. (2012) demonstraram que tanto folículos pré-ovulatórios com baixa quanto com alta perfusão vascular originaram CLs com uma

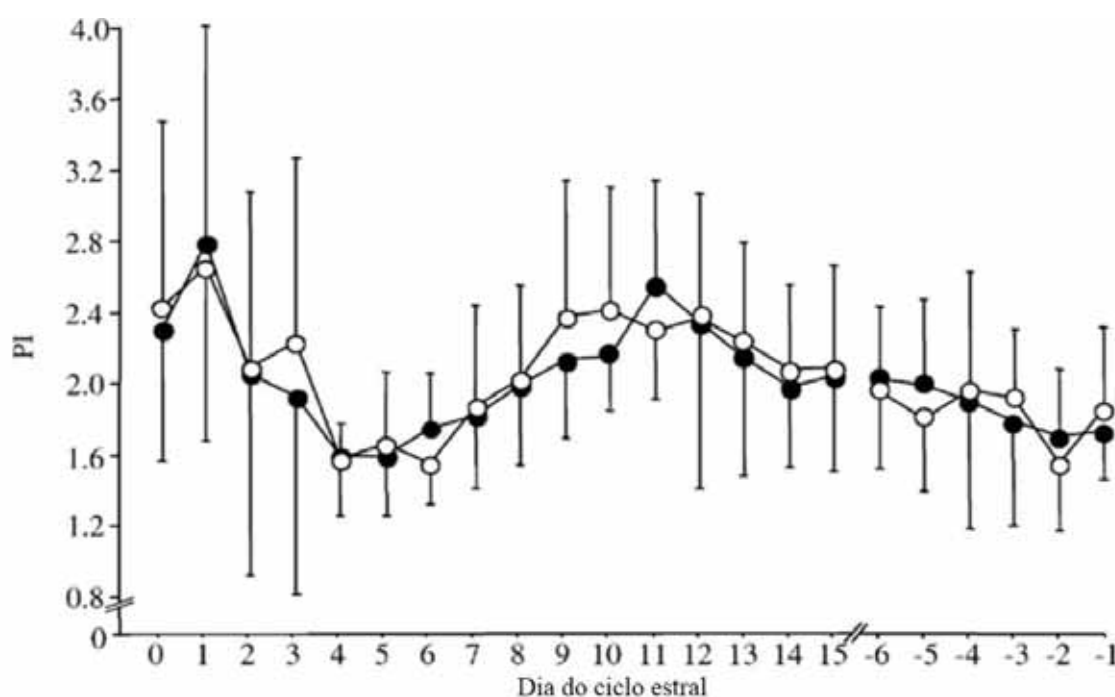
extensa vascularização e produção adequada de P4. Comprovando que o *status* funcional do CL não é afetado pela perfusão vascular do folículo pré-ovulatório que o originou.

Não existe uma relação entre o diâmetro luteal e as mudanças do fluxo sanguíneo da artéria ovariana ipsilateral ao CL, sugerindo que o processo de neovascularização não está associado às dimensões do CL (BOLLWEIN et al, 2002b). Da mesma maneira, Arruda et al. (2001) observaram que não há relação entre a área do CL e a produção de P4.

### 2.2.3. Perfusão vascular uterina

Em éguas, assim como em outras espécies domésticas, não há diferenças no fluxo sanguíneo da artéria uterina ipsi ou contralateral ao folículo pré-ovulatório ou ao corpo lúteo durante todo o ciclo estral (FORD et al., 1979a; BOLLWEIN et al., 1998, 2002, 2004).

A perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral em éguas, por meio da avaliação Doppler espectral da artéria uterina, apresenta um padrão ondular, com valores mínimos no D1 e no D11, e máximos entre D4 e D6 e estro (Figura 7; BOLLWEIN et al., 1998; 2002a; 2004).



**FIGURA 7:** Média  $\pm$  SD do índice de pulsatilidade (PI) encontrados nas artérias uterinas dominante (●) e não dominante (○) ao longo de dois ciclos estrais de éguas. **Fonte:** Adaptado de Bollwein et al. (2002a).

Após a ovulação há uma diminuição da perfusão vascular uterina no D1, seguida por um aumento crescente, com valores máximos entre D4 e D6 após a ovulação. Este aumento indica um maior suprimento sanguíneo do útero, coincidindo com o momento de entrada do embrião no útero. O suprimento sanguíneo do útero é importante para a nutrição do embrião e reconhecimento materno, sendo estas mudanças altamente influentes na perda embrionária precoce em éguas (BOLLWEIN et al., 2002a; 2003;2004).

No final do diestro (D11), há uma diminuição no fluxo sanguíneo da artéria uterina (BOLLWEIN et al., 1998; 2002a; 2004), com valores semelhantes aos encontrados no D0 e D1. Ao passo que no estro há um aumento pré-ovulatório da perfusão vascular (BOLLWEIN et al., 1998; 2002a; 2004).

Uma alta resistência vascular do útero, com consequente diminuição da perfusão vascular, em éguas idosas multíparas demonstrou-se ocorrer devido ao grau de fibrose uterina, podendo ser responsável pela queda na fertilidade nestes animais (BOLLWEIN et al., 1998).

Em um estudo recente, não foi encontrado correlação entre a perfusão uterina e concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona (HONNENS et al., 2011). No entanto, a perfusão vascular uterina durante o ciclo estral foi regulada pela estimulação da óxido nítrico sintase (NOS) mediada pelos hormônios esteróides (E2 e P4) e aumento na expressão do RNAm NOS (HONNENS et al., 2011). Este aumento foi observado em dois momentos: entre os dias 0 e 5 após ovulação, acompanhado da elevação das concentrações de progesterona, e entre o dia 11 ao estro, acompanhado do aumento nas concentrações de estradiol. O E2, assim como a P4, podem causar um relaxamento sistêmico e uterino e aumento do fluxo sanguíneo mediado, principalmente, pelo óxido nítrico (HONNENS et al., 2011).

### 2.3. Características Reprodutivas de Éguas Idosas

O declínio da fertilidade relacionado à idade é composto, basicamente, por dois fatores: diminuição da taxa de concepção por ciclo e aumento das taxas de morte embrionária e aborto nesses animais.

As éguas possuem, em média, 40.000 folículos primordiais e ciclam aproximadamente 25 anos, assim a sua reserva de folículos primordiais poderá se esgotar nesse período. Assume-se que o número de folículos primordiais é finito, uma vez que, até o presente momento, não foi relatada a ocorrência de mitoses em oogônias de potras ou éguas (GINTHER, 1992), porém o número de oócitos primordiais remanescente nos ovários de éguas idosas não foi determinado ainda.

Em éguas idosas observou-se uma redução significativa na população de folículos antrais em desenvolvimento, quando comparadas à éguas jovens, por meio da avaliação ultrassonográfica modo-B (CARNEVALE, 2008). Segundo Ginther et al. (2009), éguas jovens apresentam mais folículos atingindo  $\geq 10$  e  $\geq 15$  mm de diâmetro do que éguas adultas e idosas ( $p < 0,03$ ), durante a fase de crescimento comum; porém não há diferença no número de folículos atingindo  $\geq 20$ ,  $\geq 25$ , e  $\geq 30$  mm entre estes grupos de éguas. Tal observação pode ser uma consequência do grande reservatório de folículos disponíveis para recrutamento nos ovários de éguas jovens (GINTHER et al., 2009).

Os períodos interovulatórios encontrados para éguas jovens e com idade intermediária foi menor ( $p < 0,05$ ) do que para as éguas idosas (CARNEVALE et al., 1993a). O longo período interovulatório pode ser devido ao prolongado período da indução da luteólise até a ovulação e, conseqüentemente, ao prolongamento da fase folicular (CARNEVALE et al., 1993a). Similarmente, Vanderwall et al. (1993) observaram um prolongado período interovulatório em éguas idosas (16-20 anos) comparado à éguas jovens (entre 10 e 11 anos de idade). O tempo prolongado para a ovulação parece ser devido, ao menos em parte, ao menor tamanho folicular ou menor número de folículos no momento da luteólise no grupo das idosas.

Em contrapartida, Jacob (2007) não observou diferença na taxa de crescimento folicular entre éguas velhas e de meia idade, no entanto éguas jovens apresentaram maior taxa de crescimento ( $p < 0,05$ ), mesmo não havendo diferenças no diâmetro do maior folículo. Da mesma forma, Carnevale et al. (1993a) e Ginther et al. (2009) observaram que a taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório durante os cinco dias anteriores a ovulação foi maior em éguas jovens quando comparadas à éguas idosas, não havendo diferença no diâmetro do folículo pré-ovulatório no dia anterior a ovulação entre os grupos. Por outro lado, Davies Morel et al. (2010) demonstraram que a idade da égua apresenta um efeito negativo na média do diâmetro folicular ( $p < 0,001$ ), com o tamanho do folículo diminuindo 0,935 mm a cada três anos de idade.

Recentemente, Altermatt et al. (2012) por avaliação objetiva do ovário e subjetiva do folículo, observaram que a vascularização folicular foi maior em éguas velhas ( $37,5 \pm 1,6$ ) do que em éguas jovens ( $30,3 \pm 1,4$ ), o que contradiz estudos realizados em mulheres, onde foi observada uma diminuição da vascularização ovariana com o aumento da idade (KUPESIC et al., 2003; NG et al., 2004; COSTELLO et al., 2006).

O sinal inicial da senilidade reprodutiva em éguas é o começo da redução na ciclicidade reprodutiva com elevadas concentrações de FSH. Propõe-se que as alterações hormonais sejam reflexo das secreções ovarianas alteradas de hormônios moduladores do FSH, como o estradiol e a inibina. A máxima

concentração de FSH durante a fase de crescimento foi menor nas éguas jovens comparada às éguas idosas, podendo ser efeito da maior secreção de inibina por um maior número de folículos em crescimento nos ovários de éguas jovens (CARNEVALE et al., 1994).

As concentrações de LH em éguas velhas ( $\geq 20$  anos) apresentam-se menores durante o período ovulatório (JACOB, 2007), podendo refletir no prolongamento da fase folicular (CARNEVALE et al., 1993a), porém estes baixos valores hormonais não alteraram o processo de ovulação (JACOB, 2007). Adicionalmente, no mesmo trabalho não foi encontrado efeito da idade nas concentrações sistêmicas de FSH, progesterona e estrógeno.

A produção insuficiente de P4 pode ser a razão da morte embrionária em éguas idosas, devido ao fato destes animais necessitarem de maiores concentrações hormonais para o estabelecimento e manutenção da gestação (GINTHER, 1992). Mesmo o LH sendo necessário para estimulação luteal (GINTHER, 1992), baixas concentrações de LH em éguas idosas não resultaram em baixas concentrações de P4 (JACOB, 2007). Em contraste, o grupo idoso teve uma concentração média de P4 mais alta quando comparado ao grupo jovem (CARNEVALE et al, 1993a).

Os blastocistos de éguas idosas apresentaram menos células totais, pior qualidade e tenderam a ter menor diâmetro. Sugeriu-se ainda que os defeitos de desenvolvimento do embrião ou ambiente do oviduto podem esclarecer a falha no estabelecimento da gestação em éguas velhas e subférteis (CARNEVALE et al., 1993b). Carnevale & Ginther(1992) observaram uma taxa de concepção por ciclo e de nascimento por estação maior nas éguas jovens e do que em idosas.

Segundo Davies Morel et al. (2010), em éguas idosas, existe uma relação entre diminuição do tamanho folicular, diminuição da viabilidade oocitária e menor desempenho reprodutivo, sendo possível ocorrer a ovulação de um folículo pré-ovulatório que não chegou ao final da divisão meiótica e/ou maturação. Além disso, éguas idosas ovulam frequentemente oócitos com alterações na cromatina nuclear, diminuindo assim o índice de fertilidade.

Comparando oócitos de éguas idosas e jovens obtidos após recente ovulação, os provenientes de éguas idosas apresentaram mais organelas citoplasmáticas distribuídas erroneamente. O número de oócitos em estágio de maturação nuclear em metáfase (I ou II) foi maior no grupo jovem comparado ao idoso, que apresentou mais oócitos em estágio não determinado. Além disso, oócitos de éguas senis possuem outras anormalidades morfológicas não observadas em oócitos de éguas jovens, incluindo vesícula grande dentro do ooplasma ou associada ao núcleo, com formato irregular, áreas do ooplasma sem organelas e seções do oolema com microvilos (CARNEVALE et al., 1999).

Carnevale et al. (2012) analisando a morfologia do fuso meiótico de oócitos de éguas idosas e jovens, observaram que os oócitos de éguas idosas apresentaram mais alterações atípicas comparado aos oócitos de éguas jovens, podendo afetar a viabilidade do embrião e sua capacidade de desenvolvimento.

As éguas idosas ainda podem apresentar uma maior porcentagem de deformidades anatômicas, prejudiciais para reprodução como má coaptação e conformação de vulva. Além de serem mais susceptíveis a endometrite pós-cobertura, devido a falhas no processo de limpeza uterina e no sistema de drenagem linfática (TROEDSSON et al., 1993).

#### 2.4. Aminoácido L-Arginina e a perfusão vascular do Sistema Reprodutivo

A L-Arginina (Arg) é um dos dez aminoácidos essenciais para cavalos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). A suplementação de Arg tem demonstrado melhorar as funções reprodutiva, cardiovascular, pulmonar, renal, hepática, gastrointestinal e funções imunológicas em várias espécies (WU et al., 2009).

A conversão da L-arginina em L-citrulina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), resulta na produção de óxido nítrico (NO), poliaminas, glutamato, prolina, creatina e agmatina (ROSSELLI et al., 1998; WU et al., 2009).

Três diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase têm sido descritas em diferentes tecidos: a neuronal (nNOS ou NOS-1), a induzível (iNOS ou NOS-2) e a endotelial (eNOS ou NOS-3), suas funções variam de acordo com o tecido

(SNYDER, 1995; TELFER et al., 1997). A primeira isoforma, nNOS, é conhecida como um importante neurotransmissor e neuromodulador no sistema nervoso central e periférico (MCCANN et al., 1996). A iNOS é ativada por citocinas, tais como, interleucina-1, fator de necrose tumoral  $\alpha$  e lipopolissacarídeos. Em condições patológicas, a iNOS pode desempenhar um papel importante na produção de óxido nítrico. Na maioria dos órgãos, a iNOS é expressa apenas em resposta a estímulos imunológicos. Em contraste, a eNOS é expressa nas células da teca, células da granulosa e na superfície do oócito durante o desenvolvimento folicular, além de apresentar um importante papel no controle da função vascular (NATHAN & XIE, 1994; LEE et al., 2000).

Welter et al. (2004) observaram uma significativa variação na expressão da eNOS durante o ciclo estral da égua, sugerindo que os hormônios sexuais ovarianos influenciam a sua transcrição. A maior expressão da eNOS ocorreu no dia 5 após ovulação, quando a concentração plasmática da progesterona está mais elevada. Por outro lado, não foi encontrada diferença na expressão da iNOS durante todo o ciclo estral.

O NO é uma importante molécula de sinalização que atua em diversos tecidos na regulação de várias funções fisiológicas e tem sido estudado por desempenhar um papel importante no desenvolvimento folicular e no processo de ovulação (JAROSZEWSKI et al., 2001; PINTO et al., 2002). É um potente vasodilatador e um mediador essencial para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e manutenção da função, do tônus e integridade vascular (PALMER et al., 1987; SYNDER, 1995; MUROHARA et al., 1999; JAROSZEWSKI et al., 2001; ALBRECHT et al., 2003).

A enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) subunidade beta-1 é codificada pelo gene *Gucy1b3*. Estas enzimas são sensor de NO (ARNOLD et al., 1977). Na presença de NO, a sGC é ativada para converter GTP a GMP cíclico (cGMP) e cGMP que, por sua vez, tem um papel direto no controle de vários processos fisiológicos (POULOS, 2006). No entanto, não foi encontrado na literatura estudos relacionados a expressão do *Gucy1b3* no sistema reprodutivo da égua.

No endométrio, por apresentar alterações na função vascular ao longo do ciclo estral, esta molécula provavelmente desempenha um importante papel (REYNOLDS et al., 1992; CAMERON & CAMPBELL, 1998). No útero, o NO é produzido principalmente pelo endotélio, podendo controlar o leito vascular de maneira parácrina. Em humanos, o NO aumentou a proliferação de células do estroma uterino enquanto nas células epiteliais induziu a apoptose, sugerindo uma função reguladora diferencial sobre a sobrevivência das células do endométrio e interações parácrinas entre ambas as células (TELFER et al., 1995; MAGNESS et al., 2000; JOHNSON et al., 2004).

Em éguas, diferentemente de vacas, houve diferença na produção de NO e na expressão da eNOS no endométrio durante o ciclo estral, sendo menor no começo da fase luteal, indicativo de que a NOS e o NO são importantes na regulação da função uterina (JAROSZEWSKI et al., 2003; ROBERTO DA COSTA et al., 2007).

Um dos principais reguladores da expressão de eNOS e produção de NO é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente fator angiogênico e de permeabilidade vascular (MAYLAN, 1999; REYNOLDS et al., 2000, 2002). Por sua vez, o NO regula a expressão de VEGF e a angiogênese (REYNOLDS et al., 2000, 2002; BECKMAN et al., 2006). Desse mesmo modo, o E2 também induz a expressão da eNOS no útero (YALLAMPALLI & DONG, 2000; HAN et al., 2005).

Em humanos, o isolamento do epitélio endometrial e cultura de células do estroma, demonstrou que o E2 regula positivamente a expressão de RNAm VEGF e os níveis de proteína VEGF (CHARNOCK-JONES et al., 1993; SHIFREN et al., 1996). A expressão de VEGF tem o seu efeito completamente bloqueado quando utilizado um inibidor de receptor de E2 (HUANG et al., 1998). A expressão dos receptores de VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2) é significativamente reduzida em vasos do endométrio na ausência de E2 (NAYAK & BRENNER, 2002), sugerindo que o E2 seja também essencial para a manutenção dos receptores de VEGF nos vasos do endométrio.

Hervé et al. (2006) sugeriram que o E2 pode regular indiretamente a expressão de VEGFR-2 nas células endoteliais do endométrio, através da

modulação de VEGF que, em um mecanismo parácrino, estimula a expressão de VEGFR-2. A regulação positiva de VEGF e eNOS por estrogênios fornece os dois fatores necessários para a exsudação de fluidos a partir da microvascularização gerando o edema do endométrio.

A segurança da suplementação de Arg na dieta de ovelhas prenhes, porcos e ratos foi estabelecida no estudo de Wu et al. (2007). Dietas com Arg mostraram melhorar a performance reprodutiva de suínos (MATEO et al., 2007) e reduzir a mortalidade embrionária em ratas (ZENG et al., 2008).

Para avaliar o papel da Arg no fluxo sanguíneo uterino e folicular, Battaglia et al. (1999) trataram mulheres com análogo ao GnRH, FSH purificado e L-arginina, e observaram maior número de folículos grandes, maior número de oócitos coletados e embriões transferidos. Assim como houve um aumento no fluxo sanguíneo nas artérias perifoliculares e uterinas. Os autores observaram ainda que a modulação da vascularização endometrial pela suplementação de Arg melhorou a taxa de gravidez.

Mortensen et al. (2011) observaram que éguas no puerpério suplementadas com Arg tiveram uma redução significativa na quantidade de líquido presente no útero quando comparadas as éguas não suplementadas. Similarmente, o tempo médio da presença de fluido no útero foi maior nas éguas não suplementadas, indicando um efeito benéfico na involução uterina pós-parto.

Em um estudo recente, Kelley et al. (2013) suplementaram éguas gestantes e após o parto com Arg, e observaram uma redução no tamanho do útero e no acúmulo de fluido uterino pós-parto, porém não houve diferença no fluxo sanguíneo. Adicionalmente, os autores relataram um aumento na perfusão vascular do folículo dominante, mas não foi observado alteração no crescimento e desenvolvimento folicular, assim como no índice de resistência da artéria ovariana.

Em outro estudo, foi introduzido no útero de éguas não-gestantes 200 mL de solução salina com diluente de sêmen e estas éguas foram suplementadas com Arg. Observou-se que a Arg não teve efeito sobre a quantidade de fluido presente no útero, na perfusão vascular das artérias uterinas, assim como no índice de resistência das artérias uterinas. Os autores concluíram que a

suplementação de Arg, por curto período, não teve efeito sobre a hemodinâmica uterina (JACOBS et al., 2013).

### **3. OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram: a) comparar a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, por meio da ultrassonografia Doppler, e o perfil hormonal (LH, FSH, P4 e E2) de éguas jovens e idosas; b) avaliar o efeito da suplementação oral diária com o aminoácido L-arginina sobre a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, e perfil hormonal (LH, FSH, P4 e E2) de éguas jovens e idosas.

## 4. MATERIAL e MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizadas 22 éguas mestiças não gestantes e em bom estado corporal. Exames histológicos do útero foram previamente realizados, objetivando a classificação do grau de degeneração endometrial de acordo com Kenney & Doig (1986) de forma que as éguas jovens apresentaram classificação I, IIA e IIB e as éguas idosas apresentaram classificação IIA, IIB e III.

O experimento foi realizado entre novembro de 2012 e março de 2013, no Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – CERBEQ (Posto de Monta), UNESP Botucatu (Latitude 22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"). Os animais foram mantidos em piquetes e alimentados com feno de coast-cross (*Cynodondactylon*), ração concentrada, silagem de milho, suplementação mineral e acesso livre à água. Os procedimentos foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Câmpus de Botucatu.

### 4.2. Delineamento experimental

Os animais foram separados em dois grupos: grupo I, éguas jovens (n=10) com idade entre 4 e 10 anos, e grupo II, éguas idosas (n=12) com idade acima de 20 anos apresentando ciclos regulares. O modelo experimental foi do tipo *cross-over*, onde todas as éguas participaram dos dois tratamentos, controle e tratado, aleatoriamente.

As éguas do grupo I (jovens, n=10) e do grupo II (idosas, n=12) tiveram acompanhamento reprodutivo durante quatro ciclos estrais consecutivos. Com o intuito de minimizar a influência dos fatores ambientais, parte dos animais de cada grupo (jovens, n=4 e idosas, n=6), passaram pelo tratamento 1, onde nos dois primeiros ciclos, foram suplementados com Arg e nos dois ciclos subsequentes

não foi realizada a suplementação. A outra parte dos animais de cada grupo (jovens, n=6 e idosas, n=6), passaram pelo tratamento2, onde nos dois primeiros ciclos, não foram suplementados com Arg e nos dois ciclos subsequentes foi realizada a suplementação com Arg. Foi observada a contemporaneidade dos animais dos dois tratamentos conforme organograma abaixo.

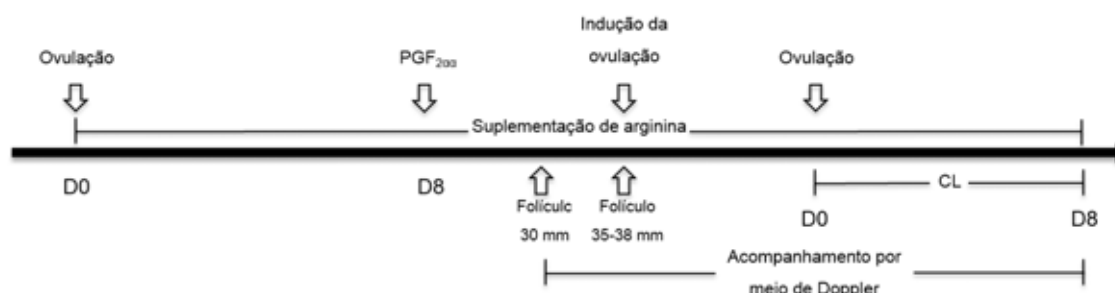
### Tratamento 1



Ciclo 1: Suplementação oral com Arg à partir do oitavo dia pós-ovulação, sem controle por meio da ultrassonografia Doppler.



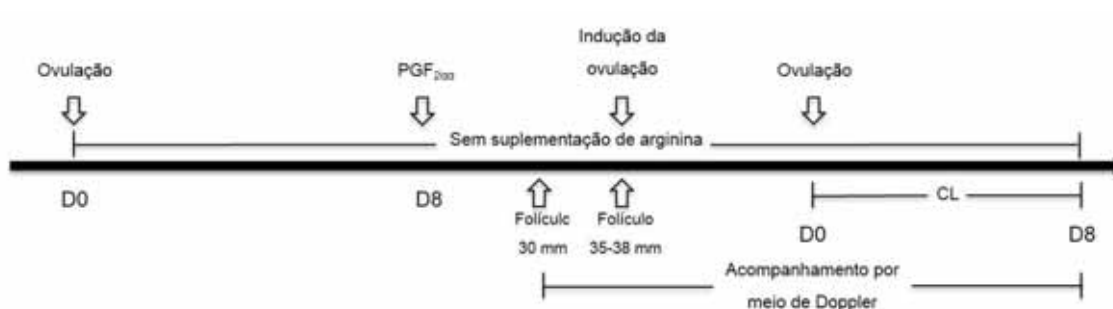
Ciclo 2: Suplementação oral com Arg, com controle por meio da ultrassonografia Doppler.



Ciclo 3: Sem suplementação oral com Arg à partir do oitavo dia pós-ovulação e sem controle por meio da ultrassonografia Doppler.



Ciclo 4: Sem suplementação oral com Arg e com controle por meio da ultrassonografia Doppler.



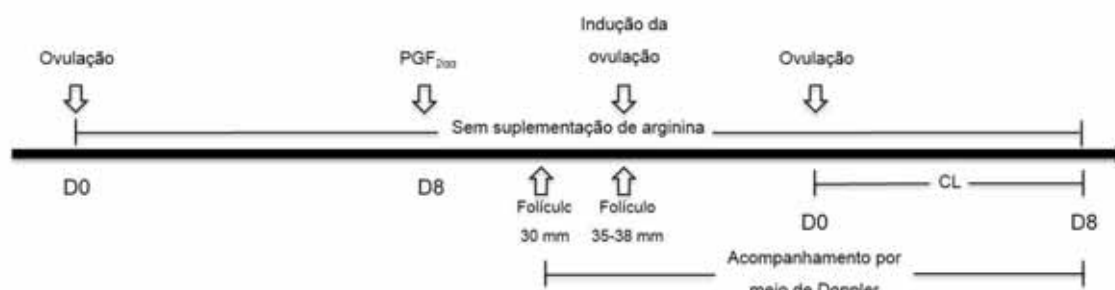
## Tratamento 2

|                                        |                                        |                                    |                                    |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Ciclo 1<br>Não suplementado<br>com Arg | Ciclo 2<br>Não suplementado<br>com Arg | Ciclo 3<br>Suplementado<br>com Arg | Ciclo 4<br>Suplementado<br>com Arg |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|

Ciclo 1: Sem suplementação oral com Arg à partir do oitavo dia pós-ovulação, sem controle por meio da ultrassonografia Doppler.



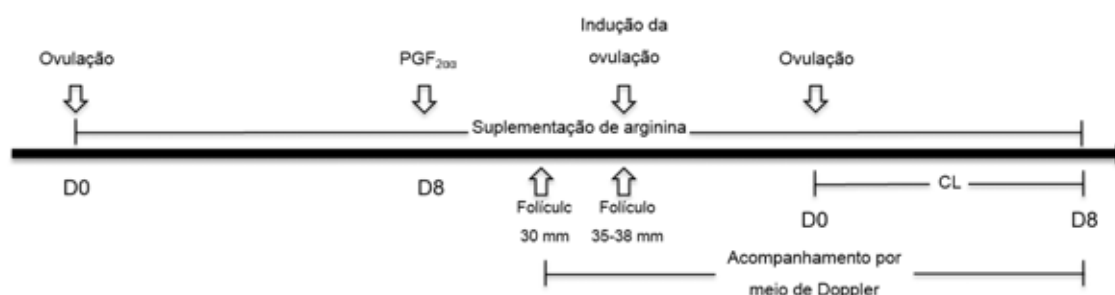
Ciclo 2: Sem suplementação oral com Arg, com controle por meio da ultrassonografia Doppler.



Ciclo 3: Suplementação oral com Arg à partir do oitavo dia pós-ovulação, sem controle por meio da ultrassonografia Doppler.



Ciclo 4: Suplementação oral com Arg, com controle por meio da ultrassonografia Doppler.



Inicialmente, as éguas não aceitaram ingerir a Arg misturada somente com o concentrado, assim a administração da Arg foi realizada por via oral, diluída em água, com o auxílio de uma seringa. Porém, ocorreu o aparecimento de úlceras na

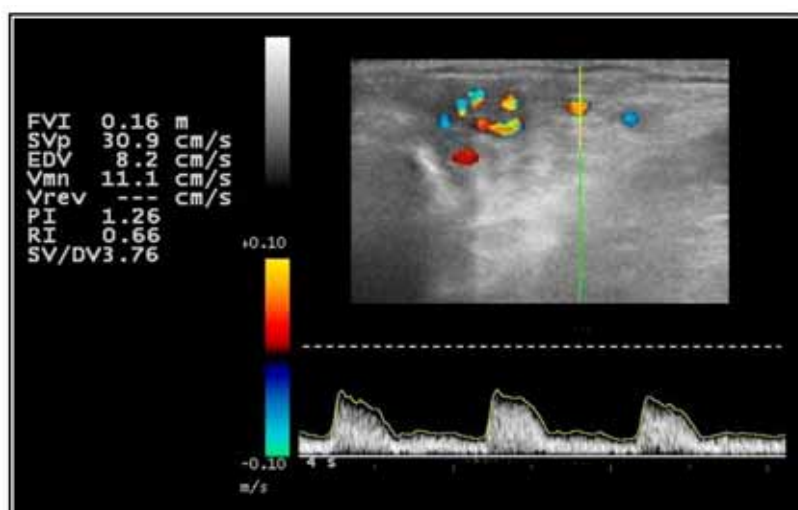
cavidade oral dos animais. Assim, após várias tentativas, a alternativa encontrada foi misturar a Arg a outros alimentos.

Por fim, a suplementação oral foi realizada com 100 g diária de Arg (>98,5% de alta pureza; Ajinomoto Amino Science LLC, Raleigh, NC, EUA), dividida em duas porções, misturada manualmente à 3 kg de concentrado e 2 Kg de silagem de milho, esta quantidade de Arg representa cerca de 1% da dieta total (com base na matéria seca), segundo Mortensen et al. (2011). Os devidos cuidados foram tomados a fim de garantir que todas as éguas ingerissem a quantidade desejada de Arg.

Em ambos os tratamentos, a perfusão vascular folicular, luteal e uterina foram avaliadas diariamente a partir da presença de folículo com diâmetro médio  $\geq 30\text{mm}$ , por meio da ultrassonografia *Color* e Espectral Doppler. Quando observado folículo  $\geq 35\text{mm}$  associado a edema uterino evidente, conforme a classificação de Samper (1997); foi realizado o tratamento para indução da ovulação com 1mg de Acetato de Deslorelina (BET Pharm, Lexington, KY – EUA), por via intramuscular. Após a ovulação, foi acompanhada a perfusão vascular do CL e do útero até o oitavo dia pós-ovulação, momento em que foi administrada por via intramuscular 5 mg de prostaglandina (Dinoprost tromethamine, Lutalyse, São Paulo, Brasil).

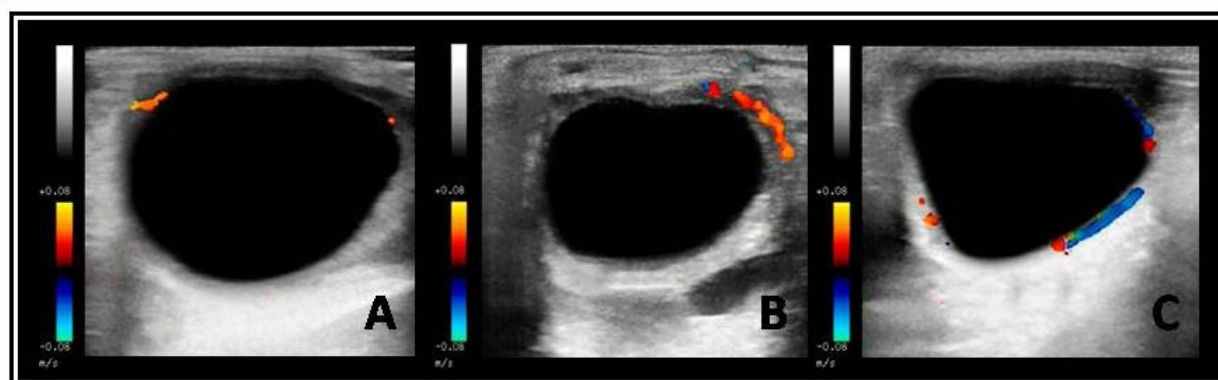
#### 4.3. Avaliação por meio da ultrassonografia Doppler

Para avaliação objetiva da perfusão vascular do ovário, a artéria ovariana ipsilateral ao folículo dominante ou corpo lúteo foi analisada por meio da ultrassonografia modo espectral Doppler utilizando o aparelho MyLab<sup>TM</sup>Five (ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, São Paulo, Brasil) equipado com transdutor linear multifrequencial. Para tanto, posicionou-se o cursor em uma artéria ovariana e um gráfico espectral, com no mínimo três ciclos cardíacos semelhantes, foi gerado (Figura 8). Deste, foi escolhido um ciclo, que forneceu os valores dos Índices de Resistência (RI) e de Pulsatilidade (PI). Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes e a média dos valores encontrados foi utilizada para análise estatística (BOLLWEIN et al., 2002a).



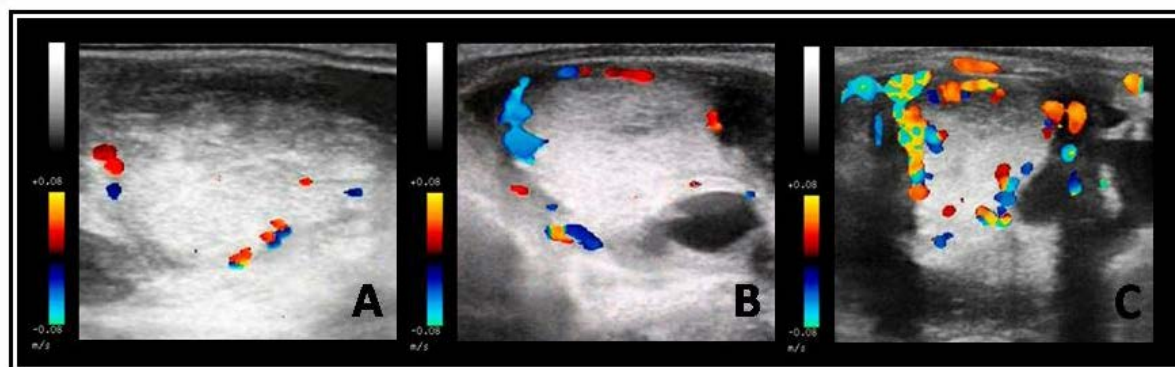
**FIGURA 8:** Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria ovariana, em corte transversal do pedículo ovariano de égua. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A perfusão vascular folicular subjetiva foi estimada levando-se em consideração o percentual da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos (Figura 9; SILVA et al., 2006).



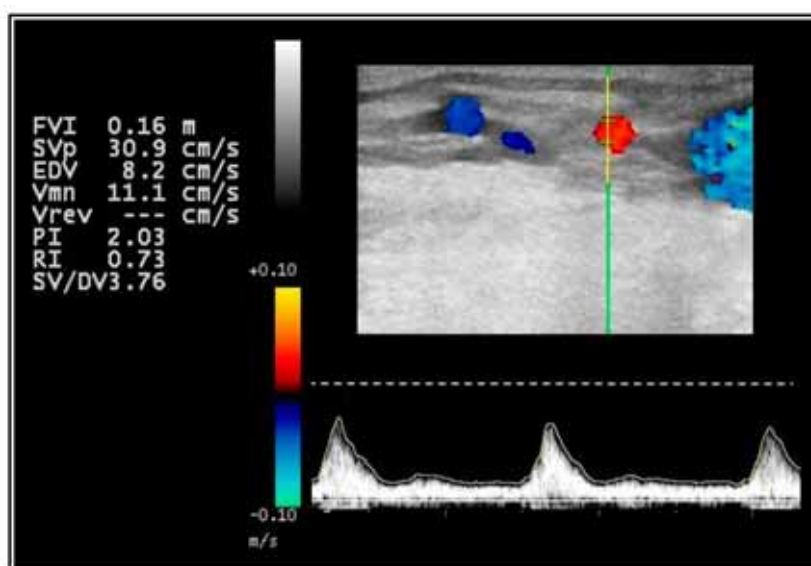
**FIGURA 9:** Exame ultrassonográfico modo color Doppler de folículos pré-ovulatórios de éguas. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular folicular, em uma classificação de 0 a 100%, onde A=10%, B= 20% e C=30% da parede folicular com pontos Doppler coloridos. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A análise subjetiva da perfusão vascular luteal, foi estimada levando-se em consideração o percentual da área luteal com sinais Doppler coloridos (Figura 10; BOLLWEIN et al., 2002b).



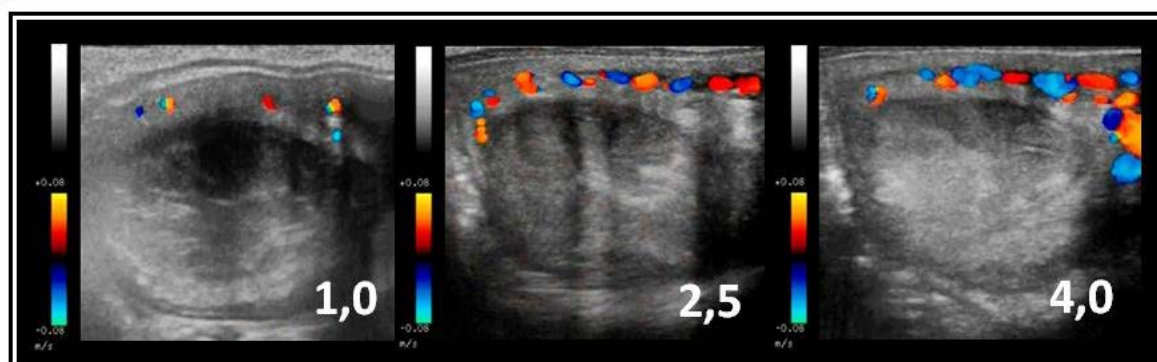
**FIGURA 10:** Exame ultrassonográfico modo color Doppler de corpos lúteos de éguas. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular luteal, em uma classificação de 0 a 100%, onde A=10%, B= 20% e C=50% do tecido luteal com pontos Doppler coloridos.  
**Fonte:** Arquivo pessoal.

A análise objetiva da perfusão vascular uterina foi realizada a partir da análise dos dados coletados das artérias uterinas direita e esquerda, em modo espectral Doppler (BOLLWEIN et al., 1998). Para tanto, semelhante ao realizado na avaliação ovariana, posicionou-se o cursor na artéria uterina e um gráfico espectral, com no mínimo três ciclos cardíacos similares, foi gerado. Deste, foi escolhido um ciclo cardíaco, que forneceu os valores dos Índices de Resistência (RI) e de Pulsatilidade (PI). Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes em cada artéria uterina, e a média dos valores encontrados foi utilizada para análise estatística (Figura 11).



**FIGURA 11:** Exame ultrassonográfico Doppler modo espectral. Coleta de dados espectrais realizada na artéria uterina, em corte transversal do corno uterino de égua. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A perfusão vascular subjetiva do útero foi estimada levando-se em consideração a quantidade de sinais Doppler coloridos presentes no mesométrio, miométrio e endométrio, em corte transversal do terço médio dos cornos uterinos (adaptado de FERREIRA et al., 2008). A classificação utilizada foi o escore de 1 a 4 (mínima e máxima perfusão vascular, respectivamente; Figura 12).



**FIGURA 12:** Exame ultrassonográfico modo color Doppler em corte transversal do corno uterino de éguas não gestantes. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular uterina, em um escore de classificação de 1 a 4, indicando 1=mínima, 2,5=moderada e 4,0=máxima perfusão vascular. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Todas as análises foram realizadas pelo mesmo operador, utilizando modo *color Doppler* (MyLab™Five, ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, São Paulo, Brasil). O escaneamento foi contínuo, em tempo real de 1 minuto e as imagens foram armazenadas para posterior análise.

#### 4.4. Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas diariamente, no mesmo horário, por veio de venopunção da jugular em tubos heparinizados de 10 mL (BD Vacutainer, São Paulo, Brasil). As coletas iniciaram-se oito dias antes da ovulação e se mantiveram até oito dias após a ovulação, tanto para o ciclo tratado quanto para o ciclo controle. As amostras de sangue foram centrifugadas (1500 xg) durante 10 minutos, e o plasma foi pipetado e armazenado em eppendorf à -20° C para posterior análise hormonal.

#### 4.5. Análises hormonais

As concentrações plasmáticas hormonais (FSH, LH, P4 e E2) foram realizadas por radioimunoensaio (RIA), no laboratório da Dr. Janet Roser na Universidade da Califórnia, de acordo com Yoon et al. (2007).

##### 4.5.1. FSH

Para mensuração das concentrações de FSH no plasma sanguíneo das éguas, o FSH altamente purificado derivado de pituitária equina (e265B, Papkoff, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA) foi utilizado para os padrões (variando de 0,25 a 64 ng/mL) e para iodação. O anticorpo primário FSH anti-ovino (LS4-3D-2; Dr. DL Thompson, Universidade Estadual de Louisiana, Baton Rouge, Louisiana, EUA) foi usado na diluição 1/25.000. O anticorpo secundário utilizado foi o IgG de cabra anti-coelho (Equitech-Bio, Inc., Kerrville, Texas, EUA) na diluição de 1/100 em 5% de PEG e soro de coelho (Sigma, St Louis, Missouri,

EUA). A sensibilidade do ensaio foi de 0,5 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 3,0% (n = 8) e 7,5% (n = 5), respectivamente.

#### 4.5.2. LH

Foi utilizado LH altamente purificado equino derivado de pituitária (2001B, Roser, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA) para a iodação e para os padrões, que variou de 0,125 a 32 ng/mL. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal LH  $\beta$  de rato anti-bovino (518B7; Roser, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA; ROSER et al., 1994) utilizados na diluição 1/200. O anticorpo secundário utilizado foi IgG de cabra anti-rato na diluição de 1/200 em 5% de PEG e soro de rato (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). A sensibilidade do ensaio foi de 0,25 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 2,4% (n = 8) e 6,1% (n = 6), respectivamente.

#### 4.5.3. E2

Para mensurar a concentração plasmática de E2, utilizou-se o estradiol tritiado (1, 2, 6, 7 -3H- E2, NET -317, atividade específica 70-115 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Science, Boston, Massachusetts, EUA) como marcador. Os padrões (E950; Steraloids, Wilton, New Hampshire, EUA) variaram de 6,25 a 500 pg/mL. Para extração, 200  $\mu$ L de amostras de plasma ou de controle foram utilizados, com 2 mL de éter etílico anidro fresco (VWR, West Chester, Pensilvânia, EUA) e reconstituído com 300  $\mu$ L de PBS com 0,1% de gelatina de pele de suíno (PBS-G, Sigma, St Louis, Missouri, EUA). As amostras de plasma foram diluídas com PBS-G, quando necessário, para se adequar na curva padrão. O anticorpo primário utilizado foi o anti-estradiol-17 $\beta$ -6-BSA de carneiro (# 244, Niswender, Universidade Estadual do Colorado, Fort Collins, Colorado, EUA) utilizado na diluição 1/60.000. A eficiência da extração do plasma foi de 86,5%. A sensibilidade do ensaio foi de 10 pg/mL, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram 2,5% (n =6) e 6,0% (n =23), respectivamente.

#### 4.5.4. P4

O anticorpo primário utilizado foi anti-P4-11-alfa-hemi: BSA de carneiro (diluição 1/13.000, #8939 Stabenfeldt, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA), e o marcador foi 3H-progesterona (1, 2, 6, 7-3H-P4, NET381, atividade específica 90-115 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Science). Os padrões (Q2600; Steraloids) variaram de 0,1 a 20 ng/mL. Para extração, 40 µL de amostras de plasma ou de controle foram utilizados, com 1mL de éter etílico anidro fresco (VWR, West Chester, Pensilvânia, EUA) e reconstituído com 100 µL de PBS com 0,1% de gelatina de pele de suíno (PBS-G, Sigma, St Louis, Missouri, EUA). As amostras de plasma foram diluídas com PBS-G, quando necessário, para encaixar na curva padrão. A sensibilidade do ensaio foi de 0,2 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 3,5% (n = 6) e 8,4% (n = 23), respectivamente. A eficiência da extração foi de 75%.

#### 4.6. Colheita de material uterino

O fluido uterino foi coletado de todos os animais no D8 (após o exame ultrassonográfico e antes da aplicação da prostaglandina) tanto do ciclo tratado com Arg quanto do ciclo controle, por meio de um tampão de algodão (absorvente íntimo feminino, tamanho mini, da marca OB® - Johnson & Johnson). Para a colocação do tampão de algodão no interior do útero, utilizou-se um aplicador de aço inox. Afim de facilitar sua remoção, o mesmo teve seu puxador aumentado com fio cordonê grosso estéril, permanecendo 5 cm abaixo da comissura ventral da vulva. Todo o material foi manipulado com luvas cirúrgicas estéreis sobre pano cirúrgico esterilizado.

A retirada do tampão foi realizada após 30 minutos através da introdução da mão enluvada via vaginal e da tração do fio cordonê, mantendo-o protegido contra o contato com o canal vaginal da égua. Imediatamente após a retirada do tampão do interior do útero, o mesmo foi colocado em uma seringa estéril e pressionado até liberar o líquido absorvido em um tubo estéril graduado. As amostras foram submetidas a um processo de centrifugação a 3000xg por 10

minutos, para retirada da grande quantidade de células presentes, em seguida, as amostras foram congeladas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem dos metabólitos do ON (FIORATTI, 2010).

#### 4.7. Dosagem de óxido nítrico

A partir da descongelação das amostras, as concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foram determinadas pelo método da reação colorimétrica de Griess em um espectrofotômetro (Multiskan EX Primary EIA V 2.1-0) com absorvância de cor em 540 nm para estimar a concentração de NO total no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

As concentrações de nitrato e nitrito foram realizadas da seguinte maneira. A primeira reação na amostra ocorreu quando o nitrito formou o sal de diazonium, que reagiu com o segundo reagente gerando a cor roxa, para a qual o pico de absorvância é de 540 nm. Com o objetivo de reduzir o nitrato a nitrito, uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  da amostra armazenada foi incubada em mistura contendo 1000  $\mu\text{L}$  de nitrato reductase, 1000  $\mu\text{L}$  do cofator NADPH (5 mg/mL) diluído em água deionizada e 1000  $\mu\text{L}$  de PBS (0,5 M). As amostras foram então encubadas numa temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por um período de 14 a 16 horas numa placa de 96 poços. Após isso, 80  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess foi adicionado a amostra. A curva padrão para o nitrito foi diluída em PBS contendo concentrações variando entre 0,5 a 400  $\mu\text{M}$ . Os valores de absorvância adquiridos nas concentrações pré estabelecidas foram usados para construir a curva de dispersão. A relação entre a absorvância e a concentração seguiram um padrão linear ( $R^2=0.98$ ;  $p<0,05$ ; FIORATTI, 2010).

Dessa forma, foram realizadas as dosagens de nitrito, o metabólito de menor concentração, e de óxido nítrico total, ou seja, nitrito e nitrato. As reações fazem com que todo nitrato seja reduzido a nitrito e por medições desse obtemos a quantidade total de metabólitos ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ).

#### 4.8. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Dados não distribuídos normalmente foram transformados para logaritmos naturais ou ranqueados para atingirem a normalidade. A análise dos dados foi realizada utilizando o proc-mix do SAS (versão 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Diferenças entre grupos, momentos e interação entre grupos e momentos foram avaliadas pelo teste de LSD (diferença mínima significativa). Os testes t-pareado e não pareado foram utilizados para detectar diferenças significativas entre momentos e grupos, respectivamente. O nível de significância estatística foi definido como  $p < 0,05$ .

A correlação de Pearson foi realizada entre as médias das variáveis respostas ao longo dos dias. O nível de significância estatística foi definido como  $p < 0,05$ , e a tendência estatística entre 0,1 e 0,05.

## 5. RESULTADOS

O período interovulatório apresentou duração média, no ciclo controle e tratado de éguas jovens, de  $15 \pm 2,9$  e  $16 \pm 11,3$  dias, respectivamente. No ciclo controle e tratado das éguas idosas a duração média foi de  $17,3 \pm 11,8$  e  $16 \pm 2,4$  dias, respectivamente. O período interovulatório no ciclo controle foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) para éguas jovens quando comparado à éguas idosas. Não houve diferença entre os ciclos controle e tratado tanto dentro do grupo de éguas jovens quanto idosas, da mesma forma não foi encontrada diferença significativa entre éguas jovens e idosas para os ciclos tratados.

### 5.1. Perfusão vascular folicular

Durante a fase folicular, os parâmetros da perfusão vascular ovariana, PI e RI da artéria ovariana ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, não diferiram ( $p > 0,05$ ) nos ciclos controle e tratado tanto entre os grupos de éguas jovens e idosas, quanto dentro de cada grupo, nos três dias que antecederam a ovulação. Da mesma forma, não foi observada diferença na perfusão vascular folicular subjetiva e no tamanho folicular ( $p > 0,05$ ) entre os grupos e ciclos neste mesmo período (Tabela 1 e 2).

**Tabela 1:** Média  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) da artéria ovariana ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, e perfusão vascular folicular subjetiva (PVF), dos três dias que antecederam a ovulação dos grupos de éguas jovens e idosas nos ciclos controle e tratado com arginina.

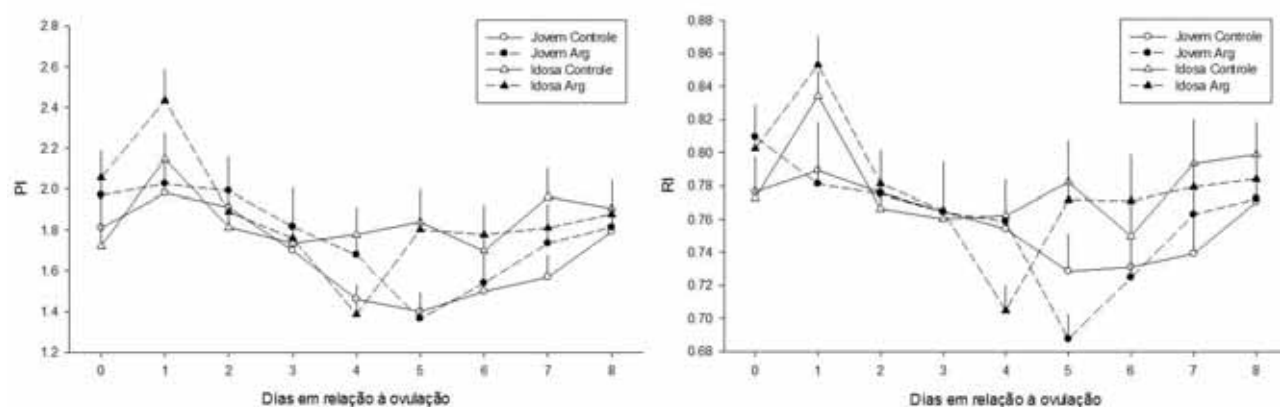
|                | <b>Dia</b> | <b>Jovens controle</b> | <b>Jovens Arginina</b> | <b>Idosas controle</b> | <b>Idosas Arginina</b> |
|----------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>PI</b>      | -3         | 1,63 $\pm$ 0,4         | 1,48 $\pm$ 0,2         | 1,90 $\pm$ 0,5         | 1,63 $\pm$ 0,3         |
|                | -2         | 1,58 $\pm$ 0,3         | 1,71 $\pm$ 0,5         | 1,66 $\pm$ 0,4         | 1,54 $\pm$ 0,3         |
|                | -1         | 1,91 $\pm$ 0,4         | 1,76 $\pm$ 0,4         | 1,93 $\pm$ 0,3         | 1,98 $\pm$ 0,6         |
| <b>RI</b>      | -3         | 0,77 $\pm$ 0,06        | 0,73 $\pm$ 0,05        | 0,77 $\pm$ 0,09        | 0,75 $\pm$ 0,04        |
|                | -2         | 0,74 $\pm$ 0,05        | 0,76 $\pm$ 0,08        | 0,75 $\pm$ 0,08        | 0,73 $\pm$ 0,05        |
|                | -1         | 0,79 $\pm$ 0,06        | 0,77 $\pm$ 0,05        | 0,80 $\pm$ 0,05        | 0,79 $\pm$ 0,09        |
| <b>PVF (%)</b> | -3         | 28,1 $\pm$ 19,1        | 22,1 $\pm$ 11,1        | 25 $\pm$ 10,5          | 26,4 $\pm$ 11,1        |
|                | -2         | 27,5 $\pm$ 18,6        | 16,7 $\pm$ 10          | 22,5 $\pm$ 11,4        | 22,9 $\pm$ 13,4        |
|                | -1         | 40 $\pm$ 20,8          | 24,3 $\pm$ 7,3         | 24,6 $\pm$ 11,4        | 32,5 $\pm$ 8,7         |

**Tabela 2:** Média  $\pm$  EPM do tamanho folicular, dos três dias que antecederam a ovulação dos grupos de éguas jovens e idosas nos ciclos controle e tratado com arginina.

|                     | <b>Dia</b> | <b>Jovens controle</b> | <b>Jovens Arginina</b> | <b>Idosas controle</b> | <b>Idosas Arginina</b> |
|---------------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Tamanho (mm)</b> | -3         | 35,2 $\pm$ 4,8         | 36,3 $\pm$ 6,1         | 35,5 $\pm$ 5,6         | 33,5 $\pm$ 3,3         |
|                     | -2         | 37,1 $\pm$ 5,1         | 38,7 $\pm$ 8,1         | 38,5 $\pm$ 5           | 37,5 $\pm$ 3,5         |
|                     | -1         | 38,5 $\pm$ 5,2         | 38,9 $\pm$ 5,5         | 38,5 $\pm$ 5           | 38,6 $\pm$ 3,4         |

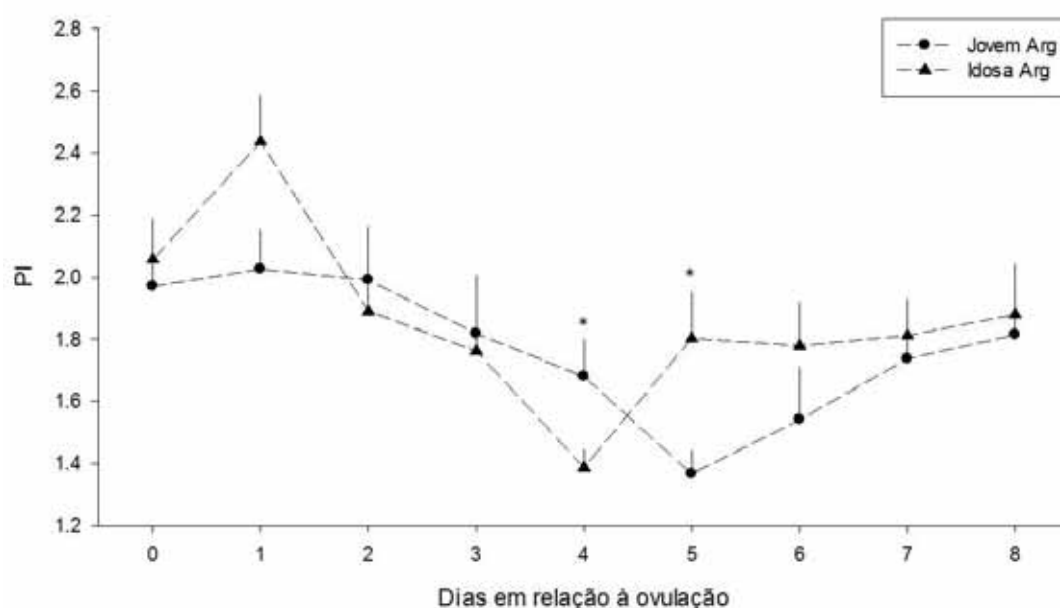
## 5.2. Perfusão vascular luteal

Os parâmetros da perfusão vascular ovariana durante a fase luteal, PI e RI da artéria ovariana ipsilateral ao CL, não diferiram ( $p>0,05$ ) no ciclo controle tanto entre os grupos de éguas jovens e idosas, quanto dentro de cada grupo, no período entre D0 e D8, sendo considerado D0 o dia da ovulação (Figura 13).



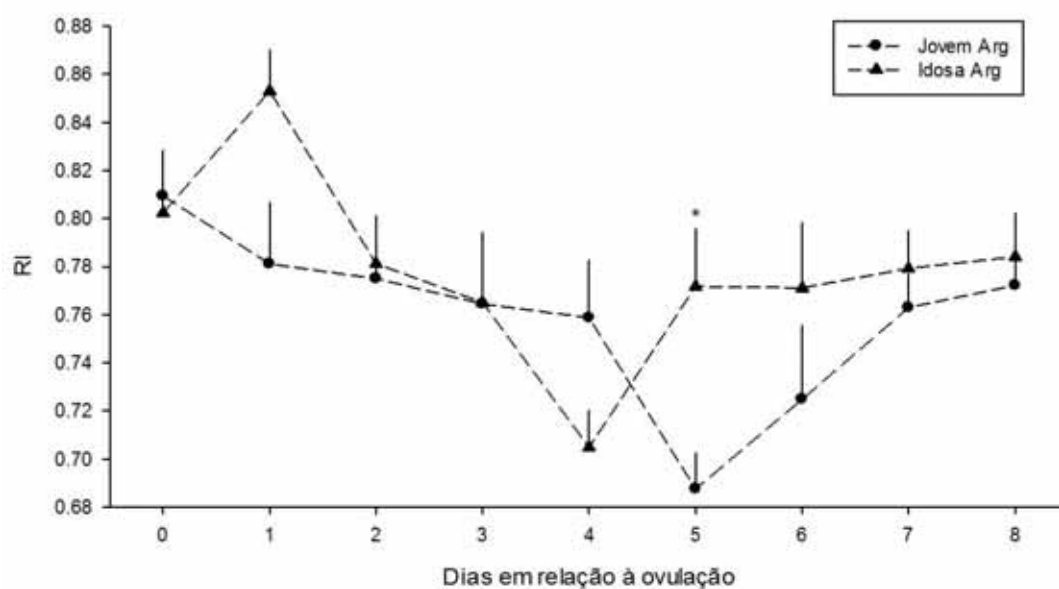
**FIGURA 13:** Médias  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e índices de resistência (RI), da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo, durante o início do diestro de éguas jovens e idosas, nos ciclos controle e tratado com arginina.

Foi observada diferença ( $p<0,05$ ) no PI no ciclo tratado com arginina entre os grupos de éguas jovens e idosas nos dias 4 e 5 pós ovulação. No dia 4, as éguas jovens apresentaram um maior valor de PI ( $p<0,05$ ) em relação às éguas idosas. De forma contrária, no dia 5, observou-se nas éguas idosas maior valor de PI ( $p<0,05$ ) quando comparado às éguas jovens (Figura 14).



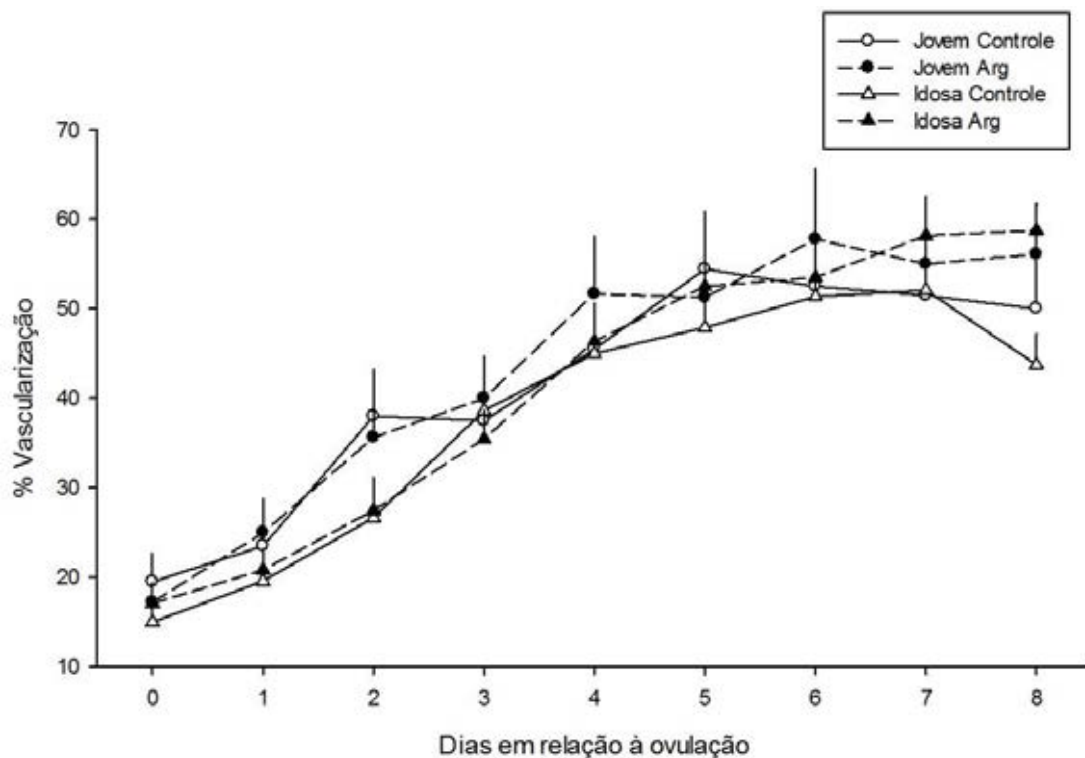
**FIGURA 14:** Médias  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo, durante o início do diestro de éguas jovens e idosas tratadas com arginina. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ ).

Similarmente ao observado para o PI, o grupo de éguas idosas tratadas obteve maior valor de RI no dia 5 ( $p<0,05$ ), quando comparado às éguas jovens tratadas (Figura 15).



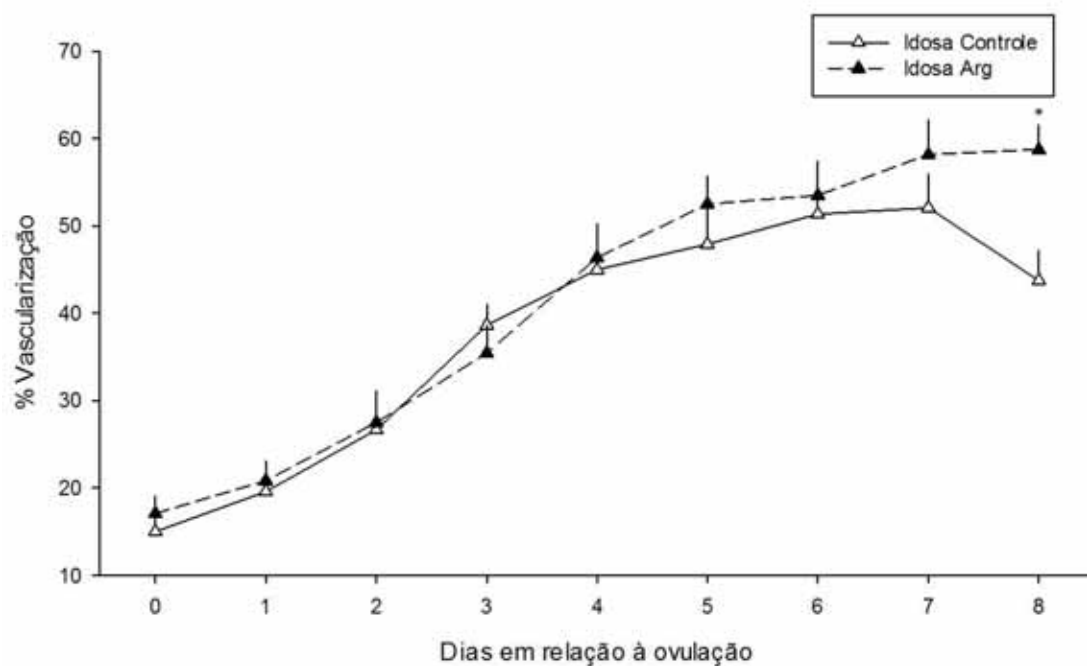
**FIGURA 15:** Médias  $\pm$  EPM dos índices de resistência (RI) da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo, durante o início do diestro de éguas jovens e idosas tratadas com arginina. Asterisco (\*) indica diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ ).

Os valores da perfusão vascular luteal (PVCL) entre os grupos e ciclos estudados estão representados na figura 16.



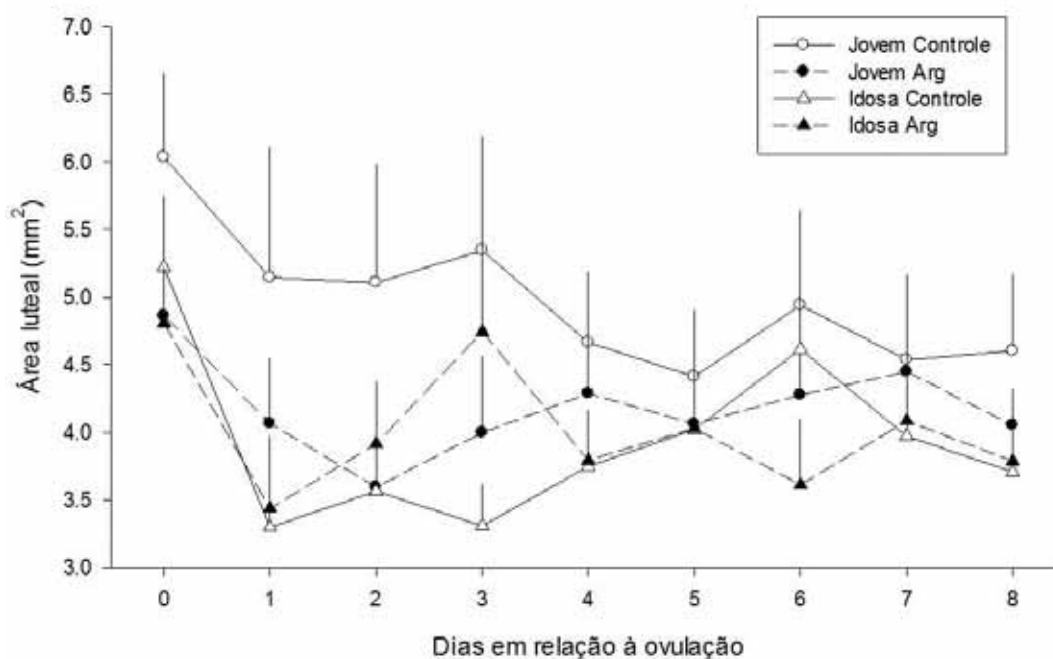
**FIGURA 16:** Médias  $\pm$  EPM da perfusão vascular luteal subjetiva (PVCL), classificada em escala de 0 à 100%, por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler do corpo lúteo, durante o início do diestro, de éguas jovens e idosas, nos ciclos controle e tratado com arginina.

Foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) na PVCL apenas dentro do grupo de éguas idosas entre o ciclo tratado e o controle, no dia 8, momento em que o ciclo tratado apresentou maior valor ( $p < 0,05$ ) do que o controle (Figura 17). Entre os demais grupos não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 17:** Médias  $\pm$  EPM da perfusão vascular luteal subjetiva (PVCL), classificada em escala de 0 à 100%, por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler do corpo lúteo, durante o início do diestro, de éguas idosas nos ciclos controle e tratado com arginina. Asterisco (\*) indica diferença estatística entre os ciclos ( $p < 0,05$ ).

Em relação à área luteal, não houve diferença entre os grupos e ciclos estudados ( $p>0,05$ ; Figura 18).

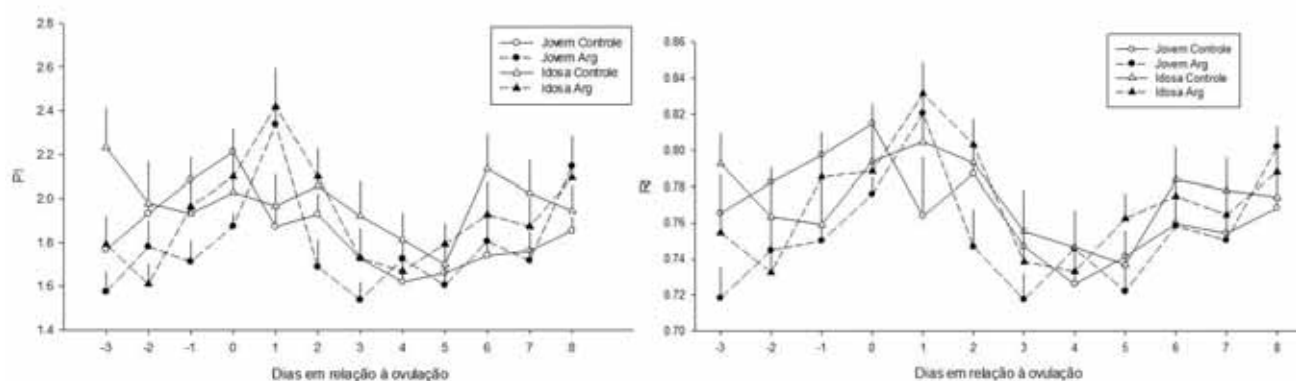


**FIGURA 18:** Médias  $\pm$  EPM da área luteal (mm<sup>2</sup>) avaliada por meio da ultrassonografia do corpo lúteo, durante o início do diestro, de éguas jovens e idosas, nos ciclos controle e tratado com arginina.

### 5.3. Perfusão vascular uterina

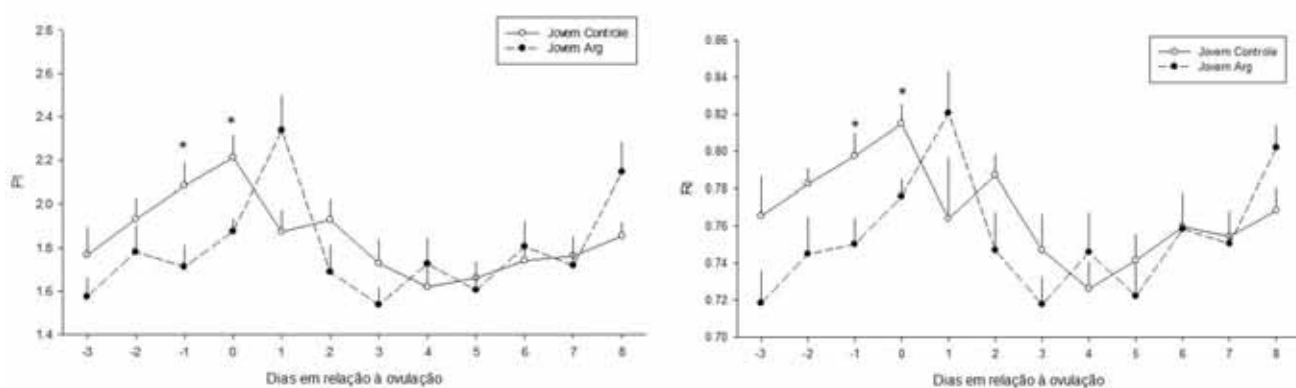
Não houve diferença ( $p>0,05$ ) no PI, RI e perfusão vascular uterina (PVU) entre os cornos ipsi e contralateral ao folículo pré-ovulatório ou CL, durante os períodos estudados. Desta forma, os valores de ambos os cornos uterinos foram utilizados conjuntamente para as análises subsequentes.

As variáveis resposta PI e RI entre os grupos e ciclos estudados estão representados na figura 19.



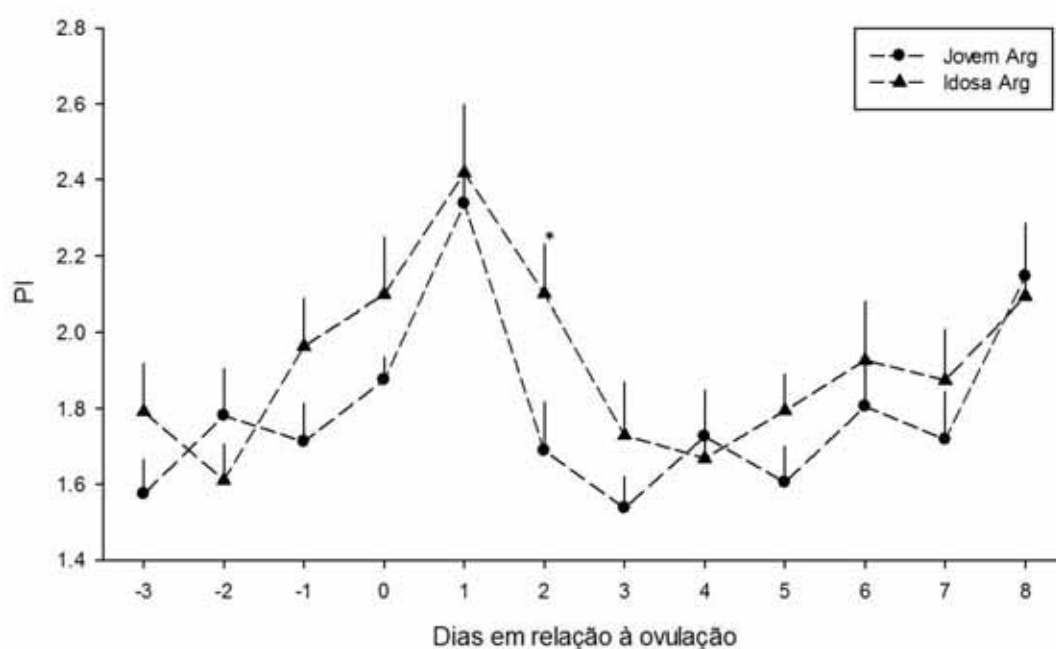
**FIGURA 19:** Médias  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) das artérias uterinas, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, considerando D0 o dia da ovulação.

Quando avaliadas as variáveis resposta PI e RI, para éguas jovens, os ciclos controle apresentaram maior valor ( $p < 0,05$ ) do que os ciclos tratados nos dias -1 e 0 (Figura 20).



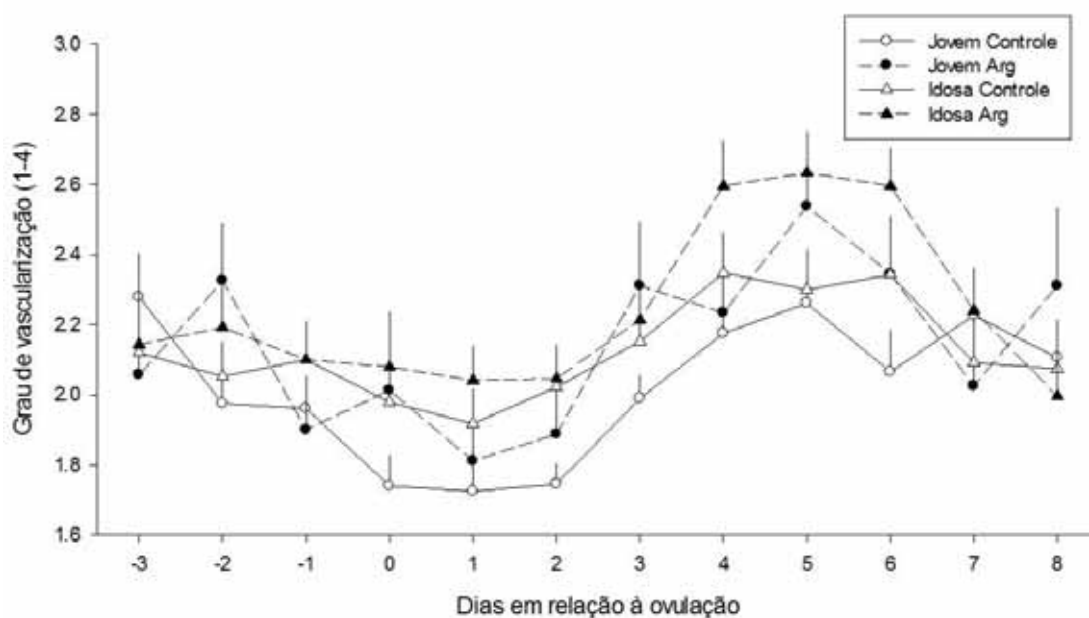
**FIGURA 20:** Médias  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) das artérias uterinas, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Quando estudados os ciclos tratados com arginina, as éguas idosas apresentaram maior valor de PI ( $p<0,05$ ) no dia 2 (Figura 21) em relação às éguas jovens. Não houve diferença estatística entre os demais ciclos e grupos.



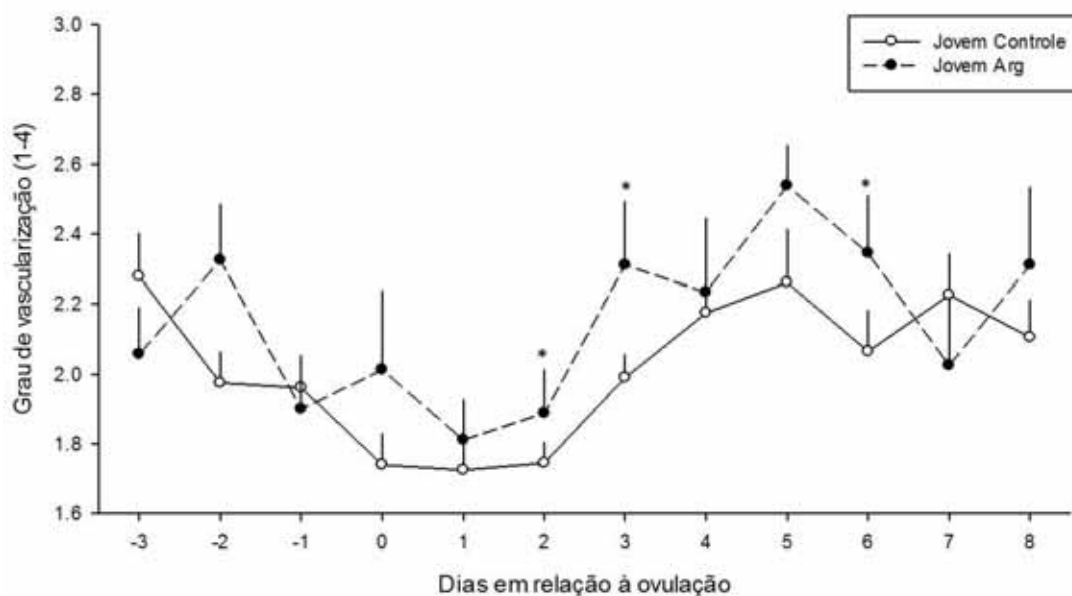
**FIGURA 21:** Médias  $\pm$  EPM dos índices de pulsatilidade (PI) das artérias uterinas, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral de éguas jovens e idosas tratadas com arginina, considerando D0 o dia da ovulação. Asterisco (\*) indica diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ ).

A perfusão vascular uterina subjetiva (PVU) entre os grupos e ciclos estudados estão representados na figura 22.



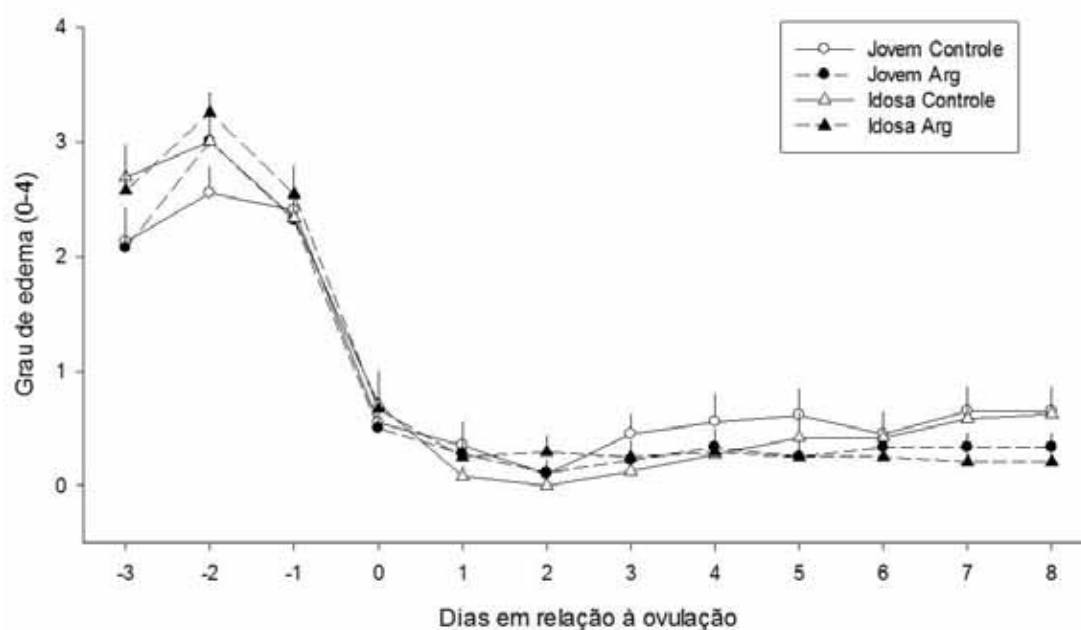
**FIGURA 22:** Médias  $\pm$  EPM da perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), classificada em um escore de 1 a 4, por meio da ultrassonografia Doppler dos cornos uterinos, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, considerando D0 o dia da ovulação.

O grupo de éguas jovens, no ciclo tratado apresentou valores superiores ( $p<0,05$ ) de PVU quando comparado ao ciclo controle nos dias 2, 3 e 6 (Figura 23). Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os demais grupos e ciclos.



**FIGURA 23:** Médias  $\pm$  EPM da perfusão vascular uterina subjetiva (PVU), classificada em um escore de 1 a 4, por meio da ultrassonografia Doppler dos cornos uterinos, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p<0,05$ ).

A variação no grau de edema entre os grupos e ciclos estudados estão representados na figura 24. Não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) no edema uterino entre os grupos e ciclos estudados.

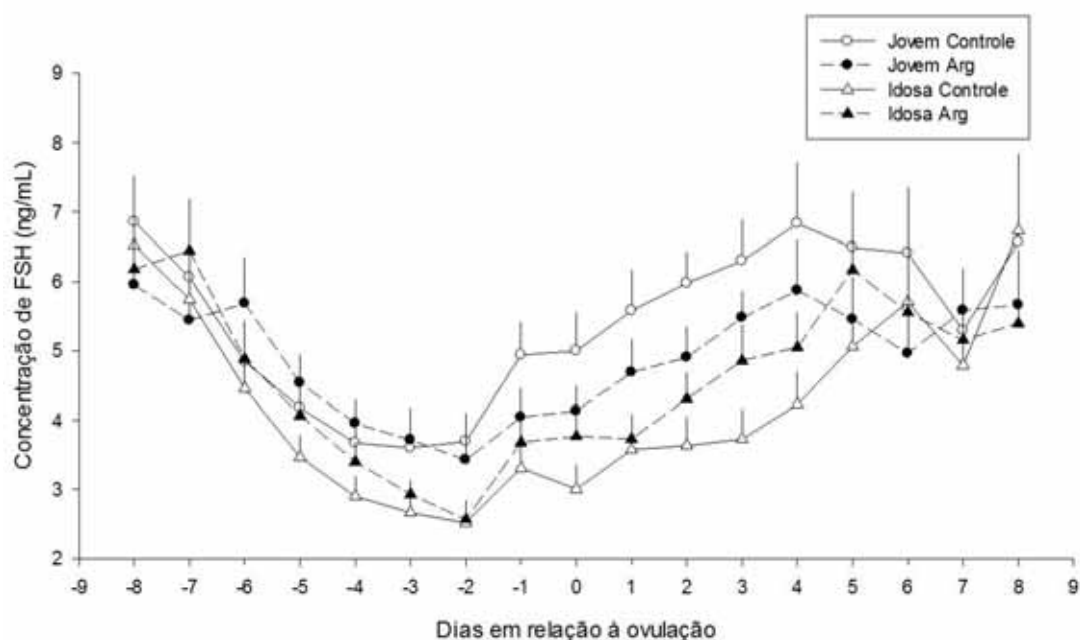


**FIGURA 24:** Médias  $\pm$  EPM do grau de edema, classificada em um escore de 0 a 4, por meio da ultrassonografia dos cornos uterinos, durante os dias -3 e 8 do ciclo estral para os ciclos controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, considerando D0 o dia da ovulação.

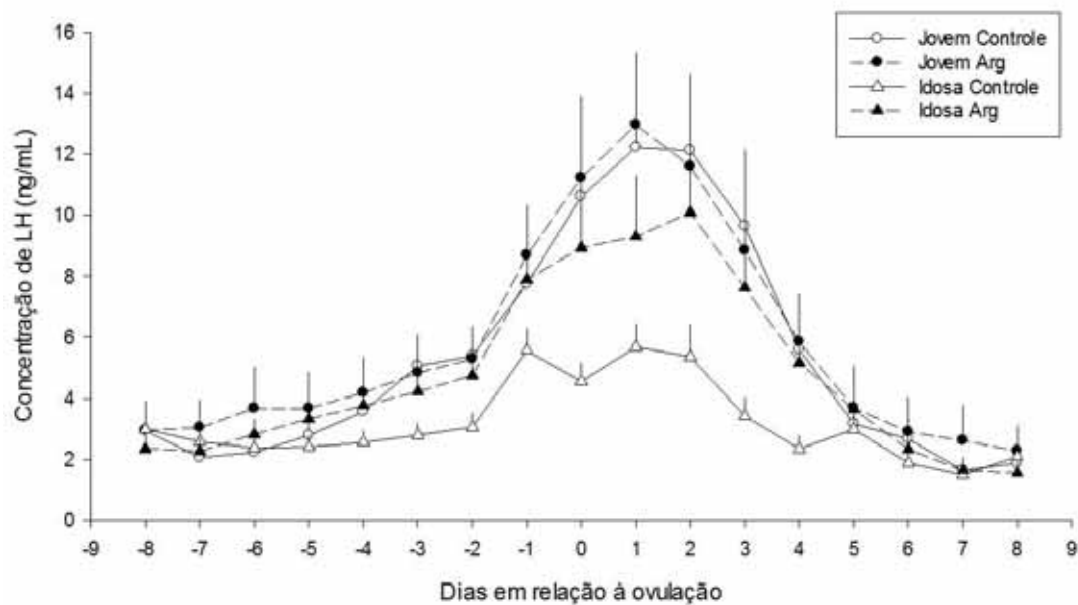
#### 5.4. Dosagens hormonais

As concentrações plasmáticas de FSH, LH, P4 e E2 não diferiram entre os ciclos controle e tratado dentro dos grupos de éguas jovens e idosas, e no ciclo tratado dentro dos grupos ( $p>0,05$ ).

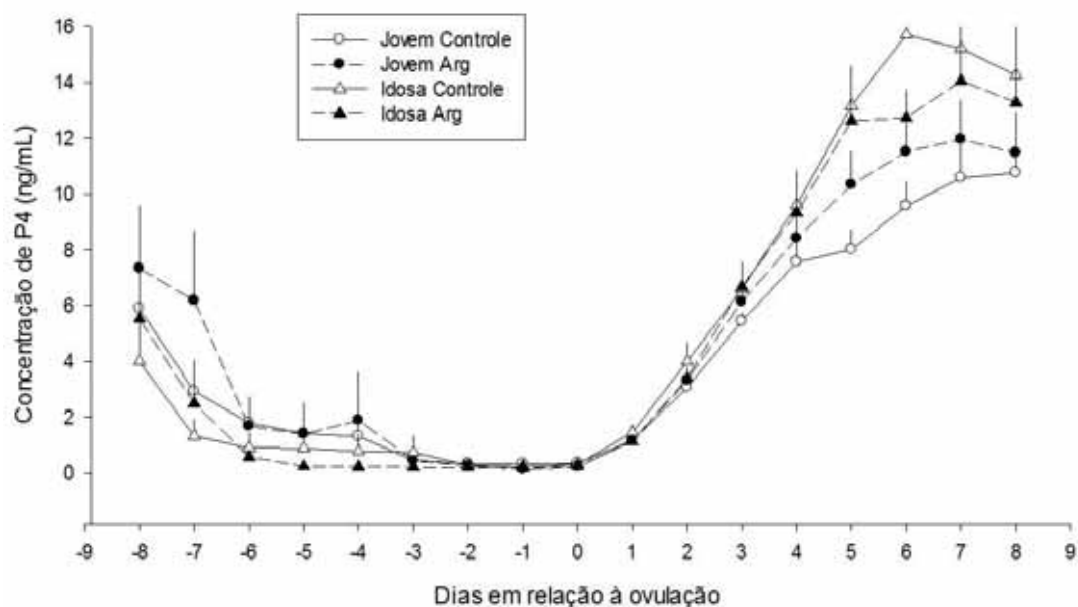
As concentrações plasmáticas de FSH, LH, P4 e E2 entre os grupos e ciclos estudados estão representados nas figura 25, 26, 27 e 28, respectivamente.



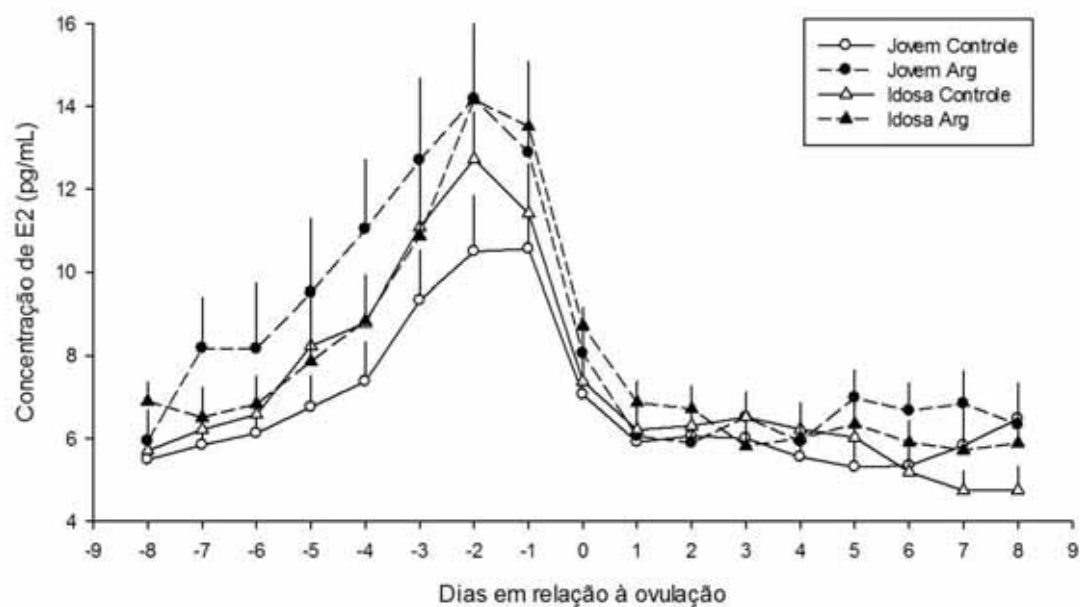
**FIGURA 25:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de FSH do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação.



**FIGURA 26:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de LH do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação.

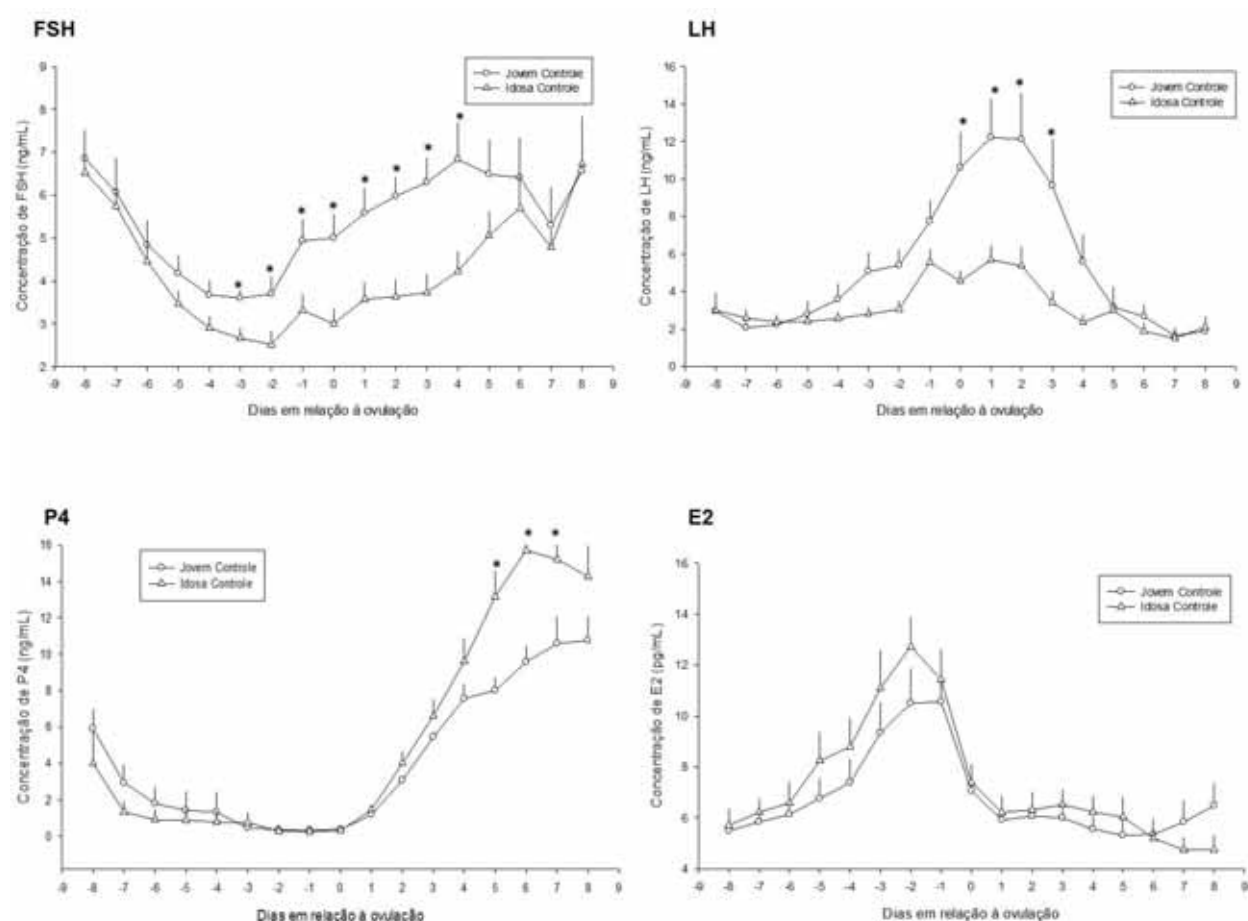


**FIGURA 27:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de P4 do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação.



**FIGURA 28:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de E2 do ciclo controle e tratado com arginina em éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação.

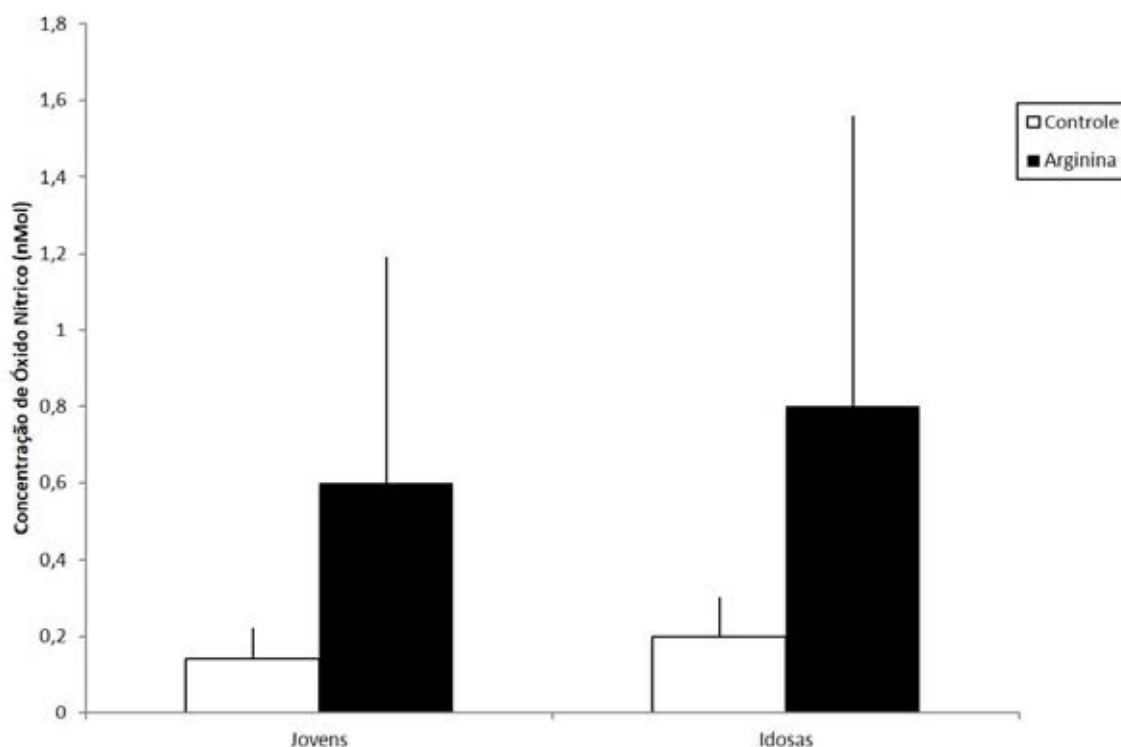
Comparando o ciclo controle entre os grupos de éguas jovens e idosas, observou-se maior concentração plasmática de FSH no grupo de éguas jovens ( $p < 0,05$ ), entre os dias -3 e 4 do ciclo. Similarmente, as concentrações plasmáticas de LH foram superiores no ciclo controle do grupo de éguas jovens ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo idoso, entre os dias 0 e 4 do ciclo. Ao passo que a P4, contrariamente ao FSH e LH, apresentou maiores concentrações ( $p < 0,05$ ) no ciclo controle do grupo de éguas idosas comparado às éguas jovens, no intervalo entre os dias 5 e 7 do ciclo. O E2 não diferiu entre os ciclos e grupos ( $p > 0,05$ ; Figura 29).



**FIGURA 29:** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de FSH, LH, P4 e E2, do ciclo controle de éguas jovens e idosas, no intervalo entre os dias -8 e 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

### 5.5. Dosagem de óxido nítrico

Quando comparadas as concentrações de NO do fluído uterino das éguas no oitavo dia após a ovulação, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os ciclos e grupos estudados (Figura 30).



**FIGURA 30:** Médias  $\pm$  EPM da concentração de óxido nítrico mensurada no fluido uterino livre dos ciclos controle e tratado com arginina de éguas jovens e idosas no D8 pós ovulação.

### 5.6. Correlação entre as variáveis resposta

As correlações entre todas as variáveis respostas estão descritas nas tabelas 1 a 20 (Anexos).

#### 5.6.1. US Doppler x perfil hormonal

Durante o período de estro, no ciclo controle das éguas jovens, foi observada uma correlação positiva ( $r=0,74$ ;  $p<0,05$ ) entre a perfusão vascular

folicular e as concentrações plasmáticas de E2. Quanto ao útero, o PI e RI da artéria uterina apresentaram correlação positiva ( $r=0,58$ ;  $p<0,05$  e  $r=0,40$ ;  $p<0,05$ , respectivamente) com as concentrações plasmáticas de E2.

No período luteal do ciclo tratado com arginina das éguas jovens, quando estudado o CL, observou-se uma correlação positiva da PVCL com as concentrações plasmáticas de P4 ( $r=0,59$ ;  $p<0,01$ ).

Em éguas idosas, durante o período lúteo do ciclo tratado com arginina quando estudado o CL, a PVCL demonstrou correlação positiva com as concentrações plasmáticas de P4 ( $r=0,75$ ;  $p<0,01$ ).

#### 5.6.2. Concentração de óxido nítrico x US Doppler

Para o ciclo controle de éguas jovens, foi observado correlação positiva entre o NO e o RI da artéria uterina ( $r=0,88$ ;  $P\leq 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho, de forma inédita, procurou estudar os efeitos da suplementação com o aminoácido L-arginina sobre a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, bem como sobre o perfil hormonal de éguas jovens e idosas. Adicionalmente, neste estudo foram comparadas as diferenças na perfusão vascular do sistema reprodutivo e no perfil hormonal destes mesmos grupos de éguas.

Esta abordagem abrangente traz novas informações e subsídios acerca da causa da queda da fertilidade em éguas idosas, objeto de estudos importantes na reprodução equina (CARNEVALE et al., 1993a; CARNEVALE & GINTHER, 1995; CARNEVALE et al., 1999; GINTHER et al., 2009), bem como possíveis alternativas para minimizar este processo (ALTERMATT et al., 2012).

Em éguas, a perfusão vascular folicular, avaliada por meio da ultrassonografia Doppler, foi relacionada positivamente à maturidade e qualidade oocitária (GINTHER et al., 2007b). De forma similar, foi associada positivamente com o estabelecimento da gestação em éguas (SILVA et al., 2006).

Quando comparadas éguas jovens e idosas, Altermatt et al. (2012) não encontraram diferenças na análise objetiva da perfusão vascular folicular entre éguas de diferentes faixas etárias, ao passo que, na análise subjetiva, os folículos pré-ovulatórios provenientes de éguas idosas apresentaram-se mais vascularizados. Tais resultados são contrários aos esperados, uma vez que, segundo Ginther et al. (2007b), a qualidade oocitária está positivamente relacionada com a perfusão vascular folicular, desta forma a expectativa era que éguas idosas, por apresentarem oócitos de pior qualidade (CARNEVALE et al., 1999), apresentassem menor perfusão vascular folicular. No entanto, no presente estudo não foram observadas diferenças na análise subjetiva (PVF) e na análise objetiva (PI e RI da artéria ovariana) do folículo pré-ovulatório entre éguas jovens e idosas, quando não suplementadas com arginina.

Nossa hipótese foi que a suplementação oral com o aminoácido arginina aumentaria a vascularização dos folículos das éguas. Sabidamente a Arg,

aminoácido essencial na dieta dos equinos, é metabolizada principalmente em óxido nítrico, um potente vasodilatador e mediador da angiogênese (PALMER et al., 1987; SYNDER, 1995; MUROHARA et al., 1999; JAROSZEWSKI et al., 2001; ALBRECHT et al., 2003). Este aminoácido quando utilizado em diversas espécies como ovelhas, porcas, ratas e mulheres, apresentou um efeito positivo na performance reprodutiva (WU et al., 2007; MATEO et al., 2007; ZENG et al., 2008; BATTAGLIA et al., 1999). No estudo de Kelley et al. (2013), éguas no período pós-parto que foram suplementadas com arginina apresentaram uma maior perfusão vascular folicular subjetiva nos três dias que antecederam a primeira ovulação pós parto. Contudo, no presente trabalho, não foi observado aumento da perfusão vascular folicular tanto das éguas jovens como nas idosas suplementadas, em ambas análises, subjetiva e objetiva.

Como esperado, no presente trabalho, em todos os grupos e ciclos estudados, o tamanho dos folículos pré-ovulatórios não se alteraram durante os três dias que antecederam a ovulação, uma vez que esta foi induzida e, consequentemente, o crescimento dos folículos foi cessado, coincidindo com os resultados encontrados por Gastal et al. (2006), onde, após o tratamento de indução da ovulação, os folículos pararam de crescer.

No presente estudo, quando avaliado o ciclo controle, não foi observada diferença no diâmetro do folículo pré-ovulatório entre éguas jovens e idosas, sendo resultados similares encontrados em estudos anteriores (JACOB, 2007; CARNEVALE et al., 1993a; GINTHER et al., 2009). Contrariamente, Davies Morel et al. (2010) relataram que éguas jovens apresentaram maior diâmetro do folículo pré-ovulatório comparado à éguas idosas, demonstrando que a idade da égua teria um efeito negativo no diâmetro folicular. Considerando que a viabilidade do oócito é reduzida com o avançar da idade (CARNEVALE et al., 1999), estes mesmos autores propuseram que esse processo possivelmente seja resultado de ovulações de folículos pré-ovulatórios menores, que não tenham sido submetidos a divisão meiótica final e/ou maturação completa. Todos os trabalhos anteriormente citados não realizaram o tratamento para indução da ovulação nas éguas, ou seja, as éguas ovularam espontaneamente, sendo assim, não é

possível estabelecer uma comparação com os resultados do presente estudo, onde houve indução da ovulação.

No presente experimento, a suplementação com o aminoácido arginina não alterou o diâmetro do folículo pré-ovulatório. Esses resultados vão de encontro aos descritos por Kelley et al. (2013), onde não foi observada diferença tanto no número de folículos como no diâmetro do folículo dominante entre as éguas suplementadas e não-suplementadas com arginina.

A perfusão vascular do CL é importante para a obtenção de precursores de esteroides e para a liberação de P4 na circulação sanguínea (FERREIRA-DIAS et al., 2006). No presente estudo, a perfusão vascular luteal apresentou-se baixa logo após a ovulação, período em que há a formação do corpo hemorrágico e, após esta fase, houve um aumento da perfusão vascular luteal, coincidindo com o período de luteogênese como descrito por Al-Zi'Abi et al. (2003). Desta forma, houve uma maior perfusão vascular na estrutura luteal e, conseqüentemente, maior aporte sanguíneo no pedículo ovariano (BERGFELT & ADAMS, 2011). Este perfil encontrado coincide com os resultados encontrados por Bollwein et al. (2002b), por meio da análise objetiva da perfusão vascular luteal, em dados coletados na artéria ovariana.

No presente estudo, quando avaliado o ciclo suplementado com Arg, a perfusão vascular do CL das éguas apresentou-se de forma similar ao ciclo controle, não sendo observadas diferenças entre os grupos e ciclos estudados. Tais achados demonstraram que a Arg não apresentou efeito sobre a perfusão vascular do CL, na maioria dos parâmetros avaliados. Estes achados são contrários aos esperados, uma vez que, o óxido nítrico, subproduto da Arg, apresenta efeito vasodilatador e promotor da angiogênese, sendo capaz de desencadear um aumento na perfusão vascular do CL (PALMER et al., 1987; SYNDER, 1995; MUROHARA et al., 1999; JAROSZEWSKI et al., 2001; ALBRECHT et al., 2003). Não foram encontrados na literatura trabalhos preocupados em estudar o efeito da suplementação com Arg sobre as características do CL.

Em um estudo realizado em 2001, Arruda et al. observaram que a atividade funcional do CL não depende de sua dimensão, uma vez que não houve relação entre a área luteal e as concentrações plasmáticas de P4 em éguas. Da mesma maneira, foi comprovado não existir relação entre o diâmetro luteal e as mudanças do fluxo sanguíneo da artéria ovariana ipsilateral ao CL (BOLLWEIN et al., 2002b). Similarmente, no presente trabalho não foram observadas diferenças na área do CL entre os grupos e ciclos estudados.

A perfusão vascular uterina está diretamente relacionada ao momento do ciclo estral, havendo grande influência dos hormônios esteroidais neste processo (BOLLWEIN et al., 2000; 2002a; RAINE-FENNING et al., 2004; SPRAGUE et al., 2009).

Como esperado, não houve diferença nas variáveis uterinas estudadas entre os cornos ipsi e contralateral ao CL e ao folículo pré-ovulatório, como já observado anteriormente em éguas (BOLLWEIN et al., 1998, 2002, 2002a) e em outras espécies (FORD & CHRISTENSON, 1979b; BOLLWEIN et al., 2000; RAINE-FENNING et al., 2004; PEREIRA et al., 2012).

No presente estudo, o perfil da perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral, foi similar ao encontrado por Bollwein et al. (1998; 2002a; 2004). Entre as variáveis utilizadas para avaliação da irrigação uterina estudadas (PI, RI e PVU), foi observado um mesmo padrão ondular ao longo do ciclo estral, com uma baixa perfusão vascular no dia 0, e valores mais elevados no início do diestro.

O aumento da perfusão vascular uterina no início do diestro também foi detectado em éguas inseminadas, tanto nas que vieram a se tornar gestantes quanto não gestantes (FERREIRA et al., 2010). Além disso, recentemente, Canesin (2012) relatou que este aumento da irrigação uterina durante o início do diestro ocorre fisiologicamente no ciclo estral da égua, independe da presença do embrião. Mas ainda não se sabe ao certo quais mecanismos e fatores estão envolvidos neste evento, podendo haver relação com a preparação uterina para recebimento do conceito.

Não foram observadas diferenças na perfusão vascular uterina no ciclo controle entre éguas jovens e idosas. Da mesma maneira que não foram

encontradas diferenças entre os ciclos controle e tratado em éguas idosas. No entanto, em éguas jovens, a arginina apresentou um efeito positivo na perfusão vascular uterina (PI e RI da artéria uterina) no dia anterior à ovulação e no dia da ovulação. Através da avaliação subjetiva, um aumento na perfusão vascular uterina no ciclo tratado foi evidente nos dias 2, 3 e 6 após a ovulação, neste mesmo grupo. A não observação de efeito positivo da suplementação com Arg na perfusão vascular uterina de éguas idosas pode estar relacionada ao processo degenerativo crônico caracterizado pela proliferação abundante de tecido conjuntivo no endométrio desses animais, o que dificulta o aporte sanguíneo. O óxido nítrico, com seu poder vasodilatador e como mediador da angiogênese pode ter causado a elevação da perfusão vascular uterina observado nos animais jovens (PALMER et al., 1987; SYNDER, 1995; MUROHARA et al., 1999; JAROSZEWSKI et al., 2001; ALBRECHT et al., 2003). Apesar de não ter havido diferença nas concentrações de NO no fluido uterino das éguas no presente trabalho, as dosagens foram realizadas no dia 8 do ciclo estral (considerando D0 o dia da ovulação) e as diferenças encontradas por ultrassonografia Doppler foram anteriores a este momento.

No presente experimento, o edema uterino e a PVU apresentaram-se dentro dos padrões descritos na literatura, onde foi observado maior grau de edema durante o estro, seguido por uma diminuição no diestro (GINTHER, 1992; McKINNON et al., 2011).

O período interovulatório observado no presente estudo foi maior no grupo de éguas idosas comparado ao grupo de éguas jovens, no ciclo controle de ambos os grupos. Tal achado corrobora com a hipótese de Carnevale et al. (1993a), que sugeriram que o longo período interovulatório pode estar associado ao prolongado intervalo da indução da luteólise até a ovulação e, conseqüentemente, ao prolongamento da fase folicular. Outra hipótese para o prolongamento do período interovulatório nas éguas idosas seria o menor tamanho folicular ou menor número de folículos no momento da luteólise. E ainda, a diminuição nas concentrações plasmáticas de LH nas éguas idosas pode se refletir no prolongamento da fase

folicular, porém parece não interferir no processo de ovulação (CARNEVALE et al., 1993a; JACOB et al., 2007).

O hormônio folículo estimulante (FSH) é um hormônio gonadotrófico que possui diversas ações sobre as gônadas femininas, tais como recrutamento da onda folicular, crescimento e diferenciação celular (ALEXANDER & IRVINE, 2011). No presente estudo, como esperado, o perfil das concentrações plasmáticas de FSH foi similar ao descrito na literatura (EVANS & IRVINE, 1975). Um pico de FSH ocorreu no início do diestro, com concentrações elevadas até D6, seguido por uma diminuição e se mantendo com valores basais até o final do diestro.

No ciclo controle, as éguas jovens apresentaram maior concentração plasmática de FSH comparadas às éguas idosas, do dia -3 ao dia 4 pós-ovulação. Carnevale et al. (1993a) detectaram maiores concentrações plasmáticas de FSH no grupo de éguas adultas (15-19 anos) no D7, D10 e D12 pós ovulação. No trabalho desenvolvido por Ginther et al. (2008) as concentrações plasmáticas diárias de FSH não diferiram entre os grupos de éguas nas faixa etárias estudadas, porém a concentração máxima (pico) de FSH foi significativamente maior no grupo das idosas ( $\geq 18$  anos) comparado ao das éguas jovens (5-6 anos) e adultas (10-14 anos). Este aumento nas concentrações plasmáticas de FSH é considerado um sinal de senilidade reprodutiva em vacas (SINGH et al., 2004; MALHI et al., 2005) e em mulheres (KLEIN et al., 1996; NG et al., 2000).

No ciclo suplementado com Arg, quando comparadas as concentrações plasmáticas de FSH entre éguas jovens e idosas, não foram encontradas diferenças significativas. Desta forma, a suplementação com Arg pareceu equilibrar a concentração plasmática de FSH em éguas idosas em relação as éguas jovens, tendo sido capaz de eliminar as diferenças na concentração plasmática deste hormônio entre éguas jovens e idosas. Tal fato pode estar relacionado ao aumento de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelular livre no hipotálamo levando à liberação de GnRH (CONN, 1984). De acordo com McCann et al. (2003), o NO aumenta a liberação de FSH e LH mediado pelo aumento de  $\text{Ca}^{++}$  livre intracelular, desta forma, nossa hipótese é que a arginina, por meio da ação do NO, elevou as

concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  livre no hipotálamo, aumentando assim a liberação de GnRH, e consequentemente, os níveis plasmáticos de FSH e LH.

Fisiologicamente, as concentrações de LH aumentam poucos dias antes do início do estro, com ocorrência do pico geralmente um dia após a ovulação, retornando para um nível basal ao longo da fase luteal média (ALEXANDER & IRVINE, 2011). No presente estudo, este padrão da concentração de LH foi observado em todos os ciclos e grupos avaliados. No ciclo controle, as éguas jovens apresentaram uma maior concentração plasmática do D0 ao D4, quando comparadas às éguas idosas. O que corrobora com os resultados encontrados por Carnevale et al. (1993a), que observaram ter sido a concentração plasmática de LH menor em éguas idosas quando comparadas às éguas jovens, no período de D-7 à D3. Da mesma forma, em um estudo de Ginther et al. (2008), a concentração de LH foi mais elevada em éguas jovens, de D-7 à D4, estes autores sugerem que existam fatores extra ovarianos mais elevados em éguas jovens que influenciem o aumento do LH. Além disso, a redução nas concentrações de LH nas éguas idosas parece estar relacionada com o prolongamento da fase folicular (CARNEVALE et al., 1993a).

Assim como no ciclo suplementado com Arg, não houve diferença nas concentrações plasmáticas de LH entre os grupos de éguas jovens e idosas. Ou seja, a diferença entre os grupos jovem e idoso observada no ciclo controle foi eliminado no ciclo tratado. Esta observação sugere que a Arg, da mesma forma que o encontrado nas concentrações plasmáticas de FSH, apresentou um efeito positivo sobre a produção de LH, fato que pode estar relacionado ao aumento nas concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  livre no hipotálamo (MCCANN et al., 2003).

No presente estudo, as concentrações plasmáticas de E2 se comportaram conforme descrito na literatura, onde há uma elevação do estradiol plasmático de 6 a 8 dias antes da ovulação, apresentando um pico aproximadamente dois dias antes da ovulação (CHRISTENSEN, 2011). Não foram observadas diferenças entre os grupos e ciclos estudados, o que vai de encontro com o relatado por Ginther et al. (2008), em que a idade das éguas não apresentou efeito sobre as concentrações de E2 do período de D-4 a D4.

A concentração plasmática de P4 em todos os grupos e ciclos estudados apresentou um perfil similar ao descrito por Vanderwall (2011), onde a P4, hormônio produzido e secretado pelo CL, durante o ciclo estral de éguas não gestantes começa a aumentar suas concentrações dentro de 24-48 horas após a ovulação, atinge valor máximo no D8 e mantém-se elevada até D14-D16 do ciclo estral, quando ocorre a luteólise.

No ciclo controle, a concentração plasmática de P4 foi maior no grupo de éguas idosas comparado às éguas jovens, no período entre o D5 e D7. Ginther et al. (2008), relataram que o grupo de éguas adultas (10-14 anos de idade) tiveram a concentração plasmática máxima (pico) de P4 mais elevada do que o grupo de jovens (5-6 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) sem diferença entre os ciclos. Já Carnevale et al. (1993a) observaram que a concentração média de P4 em éguas idosas ( $\geq 20$  anos de idade) foi maior do que de éguas com idade intermediária (15-19 anos), mas não diferiu das éguas jovens (5-7 anos).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa nas concentrações de NO no fluido uterino entre os ciclos e grupos estudados, houve uma diferença numérica expressiva nos níveis de NO comparando os ciclos controle e tratado tanto nas éguas jovens como nas éguas idosas, sugerindo um efeito positivo da Arg sobre a concentração de óxido nítrico. O número de animais utilizados possivelmente interferiu nos resultados da análise estatística, a utilização de um maior número de animais se faz necessária em estudos futuros.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente experimento e nas condições em que este foi realizado podemos concluir que:

Não existe diferença na perfusão vascular folicular, luteal e uterina entre éguas jovens e idosas quando não suplementadas com arginina.

Existem diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de FSH, LH e P4 entre éguas de diferentes faixas etárias, sendo as concentrações plasmáticas de FSH e LH superiores nas éguas jovens e de P4 superior nas éguas idosas em alguns momentos do ciclo estral.

A suplementação com o aminoácido L-arginina não apresentou efeito, na maioria dos parâmetros avaliados, sobre a perfusão vascular folicular, luteal e uterina tanto de éguas jovens como de idosas.

A suplementação com arginina apresentou um efeito positivo nas concentrações plasmáticas de FSH, LH e P4, eliminando as diferenças entre éguas jovens e idosas.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACOSTA, T.; GASTAL, E.; GASTAL, M.; BEG, M.; GINTHER, O. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.502-507, 2004a.

ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; AND GINTHER, O.J. Aberrant Blood Flow Area and Plasma Gonadotropin Concentrations During the Development of Dominant-Sized Transitional Anovulatory Follicles in Mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.637–642, 2004b.

ALBRECHT, E.W.; STEGEMAN, C.A.; HEERINGA, P.; HENNING, R.H.; VAN GOOR, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **J Pathol**, v.199(1), p.8–17, 2003.

ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. FSH and LH. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRE, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2 ed [S.1.]: Wiley Blackwell, 2011. p.1619-1630.

ALTERMATT, J.L.; MAROLF, A.J.; WRIGLEY, R.H.; CARNEVALE, E.M. Effects of FSH and LH on ovarian and follicular blood flow, follicular growth and oocyte developmental competence in young and old mares. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.191-197, 2012.

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

ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.74, p.3203-3207, 1977.

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38(5), p.233-239, 2001.

BATTAGLIA, C.; SAVATORI, M.; MAXIA, N. et al. Adjuvant L-arginine treatment for in-vitro fertilization in poor responder patients. **Human Reproduction**, v.14, p.1690-1697, 1999.

BECKMAN, J.D.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; JOHNSON, M.L.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Isolation and characterization of ovine luteal pericytes and effects of nitric oxide on pericyte expression of angiogenic factors. **Endocrine**, v.29(3), p.467-476, 2006.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Luteal Development. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRE, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2 ed [S.1.]: Wiley Blackwell, 2011. p.2055-2064.

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

BOLLWEIN, H.; BRAUN, J. Follicular dynamics in mares treated with HCG for induction of ovulation. **Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere**, v.27, p.47-51, 1999.

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

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

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.65, p.2043-2051, 2002b.

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

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

CAMERON, I.T.; CAMPBELL, S. Nitric oxide in the endometrium. **Human Reproduction Update**, v.4(5), p.565–569, 1998.

CANESIN, H. S.; IGNÁCIO, F.S.; PANTOJA, J.C.F.; ROMANO, R.M.; FERREIRA, J.C.; NOVAES FILHO, L.F.; MEIRA, C. Alterações fisiológicas da perfusão vascular uterina por meio da Ultrassonografia Doppler no diestro em éguas. In: XIII Conferência Anual da ABRAVEQ, Campinas. **Brazilian Journal of Equine Medicine**, v.41, p.336-337, 2012.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v.37, p.1101–1015, 1992.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.287-299, 1993a.

CARNEVALE, E.M.; GRIFFIN, O.J.; GUNTER, O.J. Age-associated subfertility before entry of embryo into the uterus in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.31-35, 1993b.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. **Animal Reproduction Science**, v.35, p.231-246, 1994.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction**, v.(Mono 1), p.209-14, 1995.

CARNEVALE, E.M.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; KING, S.S.; SCHMITT, S.J.; GATES, H.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. **Theriogenology**, v.51, p.299, 1999.

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

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; RUGGERI, E.; ALBERTINI, D.F. Meiotic spindle configurations in metaphase II oocytes from young and old mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32(7), p.410-411, 2012.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.38 (3), p.872-879, 2008.

CARVALHO, C.F. **Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais**. 1ªed., São Paulo, Roca, p.1-30, p.71-83, 2009.

CERRI, G.G.; MÓLNAR, L.J. VEZOZZO, D.C.P. **Doppler**, 1º ed., São Paulo, Sarvier, p. 1-30, 1996.

CERRI, G.G.; OLIVEIRA, I.R.S. **Ultra-sonografia Abdominal**. 1.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002, 864p.

CHARNOCK-JONES, D.S.; SHARKEY, A.M.; RAJPUT-WILLIAMS, J.; BURCH, D.; SCHOFIELD, J.P.; FOUNTAIN, S.A.; BOOCOCK, C.A.; SMITH, S.K. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. **Biol Reprod**, v.48, p.1120-1128, 1993.

CHRISTENSEN, B.W. Estrogens. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRE, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2 ed [S.1.]: Wiley Blackwell, 2011. p.1631-1636.

CONN, P.M. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone action. In: **Biochemical Actions of the Hormones**, Ed. G. Litwack. Academic Press, Nova York, p. 67-92, 1984.

COSTELLO, M.F.; SHRESTHA, S.M.; SJOBLUM, P.; MCNALLY, G.; BENNETT, M.J.; STEIGRAD, S.J.; HUGHES, G.J. Power Doppler ultrasound assessment of relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.23(9-10), p.359-365, 2006.

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

ESTELLER-VICO, A.; LIU, I.K.; BROSANAN, R.J.; STEFFEY, E.P. Uterine vascular elastosis and its effect on uterine blood flow in cyclic mares. **Animal Reproduction Science**, v.121S, p.S87-S88, 2010.

EVANS, M.J.; IRVINE, C.H.G. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, v.23, p.193–200, 1975.

FEIGENBAUM, H. Instrumentation. In: **Echocardiography**. 4.ed. Philadelphia. Lea and Febiger, cap.1, p.1-49, 1986.

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

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

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

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

FINN-BODNER, S. T.; HUDSON, J. A. Abdominal vascular sonography. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.28(4), p.887-942, 1998.

FIORATTI, E.G. **Efeito dos anti-inflamatórios esteroides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial**. 2010. 141f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu – SP, 2010.

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

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v.131, p.699–709, 2006.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects**. 2 ed. Madison: Equiservices, 1992. 642p.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques and Potencial. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24 (12), p.516- 526, 2004.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: **Color-Doppler Ultrasonography, Book 4**. WI: Equiservices Publishing, Cross Plains, 2007.

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. Relationship of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v.77, p.202-208, 2007b.

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v.71, p.780–788, 2009.

HAN, G.; MAGEE, T.; KHORRAM, O. Regulation of nitric oxide synthase isoforms by estrogen in the human endometrium. **Fertil Steril**, v.84(2), p.1220-1227, 2005.

HERVÉ, M.A.; MEDURI, G.; PETIT, F.G.; DOMET, T.S.; LAZENNEC, G.; MOURAH, S.; PERROT-APPLANAT, M. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. **J Endocrinol**, v.188, p.91-99, 2006.

HONNENS, A.; WEISSER, S.; WELTER, H.; EINSPANIER, R.; BOLLWEIN, H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of

endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. **Journal of Reproduction and Development**, v.57, p.43-48, 2011.

HUANG, J.C.; LIU, D.Y.; DAWOOD, M.Y. The expression of vascular endothelial growth factor isoforms in cultured human endometrial stromal cells and its regulation by 17beta-oestradiol. **Mol Hum Reprod**, v.4, p.603-607, 1998.

JACOB, J.C.F., **Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades**. 2007. 41f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa – MG, 2007.

JACOBS, R.D.; WARREN, L.K.; MORTENSEN, C.J. Effect of oral L-arginine supplementation on uterine blood flow and fluid clearance in mares during estrus. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.373-374, 2013.

JAROSZEWSKI, J.J.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. **Nitric oxide as a local regulator in the mamalian ovary**. In: Miyamoto H, Manabe N, editors. Reproductive biotechnology: reproductive biotechnology update and its related physiology. Tokyo, Japan: Elsevier Scientific Pub.; 2001. p. 105–12.

JAROSZEWSKI, J.J.; BOGACKI, M.; SKARZYNSKI, D.J. Progesterone production in bovine luteal cells treated with drugs that modulate nitric oxide production. **Reproduction**, v.125, p.389–95, 2003.

JOHNSON, M.C.; MALIQUEO, M.; BORIC, M.A.; VILLAVICENCIO, A.; VANTMAN, D.; VEGA, M. Differential in vitro actions of nitric oxide on human endometrial cell survival. **Fert Steril**, v.8(1), p.176–84, 2004.

KAWAKAMA, J. et al. Física. In: CERRI, G.G.; ROCHA, D.C. **Ultra-sonografia Abdominal**. São Paulo: Sarvier, cap.1, p.1-14, 1993.

KELLEY, D.E.; WARREN, L.K.; MORTENSEN, C.J. Oral L-arginine supplementation impacts several reproductive parameters during the postpartum period in mares. **Animal Reproduction Science**, v.138, p.233-240, 2013.

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

KLEIN, N.A.; BATTAGLIA, D.E.; FUJIMOTO, V.Y.; DAVIS, G.S.; BREMNER, W.J.; SOULES, M.R. Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, p.1038–1045, 1996.

KOSKINEN, E.; KUNTSI, H.; LINDEBERG, H.; KATILA, T. Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. **Journal of Veterinary Medicine**, v.36, p.299–304, 1989.

KUSPESIC, S.; KURJAK, A.; BJELOS, D.; VUJISIC, S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. **Fertil Steril**, v.79, p. 532-537, 2003.

LEE, K.S.; JOO, B.S.; NA, Y.J.; YOON, M.S.; CHOI, O.H.; KIM, W.W. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular and oocyte quality. **J Assist Reprod Genet**, v.17, p.222-228, 2000.

MAGNESS, R.R.; SHIDEMAN, C.R.; HABERMEHL, D.A.; SULLIVAN, J.A.; BIRD, I.M. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. V. Effects of ovariectomy, the ovarian cycle, and pregnancy on prostacyclin synthase expression. **Prostaglandin Other Lipid Mediat**, v.60, p.103–18, 2000.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of Reproduction**, v.73, p.45–53, 2005.

MATEO, R.D.; WU, G.; BAZER, F.W.; PARK, J.C.; SHINZATO, I.; KIM, S.W. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. **J. Nutr.**, v.137, p.652-656, 2007.

MAYLAN, W.G. VEGF increases permeability of the blood–brain barrier via nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. **American Journal of Physiology**, v.276, p.1148–1153, 1999.

MCCANN, S.M.; MASTRONARDI, C.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V; YU, W.H. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p.381-390, 2003.

MCCANN, S.M.; KARANTH, S.; KIMURA, M.; YU, W.H.; RETTORI, V. The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. **Braz J Biol**, v.56, p.1095-112, 1996.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, E.W.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2ed. v.2, 2011.3132p.

MORTENSEN, C. J.; KELLEY, D. E.; WARREN, L.K. Supplemental L-Arginine shortened gestation length and increases mare uterine blood flow before and after parturition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31(9), p.1-7, 2011.

MUROHARA, T.; WITZENBICHLER, B.; SPYRIDOPOULOS, I.; ASAHARA, T.; DING, B.; SULLIVAN, A. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.19(5), p.1156–1161, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of horses**. 6<sup>th</sup> revised ed. Washington, DC: The National Academic Press, 2007.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**, v.269, p.13725-13728, 1994.

NAYAK, N.R.; BRENNER, R.M. Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.1845-1855, 2002.

NG, E.H.; TANG, O.S.; HO, P.C. The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme. **Human Reproduction**, v.15, p.1937–1942, 2000.

NG, E.H.; CHAN, C.C.; YEUNG, W.S.; HO, P.C. Effect of age on ovarian stromal flow measured by three-dimensional ultrasound with power Doppler in Chinese women with proven fertility. **Human Reproduction**, v.19, p.2132-2137, 2004.

PALMER, R.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, p.524–526, 1987.

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

PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; SHORT, C.R.; GODKE, R.A. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovulation in hCG-stimulated mares. **Theriogenology**, v.58(5), p.1017–1026, 2002.

POULOS, T.L. Soluble guanylate cyclase. **Current Opinion in Structural Biology**, v.16, p. 736-743, 2006.

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

REYNOLDS, L.P.; KILLILEA, S.D.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB J**, v.6, p.886–892, 1992.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v.12, p.1–9, 2000.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system: pathological implications. **International Journal of Experimental Pathology**, v.83, p.151–164, 2002.

RIVERS, B.J.; WALTER, P.A.; O'BRIEN, T.D. et al. Duplex Doppler estimation of Pourcelot Resistive Index in arcuate arteries of sedated normal cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10(1), p.28-33, 1996.

ROBERTO DA COSTA, R.P.; FERREIRA-DIAS, G.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; ANDRONOWSKA, A.; PLATEK, R.; SKARZYNSKI, D.J. Endometrial nitric oxide production and nitric oxide synthases in the equine endometrium: Relationship with microvascular density during the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.2787-302, 2007.

ROMANO, R. M.; FERREIRA, J. C.; CANESIN, H. S.; IGNÁCIO, F. S.; NOVAES FILHO, L. F.; MEIRA, C. Luteal vascular perfusion and plasma progesterone

concentration are not affected by the vascularity of preovulatory follicle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p. 421, 2012.

ROSSELLI, M.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction**, v.4, p.3-24, 1998.

SAMPER, J.C. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. **AAEP PROCEEDINGS**, v.43, p.189-191, 1997.

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

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v.3(3), p.339-346, 2006.

SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v.62, p.227–243, 2004.

SHIFREN, J.L.; TSENG, J.F.; ZALOUDEK, C.J.; RYAN, I.P.; MENG, Y.G.; FERRARA, N.; JAFFE, R.B.; TAYLOR, R.N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, p.3112-3118, 1996.

SHOKEIR, A.A.; SHOMA, A.M.; ABUBIEH, E.A.; NASSER, M.A.; EASSA, W.; EL-ASMY, A. Recoverability of renal function after relief of acute complete ureteral

obstruction: clinical prospective study of the role of renal resistive index. **Urology**, v.59, n.4, p.506-510, 2002.

SPRAGUE, B.J.; PHERNETTON, T.M.; MAGNESS, R.R.; CHESLER, N.C. The effects of the ovarian cycle and pregnancy on uterine vascular impedance and uterine artery mechanics. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, S.144, p.S170–S178, 2009.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.42(2), p.93-107, 2001.

SNYDER, S.H. Nitric oxide: no endothelial NO. **Nature**, v.377(6546), p.196–197, 1995.

TELFER, J.F.; LYALL, F.; NORMAN, J.E.; CAMERON, I.T. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. **Human Reproduction**, v.10(1), p.19–23, 1995.

TELFER, J.F.; IRVINE, G.A.; KOHNEN, G.; CAMPBELL, S.; CAMERON, I.T. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. **Mol Human Reprod**, v.3(1), p.69–75, 1997.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.; ING, M.; PASCOE, J.; THURMOND, M. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J Reprod Fertil**, v.99, p.307-313, 1993.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; FREEMAN, D.A.; WEBER, J.A.; ROCK, R.W.; TESTER, D.F. Ovarian follicles, ovulations and progesterone concentrations in aged versus young mares. **Theriogenology**, v.40, p.22-32, 1993.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRE, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2 ed [S.1.]: Wiley Blackwell, 2011. p.1637-1641.

VERMILLON, R.P. Basic physical principles. In: SNIDER, A.R. et al. **Echocardiography in pediatric heart disease**, 2.ed. Missouri: Mosby, cap.1, p.1-10, 1997.

ZENG, X.; WANG, F.; FAN, X.; YANG, W.; ZHOU, B.; LI, P. Dietary arginine supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival in rats. **J Nutr**, v.138, p.1421-5, 2008.

WELTER, H.; BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; ROHN, S.; EINSPANIER, R. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases is modulated in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reprod Fertil Dev**, v.16(7), p.689–698, 2004.

WU, G.; BAZER, F.W.; CUDD, T.A.; JOBGEN, W.S.; KIM, S.W.; LASSALA, A. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. **J Nutr**, v.137, p.1673S-1680S, 2007.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIES T.A.; KIM, S.W.; LI, P.; RHOADS, J.M. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids**, v.37, p.153-168, 2009.

YALLAMPALLI, C.; DONG, Y.L. Estradiol-17beta inhibits nitric oxide synthase (NOS)-II and stimulates NOS-III gene expression in the rat uterus. **Biol Reprod**, v.63, p.34-41, 2000.

YOON, M.J.; BOIME, I.; COLGIN, M.; NISWENDER, K.D.; KING, S.S.; ALVARENGA, M.; JABLONKA-SHARIFF, A.; PEARL, C.A.; ROSER, J.F. The

efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH) in mares: induction of ovulation, hormone profiles, and inter-ovulatory intervals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, p.470–479, 2007.

## 9. TRABALHO CIENTÍFICO

### 9.1. Trabalho enviado para revista “Veterinária e Zootecnia”

#### **COMPARAÇÃO DO PERFIL HORMONAL E PERFUSÃO VASCULAR FOLICULAR, LUTEAL E UTERINA ENTRE ÉGUAS JOVENS E IDOSAS**

#### **COMPARISON OF HORMONAL PROFILE AND FOLLICULAR, LUTEAL AND UTERINE VASCULAR PERFUSION BETWEEN YOUNG AND OLD MARES**

#### **COMPARACIÓN DE PERFIL HORMONAL Y PERFUSION VASCULAR FOLICULAR, LUTEAL Y UTERINO ENTRE JÓVENES Y VIEJOS YEGUAS**

##### Resumo

A perfusão vascular do folículo pré-ovulatório vem sendo positivamente correlacionado a taxa de gestação. Assim como, o aumento da perfusão vascular no útero pode resultar em maiores taxas de sobrevivência fetal. A ultrassonografia Doppler permite uma avaliação não invasiva e em tempo real da hemodinâmica do sistema reprodutivo. O objetivo do presente estudo foi comparar o perfil hormonal e a perfusão vascular folicular, luteal e uterina de éguas jovens e idosas. Para tanto, foram utilizadas 10 éguas jovens (4-10 anos de idade) e 12 éguas idosas ( $\geq 20$  anos). Amostras de sangue foram coletadas diariamente para análise de FSH, LH, P4 e E2, por radioimunoensaio. A perfusão vascular folicular, luteal e uterina não diferiu entre éguas jovens e idosas. As concentrações plasmáticas de FSH e LH foram maiores em éguas jovens; as concentrações plasmáticas de P4 foram superiores em éguas idosas e não houve diferença entre os grupos de éguas jovens e idosas nas concentrações plasmáticas de E2. Conclui-se que não existe diferença na perfusão vascular folicular, luteal e uterina entre éguas jovens e idosas. Existem diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de FSH, LH e P4 entre éguas de diferentes faixas etárias. Sendo as concentrações plasmáticas de FSH e LH superiores nas éguas jovens e de P4 superior nas éguas idosas.

**Palavras-chave:** Vascularização, folículo, corpo lúteo, útero, senilidade.

##### Abstract

Vascular perfusion of the pre-ovulatory follicle has been positively correlated with pregnancy rate. As the increase of vascular perfusion in the uterus could result in higher rates of fetal survival. Doppler ultrasonography allows noninvasive and real-time hemodynamic assessment of the reproductive system. The aim of this study was to compare

the hormonal profile and follicular, luteal and uterine blood flow between young and old mares. To this, were used 10 young mares (4-10 years) and 12 old mares ( $\geq 20$  years). Blood samples were collected daily for analysis of FSH, LH, E2 and P4 by RIA. Follicular, luteal and uterine vascular perfusion did not differ between young and old mares. Plasma concentrations of FSH and LH were higher in young mares, plasma concentrations of P4 were higher in older mares and there was no difference between groups of young and old mares in plasma concentrations of E2. We conclude that there is no difference in the blood flow of follicular, luteal and uterine between young and old mares. There are significant differences in plasma concentrations of FSH, LH and P4 between mares of different ages. The plasma concentrations of FSH and LH are higher in young mares and P4 is higher in older mares.

**Keywords:** Vascularization, follicle, corpus luteum, uterus, senility.

## Resumen

Perfusión vascular del folículo preovulatorio se ha correlacionado positivamente con la tasa de embarazo. Dado que el incremento de la perfusión vascular en el útero podría dar lugar a mayores tasas de supervivencia del feto. La ecografía Doppler permite la evaluación hemodinámica invasiva en tiempo real y del sistema reproductivo. El objetivo de este estudio foi compararo perfil hormonal perfusión y folicular, luteal y de útero y pequeños mares vascular. Para ello, se utilizaron 10 yeguas jóvenes (4-10 años) y 12 yeguas de edad ( $\geq 20$  años). Las muestras de sangre se recogieron diariamente para el análisis de la FSH, LH, E2 y P4 por RIA. Folicular, luteal y la perfusión vascular uterina no difirieron entre yeguas jóvenes y viejas. Las concentraciones plasmáticas de FSH y LH fueron mayores en yeguas jóvenes, las concentraciones plasmáticas de P4 fueron mayores en yeguas mayores y no hubo diferencia entre los grupos de yeguas jóvenes y viejas en las concentraciones plasmáticas de E2. Llegamos a la conclusión de que no hay diferencia en la perfusión folicular, luteal y de útero entre jóvenes y yeguas viejas vascular. Existen diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y P4 entre yeguas de diferentes edades. Dado que las concentraciones plasmáticas de FSH y LH superior en yeguas jóvenes y mayor P4 en yeguas mayores.

**Palabras clave:** Vasculatura, folículo, cuerpo lúteo, útero, senilidad.

## 1. Introdução

O declínio da fertilidade relacionado à idade em fêmeas é um assunto bastante estudado e tem pelo menos dois componentes básicos: a diminuição da taxa de gestação por ciclo e aumento das taxas de morte embrionária e abortamento.

A perfusão vascular do folículo pré-ovulatório foi correlacionada positivamente com a taxa de gestação em éguas, Silva et al. (1) observaram que o grupo de éguas gestantes apresentaram maior perfusão vascular do folículo pré-ovulatório comparado ao grupo não gestante. Desta mesma maneira, a qualidade oocitária foi associada de forma positiva com a perfusão vascular folicular (2). Em éguas idosas múltiparas uma alta

resistência vascular do útero, com consequente diminuição da perfusão vascular, ocorreu devido ao grau de fibrose uterina (3).

A avaliação do folículo por ultrassonografia Doppler demonstrou que a perfusão vascular folicular foi maior em éguas idosas comparadas as éguas jovens, o que contradiz estudos realizados em mulheres, onde foi observada uma diminuição da vascularização ovariana com o aumento da idade (4, 5, 6, 7).

As concentrações plasmáticas de FSH foram superiores no grupo de éguas adultas comparado ao grupo de éguas jovens e idosas (8). Em vacas, o aumento nas concentrações plasmáticas de FSH é considerado um sinal de senilidade reprodutiva (9, 10).

Éguas idosas apresentaram menores concentrações plasmáticas de LH durante o período ovulatório (11), o q pode refletir no prolongamento da fase folicular (8), porém estes baixos valores hormonais não alteraram o processo de ovulação (11). Adicionalmente, no mesmo trabalho não foi encontrado efeito da idade nas concentrações sistêmicas de estrógeno.

O objetivo do presente estudo foi comparar a perfusão vascular folicular, luteal e uterina, por meio da ultrassonografia Doppler, e o perfil hormonal (LH, FSH, E2 e P4) de éguas jovens e idosas.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Animais

Foram utilizadas 22 éguas mestiças não gestantes e em bom estado corporal. O experimento foi realizado entre novembro de 2012 e março de 2013, no Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – CERBEQ (Posto de Monta), UNESP Botucatu (Latitude 22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"). Os animais foram mantidos em piquetes e alimentados com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*), ração concentrada, silagem de milho, suplementação mineral e acesso livre à água. Os procedimentos foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, câmpus de Botucatu.

### 2.2. Delineamento experimental

As éguas foram separadas em dois grupos: éguas jovens (n=10) com idade entre 4 e 10 anos e éguas idosas (n=12) com idade acima de 20 anos.

O trato reprodutivo foi avaliado por ultrassonografia via transretal modo-B utilizando o aparelho MyLab<sup>TM</sup>Five (ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, Itália) equipado com transdutor linear multifrequencial. Quando observado folículo  $\geq 30$  mm de diâmetro, o acompanhamento começou a ser diário até o 8º dia após a ovulação subsequente, por meio da ultrassonografia modo-B, *color* e espectral Doppler.

### 2.3. Avaliação por meio da ultrassonografia Doppler

Para avaliação objetiva da perfusão vascular do ovário, a artéria ovariana ipsilateral ao folículo dominante ou corpo lúteo foi avaliada por meio da ultrassonografia modo espectral Doppler (12). Para tanto, posicionou-se o cursor em uma artéria ovariana e um gráfico espectral, com no mínimo três ciclos cardíacos semelhantes, foi gerado. Deste, foi escolhido um ciclo cardíaco, que forneceu os valores dos Índices de Resistência (RI) e de Pulsatilidade (PI). Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes e a média dos valores encontrados foi utilizada para análise estatística.

A perfusão vascular folicular subjetiva, foi estimada levando-se em consideração o percentual da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos (1). Já a análise subjetiva da perfusão vascular luteal, foi estimada levando-se em consideração o percentual da área luteal com sinais Doppler coloridos (13).

A análise objetiva da perfusão vascular uterina foi realizada a partir da análise dos dados coletados das artérias uterinas direita e esquerda, em modo espectral Doppler (3). Para tanto, posicionou-se o cursor na artéria uterina e um gráfico espectral, com no mínimo três ciclos cardíacos semelhantes, foi gerado. Deste, foi escolhido um ciclo cardíaco, que forneceu os valores dos Índices de Resistência (RI) e de Pulsatilidade (PI). Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes em cada artéria uterina, e a média dos valores encontrados foi utilizada para análise estatística. E, a perfusão vascular subjetiva do útero foi estimada levando-se em consideração a quantidade de sinais Doppler coloridos presentes no mesométrio, miométrio e endométrio, em corte transversal do terço médio dos cornos uterinos. A classificação utilizada foi o escore de 1 a 4 (mínima e máxima perfusão vascular, respectivamente).

Todas as análises foram realizadas pelo mesmo operador, utilizando modo *color* Doppler (MyLab<sup>TM</sup>Five, ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, Itália). O escaneamento contínuo, em tempo real de 1 minuto e essas imagens armazenadas para posterior análise.

#### 2.4. Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos heparinizados de 10 ml no mesmo horário todas as tardes, iniciando no D-8 (D0 = dia da ovulação) e terminando no D8. As amostras de sangue foram centrifugadas (1500 xg) durante 10 minutos, e o plasma foi pipetado e armazenado em criotubo à 20 ° C até serem analisadas para LH, FSH, E2 e P4 por RIA validado.

#### 2.5. Ensaio hormonal

As concentrações plasmáticas hormonais (FSH, LH, E2 e P4) foram realizadas por radioimunoensaio (RIA), no laboratório da Dr. Janet Roser na Universidade da Califórnia, de acordo com (14).

##### 2.5.1. FSH

Para mensuração das concentrações de FSH no plasma sanguíneo das éguas, o FSH altamente purificado derivado de pituitária equina (e265B, Papkoff, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA) foi utilizado para os padrões (variando de 0,25 a 64 ng/mL) e para iodação. O anticorpo primário FSH anti-ovino (LS4-3D-2; Dr. DL Thompson, Universidade Estadual de Louisiana, Baton Rouge, Louisiana, EUA) foi usado na diluição 1/25.000. O anticorpo secundário utilizado foi o IgG de cabra anti-coelho (Equitech-Bio, Inc., Kerrville, Texas, EUA) na diluição de 1/100 em 5% de PEG e soro de coelho (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). A sensibilidade do ensaio foi de 0,5 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 3,0% (n = 8) e 7,5% (n = 5), respectivamente.

### 2.5.2. LH

Foi utilizado LH altamente purificado equino derivado de pituitária (2001B, Roser, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA) para a iodação e para os padrões, que variou de 0,125 a 32 ng/mL. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal LH  $\beta$  de rato anti-bovino (518B7; Roser, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA; ROSE et al., 1994) utilizados na diluição 1/200. O anticorpo secundário utilizado foi IgG de cabra anti-rato na diluição de 1/200 em 5% de PEG e soro de rato (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). A sensibilidade do ensaio foi de 0,25 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 2,4% (n = 8) e 6,1% (n = 6), respectivamente.

### 2.5.3. E2

Para mensurar a concentração plasmática de E2, utilizou-se o estradiol tritiado (1, 2, 6, 7 -3H- E2, NET -317, atividade específica 70-115 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Science, Boston, Massachusetts, EUA) como marcador. Os padrões (E950; Steraloids, Wilton, New Hampshire, EUA) variaram de 6,25 a 500 pg/mL. Para extração, 200  $\mu$ l de amostras de plasma ou de controle foram utilizados, com 2 mL de éter etílico anidro fresco (VWR, West Chester, Pensilvânia, EUA) e reconstituído com 300  $\mu$ L de PBS com 0,1% de gelatina de pele de suíno (PBS-G, Sigma, St Louis, Missouri, EUA). As amostras de plasma foram diluídas com PBS-G, quando necessário, para se adequar na curva padrão. O anticorpo primário utilizado foi o anti-estradiol-17 $\beta$ -6-BSA de carneiro (# 244, Niswender, Universidade Estadual do Colorado, Fort Collins, Colorado, EUA) utilizado na diluição 1/60.000. A eficiência da extração do plasma foi de 86,5%. A sensibilidade do ensaio foi de 10 pg/mL, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram 2,5% (n =6) e 6,0% (n =23), respectivamente.

### 2.5.4. P4

O anticorpo primário utilizado foi anti-P4-11-alfa-hemi: BSA de carneiro (diluição 1/13.000, #8939 Stabenfeldt, Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA), e o marcador foi 3H-progesterona (1, 2, 6, 7-3H-P4, NET381, atividade específica 90-115 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Science). Os padrões (Q2600; Steraloids) variaram de 0,1 a 20 ng/mL. Para extração, 40  $\mu$ l de amostras de plasma ou de controle foram utilizados, com 1mL de éter etílico anidro fresco (VWR, West Chester, Pensilvânia, EUA) e reconstituído com 100  $\mu$ L de PBS com 0,1% de gelatina de pele de suíno (PBS-G, Sigma, St Louis, Missouri, EUA). As amostras de plasma foram diluídas com PBS-G, quando necessário, para encaixar na curva padrão. A sensibilidade do ensaio foi de 0,2 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 3,5% (n = 6) e 8,4% (n = 23), respectivamente. A eficiência da extração foi de 75%.

## 2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Dados não distribuídos normalmente foram transformados para logaritmos naturais ou ranqueados para atingirem a normalidade. A análise dos dados foi feita utilizando o proc-mix do SAS (versão 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Diferenças entre grupos, momentos e interação entre grupos e momentos foram avaliadas pelo teste de LSD (diferença mínima significativa). Os testes t-pareado e não pareado foram utilizados para detectar diferenças significativas entre momentos e grupos, respectivamente. O nível de significância estatística foi definido como  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

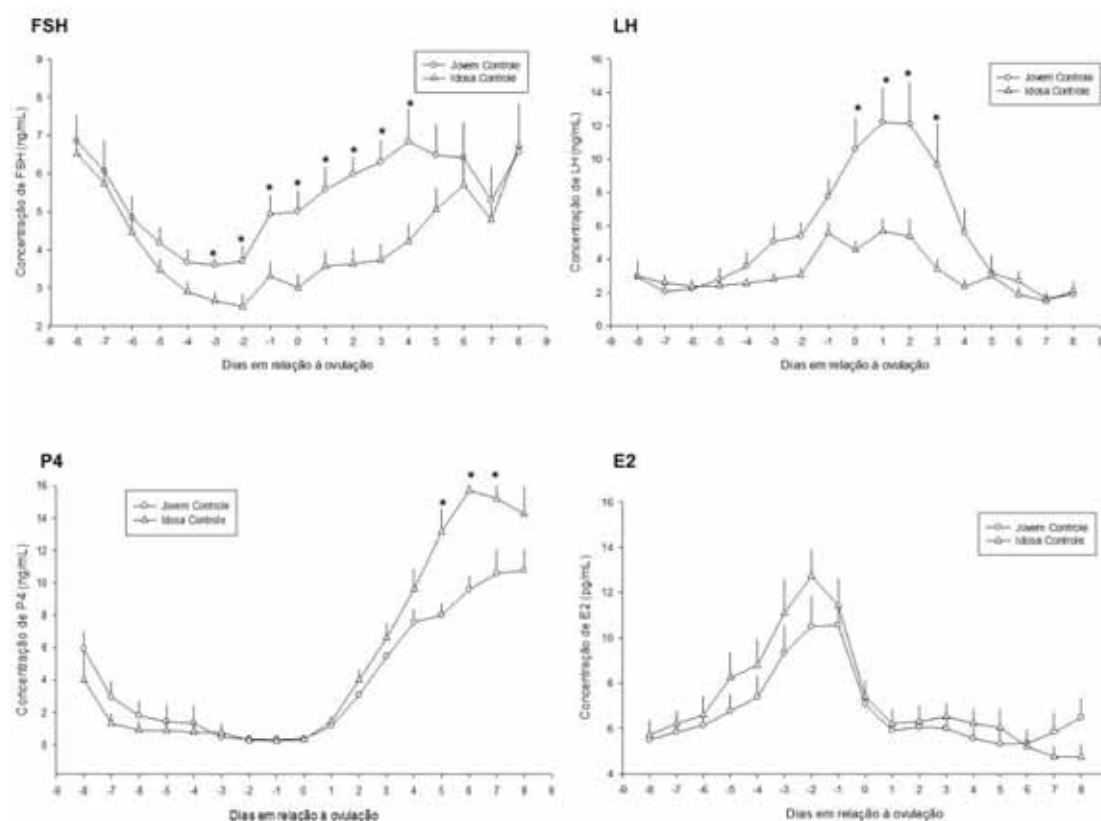
O período interovulatório apresentou duração média em éguas jovens de  $15 \pm 2,9$  dias e em éguas idosas de  $17,3 \pm 11,8$  dias. O período interovulatório no ciclo controle foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) para éguas jovens quando comparado à éguas idosas.

Durante a fase folicular, os parâmetros da perfusão vascular ovariana, PI e RI da artéria ovariana ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, não diferiram ( $p > 0,05$ ) os grupos de éguas jovens e idosas, nos três dias que antecederam a ovulação. Da mesma forma, não foi observada diferença na perfusão vascular folicular subjetiva e no tamanho folicular ( $p > 0,05$ ) entre os grupos.

Os parâmetros da perfusão vascular ovariana, PI e RI da artéria ovariana ipsilateral ao CL, assim como a avaliação subjetiva da vascularização do CL e a área luteal não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os grupos de éguas jovens e idosas, no período entre D0 e D8.

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) no PI, RI, perfusão vascular e edema uterino entre os grupos de éguas jovens e idosas, no período entre D-3 e D8.

Comparando o perfil hormonal entre os grupos de éguas jovens e idosas, observou-se maior concentração plasmática de FSH no grupo de éguas jovens ( $p < 0,05$ ), entre os dias -3 e 4 do ciclo. Similarmente, as concentrações plasmáticas de LH foram superiores no ciclo controle do grupo de éguas jovens ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo idoso, entre os dias 0 e 4 do ciclo. Ao passo que a P4, contrariamente ao FSH e LH, apresentou maiores concentrações ( $p < 0,05$ ) no ciclo controle do grupo de éguas idosas comparado às éguas jovens, no intervalo entre os dias 5 e 7 do ciclo. O E2 não diferiu entre os ciclos e grupos ( $p > 0,05$ ; Figura 1).



**Figura 1.** Médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de FSH, LH, P4 e E2, do ciclo controle de éguas jovens e idosas, no intervalo dos dias -8 a 8 do ciclo estral, considerando D0 o dia da ovulação. Asteriscos (\*) indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Os folículos de éguas idosas apresentaram-se mais vascularizados quando comparado aos de éguas jovens (4). Tais resultados são contrários ao esperado uma vez que segundo Ginther et al. (2) a qualidade oocitária está positivamente relacionada com a perfusão vascular folicular, desta forma o esperado era que éguas idosas, por apresentarem oócitos de pior qualidade (15), apresentassem menor perfusão vascular folicular. No entanto, no presente estudo não foi observado diferenças na análise subjetiva e objetivado folículo pré-ovulatório entre éguas jovens e idosas.

Como esperado, no presente trabalho o tamanho dos folículos pré-ovulatórios não se alteraram durante os três dias que antecederam a ovulação, uma vez que a ovulação foi induzida e o crescimento dos folículos foi cessado, coincidindo com os resultados encontrados por Gastal et al. (16), onde após o tratamento de indução da ovulação o folículo parou de crescer.

Não foi observada diferença no diâmetro do folículo pré-ovulatório entre éguas jovens e idosas. Resultados similares foram encontrados em estudos anteriores, nos quais também não observou-se diferenças no diâmetro do folículo pré-ovulatório entre éguas jovens e idosas no dia anterior à ovulação (11, 8, 17). Contrariamente, Davis Morel et al. (18) relataram que éguas jovens apresentaram maior diâmetro do folículo pré-ovulatório comparado à éguas idosas, demonstrando que a idade da égua teria um efeito negativo no

diâmetro folicular. Considerando que a viabilidade do oócito é reduzida com o avançar da idade (15), estes mesmos autores propuseram que esse processo talvez possa ser resultado de ovulação de folículos pré-ovulatórios menores, que não tenham sido submetidos a divisão meiótica final e/ou maturação antes da ovulação. Os trabalhos anteriormente citados não realizaram o tratamento para indução da ovulação nas éguas, ou seja, as éguas ovularam espontaneamente, sendo assim, não é possível estabelecer uma comparação entre os resultados do presente estudo, onde houve indução da ovulação e os encontrados na literatura, onde a ovulação foi espontânea.

Sabidamente a perfusão vascular do CL é importante para a obtenção de precursores de esteroides e para a liberação de P4 na circulação sanguínea (19). A perfusão vascular luteal apresentou-se baixa logo após a ovulação, período em que é encontrado o corpo hemorrágico, após este período, houve um aumento da perfusão vascular luteal, coincidindo com o período de luteogênese (20).

No presente estudo, o perfil da perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral, foi similar ao encontrado por Bollwein et al. (3; 12; 21), não sendo observada diferenças na perfusão vascular uterina entre éguas jovens e idosas. Entre as variáveis de avaliação da irrigação uterina estudadas, foi observado um mesmo padrão ondular ao longo do ciclo estral, com uma baixa perfusão vascular no dia 0, e valores elevados no início do diestro.

O período interovulatório observado no presente trabalho foi maior no grupo de éguas idosas comparado ao grupo de éguas jovens, no ciclo controle de ambos os grupos. Tal achado corrobora com a hipótese de Carnevale et al. (8) que sugeriram que o longo período interovulatório pode estar associado ao prolongado intervalo da indução da luteólise até a ovulação e, conseqüentemente, ao prolongamento da fase folicular. Outra hipótese para o prolongamento do período interovulatório nas éguas idosas seria o menor tamanho folicular ou menor número de folículos no momento da luteólise. E ainda, a diminuição nas concentrações plasmáticas de LH nas éguas idosas pode refletir no prolongamento da fase folicular, porém não parece interferir no processo de ovulação (8, 11).

As éguas jovens apresentaram maior concentração plasmática de FSH comparadas às éguas idosas, do dia -3 ao dia 4 pós-ovulação. Carnevale et al. (8) detectaram maiores concentrações plasmáticas de FSH no grupo de éguas adultas (15-19 anos) no D7, D10 e D12 pós ovulação. No trabalho desenvolvido por Ginther et al. (22) as concentrações plasmáticas diárias de FSH não diferiram entre os grupos de éguas nas faixas etárias estudadas, porém a concentração máxima de FSH foi significativamente maior no grupo das idosas ( $\geq 18$  anos) comparado ao das éguas jovens (5-6 anos) e adultas (10-14 anos). Sendo este aumento nas concentrações plasmáticas de FSH considerado um sinal de envelhecimento reprodutivo em vacas (9, 10) e mulheres (23, 24).

As éguas jovens apresentaram uma maior concentração plasmática de LH do D0 ao D4, quando comparadas às éguas idosas. O que corrobora com os resultados encontrados por Carnevale et al. (8), que observaram ter sido a concentração plasmática de LH menor em éguas idosas comparada às éguas jovens, no período de D-7 à D3. Da mesma forma, em um estudo de Ginther et al. (22), a concentração de LH foi mais elevada em éguas jovens, de D-7 à D4, estes autores sugerem que existam fatores extra ovarianos que influenciem o aumento do LH e tais fatores são maiores em éguas jovens. Além disso, a redução nas concentrações de LH nas éguas idosas parece estar relacionada com o prolongamento da fase folicular (8).

As concentrações plasmáticas de P4 foram superiores no grupo de éguas idosas comparado às éguas jovens, no período entre o D4 e D7. Esse achado difere dos encontrados por Ginther et al. (22), onde o grupo de éguas adultas (10-14 anos de idade) tiveram a concentração plasmática máxima de P4 mais elevada do que o grupo de jovens (5-6 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos). Já Carnevale (8) observaram que a concentração média de P4 em éguas idosas ( $\geq 20$  anos de idade) foi maior do que de éguas com idade intermediária (15-19 anos), mas não diferiu das éguas jovens (5-7 anos).

## 5. Conclusão

Os resultados nos permite concluir que não existe diferença na perfusão vascular folicular, luteal e uterina entre éguas jovens e idosas. Existem diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de FSH, LH e P4 entre éguas de diferentes faixas etárias. Sendo as concentrações plasmáticas de FSH e LH superiores nas éguas jovens e de P4 superior nas éguas idosas.

## 6. Referências

- (1) SILVA LA, GASTAL EL, GASTAL MO, BEG MA, GINTHER OJ, Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Animal Reproduction*. 2006; 3: 339-346.
- (2) GINTHER OJ, GASTAL EL, GASTAL MO, SIDDIQUI MAR, BEG MA. Relationship of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. *Biology of Reproduction*. 2007; 77: 202-8.
- (3) BOLLWEIN H, MAIERL R, STOLLA R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. *Theriogenology*. 1998; 49: 1483-8.
- (4) ALTERMATT JL, MAROLF AJ, WRIGLEY RH, CARNEVALE EM. Effects of FSH and LH on ovarian and follicular blood flow, follicular growth and oocyte developmental competence in young and old mares. *Animal Reproduction Science*. 2012; 133: 191-7.
- (5) KUSPESIC S, KURJAK A, BJELOS D, VUJISIC S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril*. 2003; 79: 532-7.
- (6) NG E.H, CHAN CC, YEUNG WS, HO PC. Effect of age on ovarian stromal flow measured by three-dimensional ultrasound with power Doppler in Chinese women with proven fertility. *Human Reproduction*. 2004; 19: 2132-7.
- (7) COSTELLO MF, SHRESTHA SM, SJOBLUM P, MCNALLY G, BENNETT MJ, STEIGRAD SJ, et al. Power Doppler ultrasound assessment of relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J. Assist Reprod Genet*, 2006; 23: 359-365.

- (8) CARNEVALE EM, BERGFELT DR, GINTHER OJ. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Animal Reproduction Science*. 1993; 31: 287-299.
- (9) SINGH J, DOMÍNGUEZ M, JAISWAL R, ADAMS GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*. 2004; 62: 227-243.
- (10) MALHI PS, ADAMS GP, SINGH J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction*. 2005; 73: 45-53.
- (11) JACOB JCF. Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades [tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2007.
- (12) BOLLWEIN H, WEBER F, KOLBERG B, STOLLA R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002; 65: 2129-2138.
- (13) BOLLWEIN H, MAYER R, WEBER F, STOLLA R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002; 65: 2043-2051.
- (14) YOON MJ, BOIME I, COLGIN M, NISWENDER KD, KING SS, ALVARENGA M, et al. The efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH) in mares: induction of ovulation, hormone profiles, and inter-ovulatory intervals. *Domestic Animal Endocrinology*. 2007; 33: 470-9.
- (15) CARNEVALE EM, USON M, BOZZOLA JJ, KING SS, SCHIMITT SJ, GATES HD. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. *Theriogenology*. 1999; 51: 299.
- (16) GASTAL EL, GASTAL MO, GINTHER OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*. 2006; 131: 699-709.
- (17) GINTHER OJ, GASTAL MO, GASTAL EL, JACOB JC, BEG MA. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. *Theriogenology*. 2009; 71: 780-8.
- (18) DAVIES MOREL MCG, NEWCOMBE JR, HAYWARD K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology*. 2010; 74: 1241-7.
- (19) FERREIRA-DIAS G, COSTA A, MATEUS L, KORZEKWA A, REDMER D, SKARZYNSKI D. Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006, 57: 139-151.

- (20) AL-ZI'ABI MO, WATSON ED, FRASER HM. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*. 2003; 125: 259-270.
- (21) BOLLWEIN H, KOLBERG B, STOLLA R. The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2004; 61: 1137-1146.
- (22) GINTHER OJ, GASTAL MO, GASTAL EL, JACOB JC, SIDDIQUI MAR, BEG MA. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. *Reprod Fert Develop*. 2008; 20: 955-963.
- (23) KLEIN NA, BATTAGLIA DE, FUJIMOTO VY, DAVIS GS, BREMNER WJ, SOULES MR. Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 1038-1045.
- (24) NG EH, TANG OS, HO PC. The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme. *Human Reproduction*. 2000; 15: 1937-1942.

## 9.2. Normas da revista “Veterinária e Zootecnia”

### 1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

### 2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

### 3. A estrutura do artigo deverá conter:

**Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

**Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem

interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

**Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

**Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

**Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

**Deverão** ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

- **Artigos de Revisão Bibliográfica**

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

- **Relato de Caso**

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

- **Comunicações Curtas**

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

- **Referências e Citações**

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

## **Exemplos**

### *Citações*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias. Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização Herbsman et

al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (21-26).

### *Referências*

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

#### **1. Artigo de revista**

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

#### **2. Organização como autor**

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

#### **3. Livro**

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

#### **4. Capítulo de livro**

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

#### **5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc**

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

#### **6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos**

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

#### **7. Publicações disponíveis na Internet**

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from:

## 10. ANEXOS

**Tabela 1:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVF e as concentrações plasmáticas de FSH, LH e E2 durante o período de estro do ciclo controle de éguas jovens.

|     | FSH      | LH       | E2      |
|-----|----------|----------|---------|
| PI  | r=0,085  | r=0,191  | r=0,355 |
|     | p=0,678  | p=0,349  | p=0,075 |
| RI  | r=-0,148 | r=0,149  | r=0,295 |
|     | p=0,462  | p=0,457  | p=0,136 |
| PVF | r=0,225  | r=-0,134 | r=0,740 |
|     | p=0,507  | p=0,695  | p=0,009 |

**Tabela 2:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVF e as concentrações plasmáticas de FSH, LH e E2 durante o período de estro do ciclo controle de éguas idosas.

|     | FSH     | LH       | E2       |
|-----|---------|----------|----------|
| PI  | r=0,225 | r=-0,234 | r=-0,395 |
|     | p=0,215 | p=0,198  | p=0,025  |
| RI  | r=0,172 | r=-0,200 | r=-0,396 |
|     | p=0,348 | p=0,273  | p=0,025  |
| PVF | r=0,095 | r=0,386  | r=-0,192 |
|     | p=0,769 | p=0,215  | p=0,550  |

**Tabela 3:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVF e as concentrações plasmáticas de FSH, LH e E2 durante o período de estro do ciclo tratado com arginina de éguas jovens.

|     | FSH     | LH       | E2       |
|-----|---------|----------|----------|
| PI  | r=0,254 | r=-0,027 | r=-0,206 |
|     | p=0,266 | p=0,907  | p=0,370  |
| RI  | r=0,092 | r=0,127  | r=-0,307 |
|     | p=0,690 | p=0,584  | p=0,177  |
| PVF | r=0,539 | r=-0,272 | r=0,626  |
|     | p=0,168 | p=0,514  | p=0,097  |

**Tabela 4:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVF e as concentrações plasmáticas de FSH, LH e E2 durante o período de estro do ciclo tratado com arginina de éguas idosas.

|            | <b>FSH</b>          | <b>LH</b>          | <b>E2</b>          |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| <b>PI</b>  | r=-0,338<br>p=0,068 | r=0,163<br>p=0,390 | r=0,227<br>p=0,228 |
| <b>RI</b>  | r=-0,414<br>p=0,023 | r=0,016<br>p=0,935 | r=0,157<br>p=0,408 |
| <b>PVF</b> | r=0,299<br>p=0,345  | r=0,179<br>p=0,577 | r=0,251<br>p=0,431 |

**Tabela 5:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVCL e as concentrações plasmáticas de LH, E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo controle de éguas jovens.

|             | <b>LH</b>           | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>   | r=0,176<br>p=0,107  | r=-0,084<br>p=0,447 | r=-0,261<br>p=0,016 |
| <b>RI</b>   | r=0,110<br>p=0,316  | r=-0,106<br>p=0,336 | r=-0,187<br>p=0,087 |
| <b>PVCL</b> | r=-0,253<br>p=0,017 | r=0,028<br>p=0,792  | r=0,396<br>p<0,01   |

**Tabela 6:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVCL e as concentrações plasmáticas de LH, E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo controle de éguas idosas.

|             | <b>LH</b>           | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>   | r=-0,094<br>p=0,398 | r=0,084<br>p=0,448  | r=-0,175<br>p=0,113 |
| <b>RI</b>   | r=-0,088<br>p=0,430 | r=0,153<br>p=0,166  | r=-0,219<br>p=0,046 |
| <b>PVCL</b> | r=-0,260<br>p=0,008 | r=-0,285<br>p=0,003 | r=0,527<br>p<0,01   |

**Tabela 7:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVCL e as concentrações plasmáticas de LH, E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo tratado com arginina de éguas jovens.

|             | <b>LH</b>           | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>   | r=0,142<br>p=0,228  | r=-0,210<br>p=0,072 | r=-0,278<br>p=0,016 |
| <b>RI</b>   | r=0,291<br>p=0,012  | r=-0,018<br>p=0,880 | r=-0,291<br>p=0,012 |
| <b>PVCL</b> | r=-0,178<br>p=0,116 | r=-0,007<br>p=0,949 | r=0,591<br>p<0,01   |

**Tabela 8:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria ovariana, PVCL e as concentrações plasmáticas de LH, E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo tratado com arginina de éguas idosas.

|             | <b>LH</b>           | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>   | r=-0,072<br>p=0,537 | r=0,288<br>p=0,012  | r=-0,293<br>p=0,011 |
| <b>RI</b>   | r=-0,027<br>p=0,816 | r=0,283<br>p=0,014  | r=-0,235<br>p=0,043 |
| <b>PVCL</b> | r=-0,448<br>p<0,01  | r=-0,273<br>p=0,005 | r=0,751<br>p<0,01   |

**Tabela 9:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e a concentração plasmática de E2 durante o período de estro do ciclo controle de éguas jovens.

|            | <b>E2</b>           |
|------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=0,578<br>p=0,002  |
| <b>RI</b>  | r=0,400<br>p=0,043  |
| <b>PVU</b> | r=-0,132<br>p=0,522 |

**Tabela 10:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e a concentração plasmática de E2 durante o período de estro do ciclo controle de éguas idosas.

|            | <b>E2</b>           |
|------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=-0,306<br>p=0,128 |
| <b>RI</b>  | r=-0,148<br>p=0,469 |
| <b>PVU</b> | r=0,248<br>p=0,194  |

**Tabela 11:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e a concentração plasmática de E2 durante o período de estro do ciclo tratado com arginina de éguas jovens.

|            | <b>E2</b>           |
|------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=0,045<br>p=0,833  |
| <b>RI</b>  | r=0,211<br>p=0,322  |
| <b>PVU</b> | r=-0,131<br>p=0,561 |

**Tabela 12:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e a concentração plasmática de E2 durante o período de estro do ciclo tratado com arginina de éguas idosas.

|            | <b>E2</b>          |
|------------|--------------------|
| <b>PI</b>  | r=0,119<br>p=0,562 |
| <b>RI</b>  | r=0,060<br>p=0,774 |
| <b>PVU</b> | r=0,328<br>p=0,078 |

**Tabela 13:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e as concentrações plasmáticas de E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo controle de éguas jovens.

|            | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=-0,069<br>p=0,560 | r=-0,125<br>p=0,288 |
| <b>RI</b>  | r=-0,068<br>p=0,563 | r=0,022<br>p=0,854  |
| <b>PVU</b> | r=0,053<br>p=0,623  | r=0,287<br>p=0,006  |

**Tabela 14:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e as concentrações plasmáticas de E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo controle de éguas idosas.

|            | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=0,168<br>p=0,195  | r=-0,373<br>p=0,003 |
| <b>RI</b>  | r=0,200<br>p=0,121  | r=-0,432<br>p<0,01  |
| <b>PVU</b> | r=-0,079<br>p=0,458 | r=-0,064<br>p=0,550 |

**Tabela 15:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e as concentrações plasmáticas de E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo tratado com arginina de éguas jovens.

|            | <b>E2</b>           | <b>P4</b>           |
|------------|---------------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=-0,062<br>p=0,622 | r=-0,020<br>p=0,875 |
| <b>RI</b>  | r=0,021<br>p=0,869  | r=0,004<br>p=0,977  |
| <b>PVU</b> | r=-0,106<br>p=0,369 | r=0,277<br>p=0,017  |

**Tabela 16:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU e as concentrações plasmáticas de E2 e P4 durante o período de diestro do ciclo tratado com arginina de éguas idosas.

|            | <b>E2</b>          | <b>P4</b>           |
|------------|--------------------|---------------------|
| <b>PI</b>  | r=0,086<br>p=0,534 | r=-0,194<br>p=0,157 |
| <b>RI</b>  | r=0,125<br>p=0,362 | r=-0,121<br>p=0,379 |
| <b>PVU</b> | r=0,006<br>p=0,954 | r=0,226<br>p=0,022  |

**Tabela 17:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU, as concentrações plasmáticas de E2 e P4 e a concentração de ON no D8 (considerando D0=dia da ovulação) do ciclo controle de éguas jovens.

|           | <b>PI</b>          | <b>RI</b>          | <b>PVU</b>         | <b>E2</b>          | <b>P4</b>          |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>ON</b> | r=0,539<br>p=0,349 | r=0,880<br>p=0,049 | r=0,508<br>p=0,382 | r=0,766<br>p=0,131 | r=0,787<br>p=0,114 |

**Tabela 18:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU, as concentrações plasmáticas de E2 e P4 e a concentração de ON no D8 (considerando D0=dia da ovulação) do ciclo controle de éguas idosas.

|           | <b>PI</b>           | <b>RI</b>           | <b>PVU</b>         | <b>E2</b>           | <b>P4</b>          |
|-----------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| <b>ON</b> | r=-0,837<br>p=0,368 | r=-0,971<br>p=0,153 | r=0,374<br>p=0,361 | r=-0,040<br>p=0,927 | r=0,274<br>p=0,512 |

**Tabela 19:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU, as concentrações plasmáticas de E2 e P4 e a concentração de ON no D8 (considerando D0=dia da ovulação) do ciclo tratado com arginina de éguas jovens.

|    | PI                 | RI                 | PVU                 | E2                  | P4                  |
|----|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| ON | r=0,298<br>p=0,567 | r=0,275<br>p=0,597 | r=-0,179<br>p=0,734 | r=-0,626<br>p=0,183 | r=-0,720<br>p=0,107 |

**Tabela 20:** Coeficiente de correlação (r) e valores p, por meio da análise da Correlação de Pearson, entre as variáveis PI, RI da artéria uterina, PVU, as concentrações plasmáticas de E2 e P4 e a concentração de ON no D8 (considerando D0=dia da ovulação) do ciclo tratado com arginina de éguas idosas.

|    | PI                  | RI                  | PVU                 | E2                 | P4                  |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| ON | r=-0,352<br>p=0,771 | r=-0,342<br>p=0,778 | r=-0,109<br>p=0,780 | r=0,269<br>p=0,485 | r=-0,141<br>p=0,718 |