

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

EFEITO DE DOIS PERÍODOS DE TRATAMENTO
COM ALTRENOGEST SOBRE A MANUTENÇÃO
DA GESTAÇÃO EM ÉGUAS RECEPTORAS
ACÍCLICAS

ELISA SANT'ANNA MONTEIRO DA SILVA

Botucatu – SP
2012

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

EFEITO DE DOIS PERÍODOS DE TRATAMENTO
COM ALTRENOGEST SOBRE A MANUTENÇÃO
DA GESTAÇÃO EM ÉGUAS RECEPTORAS
ACÍCLICAS

ELISA SANT'ANNA MONTEIRO DA SILVA

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

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de
Meira

Co-orientador: Prof. Dr. José Nicolau
Próspero Puoli Filho

Nome do autor: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Título: EFEITO DE DOIS PERÍODOS DE TRATAMENTO COM
ALTRENOGEST SOBRE A MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO EM ÉGUAS
RECEPTORAS ACÍCLICAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Dr^a Cláudia Barbosa Fernandes

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 27 de fevereiro de 2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria de Lourdes Sant'Anna Monteiro e Orlando Monteiro da Silva, pela orientação e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Devo tudo o que sou e todas as minhas conquistas a eles. Deixo registrado aqui a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cezinande de Meira, pela orientação, paciência, ensinamentos e pelo exemplo de caráter e honestidade.

Ao Professor José Nicolau P. Puoli Filho e ao José Antônio Dell'Aqua Júnior, por cederem suas éguas para dar continuidade ao experimento em Botucatu, o que permitiu a conclusão do trabalho. Além disso, agradeço ao Prof. Nicolau pelas grandes oportunidades oferecidas.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – Unesp - Botucatu, especialmente aos Professores Sony Dimas Bicudo e Nereu Carlos Prestes, pelos sábios ensinamentos e pela agradável convivência.

Ao Professor José Carlos Pantoja, pela colaboração com as análises estatísticas do trabalho.

À Prof. Eunice Oba e ao Prof. Guilherme de Paula Nogueira, por disponibilizarem os Laboratório de Endocrinologia da FMVZ – Unesp – Botucatu e o Laboratório de Endocrinologia da Unesp – Araçatuba, respectivamente, para realizar as dosagens de progesterona das éguas do experimento.

À Sandra Frade e ao Zé Ricardo, por possibilitar a realização do projeto de mestrado e por me acolher com grande carinho durante longos meses em sua casa em Mira Estrela – SP.

Aos funcionários Tonho, Zé Bico (Mira Estrela), Gilson e Adenilson (Botucatu) pelo auxílio com os animais durante o desenvolvimento do experimento.

Ao meu irmão Guilherme, por compartilhar comigo os melhores momentos da minha vida e ser um exemplo para mim.

Ao meu namorado Diego, pela paciência ao me ouvir nos períodos difíceis do experimento, pela força dada em todos os momentos e principalmente pelo companheirismo.

Aos amigos de Botucatu, Bianca Andriolo, Camila Louise, Roberta Valeriano, Carlos Ramires Neto, Gabriela Dantas, Gabriel Monteiro, Fernanda Saules e Aline Rocha pela amizade, companhia, força e ajuda nesses dois anos de mestrado.

Aos eternos amigos de Viçosa, Marina Linhares, Flora Passos, Natália Fontes, Letícia Minette, Mírian Santana, Larissa Campos, Hugo Galvão, Guilherme Lima, Goshai Daian, Elton Gonçalves, Jorcelino Gontijo, Maria Fernanda Mantovani, Flávia Xavier, Gláucia Amaral e Mariana Miranda, que apesar da distância física, sempre estiveram e estarão presentes na minha vida.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de mestrado e do auxílio financeiro, o que possibilitou a realização do projeto.

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>Tabela 1: Fase reprodutiva encontrada no início do tratamento com altrenogest, primeira detecção dos CLS por meio da ultrassonografia, total de CLS formados até os 70 dias, concentração de progesterona encontrada no dia da interrupção hormonal e ocorrência de perda ou manutenção gestacional após a interrupção, por égua, no grupo 70ALT.....</p>	21
<p>Tabela 2: Fase reprodutiva encontrada no início do tratamento com altrenogest, primeira detecção dos CLS por meio da ultrassonografia, total de CLS formados até os 120 dias, concentração de progesterona encontrada no dia da interrupção hormonal e ocorrência de perda ou manutenção gestacional após a interrupção, por égua, no grupo 120ALT.....</p>	21
<p>Tabela 3: Total de CLS formados por animal até os 130 dias de gestação e média (\pmE.P.M.), em dias, da primeira detecção dos CLS nos grupos 70ALT, 120ALT e Controle.....</p>	22
<p>Tabela 4: Total de CLS formados por animal até os 130 dias de gestação e média (\pmE.P.M.), em dias, da primeira detecção dos CLS nos grupos Anestro, Transição e Controle.....</p>	23
<p>Tabela 5: Diâmetro (Média\pmE.P.M.) da vesícula embrionária nos grupos Controle e Altrenogest, do dia 15 aos 45 de gestação.....</p>	30

Tabela 6: Comprimento (Média±E.P.M.) do embrião/feto nos grupos Controle e Altrenogest, do dia 20 aos 60 de gestação.....	30
Tabela 7: Número e período de formação dos corpos lúteos suplementares (CLS) por égua do grupo 70ALT até os 130 dias de gestação.....	73
Tabela 8: Número e período de formação dos corpos lúteos suplementares (CLS) por égua do grupo 120ALT até os 130 dias de gestação.....	74
Tabela 9: Número e período de formação dos corpos lúteos suplementares (CLS) por égua do grupo Controle até os 130 dias de gestação.....	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1: Mensurações ultrassonográficas (7,5 MHz): (A) Média da altura e largura (linhas vermelhas) da imagem congelada de vesícula embrionária com 15 dias de idade e (B) comprimento crânio-caudal (linha vermelha) de feto com 60 dias.....</p>	16
<p>Figura 2: Probabilidade dos animais não apresentarem formação dos corpos lúteos suplementares ao longo do tempo de gestação. Cada degrau representa as formações dos CLS. O grupo Anestro (A) formou aproximadamente 40% do total dos CLS até os 70 dias de gestação; grupo Transição (B) 85% e grupo Controle (C) 100% dos CLS. O símbolo (○) representa a ausência de dados relativos a formação dos CLS devido a perda embrionária entre 21 e 25 dias de gestação (n=3), bem como a não-formação até os 70 (n=1) e 130 (n=2) dias.....</p>	24
<p>Figura 3: Corpos lúteos suplementares apresentando diferentes características ultrassonográficas (7,5 MHz). (A) CLS com aspecto de folículo hemorrágico, (B) CLS ecogênico com centro anecóico (cavitário), (C) CLS esférico com ecogenicidade homogênea e (D) CLS com ecogenicidade homogênea em direção à fossa da ovulação.....</p>	26
<p>Figura 4: Concentrações de progesterona (Média±E.P.M.) do grupo Controle e do grupo de éguas acíclicas combinadas (70ALT + 120ALT). As setas representam o início da síntese de progesterona pelos CLS nos grupos.....</p>	28

- Figura 5:** Concentrações de progesterona (Média±E.P.M.) dos grupos Transição, Anestro e Controle. As setas representam o início da síntese de progesterona pelos CLS nos grupos..... 28
- Figura 6:** (A) Crescimento da vesícula embrionária (Média±E.P.M.) entre 15 e 45 dias de gestação nos grupos Altrenogest e Controle e (B) curva predita do crescimento vesicular..... 31
- Figura 7:** (A) Crescimento do embrião/feto (Média±E.P.M.) entre 20 e 60 dias de gestação nos grupos Altrenogest e Controle e (B) curva predita do crescimento embrionário/fetal..... 32
- Figura 8:** Perfil individual da concentração de progesterona de algumas éguas dos grupos 70ALT, 120ALT e Controle: (A) égua que apresentou a primeira formação dos CLS, por ovulação, aos 38 dias em média; éguas que apresentaram a primeira formação por luteinização, em média, aos 63 dias (M) e 93 dias (E); éguas que não apresentaram a formação de CLS até os 70 dias (G) e até os 130 dias (L); (P) égua com corpo lúteo primário e formação de CLS do grupo Controle. As setas representam a detecção do primeiro CLS. Na égua G foi observado abortamento aos 75 dias de gestação e a colheita de sangue e dosagem de P4 não foram realizadas nas avaliações seguintes..... 76

LISTA DE ABREVIações

- CLP** = corpo lúteo primário
- CLS** = corpo lúteo suplementar
- eCG** = gonadotrofina coriônica eqüina
- FSH** = hormônio folículo estimulante
- LH** = hormônio luteinizante
- mg** = miligrama
- mL** = mililitro
- mm** = milímetros
- ng** =nanograma
- P4** = progesterona
- TE** = transferência de embriões
- 5 α DHP** = 5 α dihidroprogesterona

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Aspectos relacionados à sazonalidade reprodutiva da égua.....	7
2.2 Síntese de progesterona durante a gestação em éguas.....	8
2.2.1 Corpo lúteo primário.....	9
2.2.2 Corpos lúteos suplementares.....	9
2.2.3 Unidade feto-placentária.....	10
2.3 Protocolos de progestágenos utilizados em éguas receptoras acíclicas.....	11
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Animais e grupos experimentais.....	14
4.2 Tratamento hormonal.....	15
4.3 Coleta, manipulação e transferência dos embriões.....	15
4.4 Exame ultrassonográfico.....	16
4.5 Colheita de sangue e dosagem de progesterona.....	17
4.6 Estatística.....	18
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Efeito de dois períodos de tratamento com altrenogest sobre a manutenção da gestação.....	20
5.2 Período de formação, número e características dos CLS.....	22
5.3 Perfil de progesterona.....	27
5.4 Desenvolvimento do conceito.....	29
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	50
ANEXOS.....	72

SILVA, E.S.M. **Efeito de dois períodos de tratamento com altrenogest sobre a manutenção da gestação em éguas receptoras acíclicas**. Botucatu, 2012. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Pouco se sabe sobre o perfil de progesterona (P4) sintetizada pelos corpos lúteos suplementares (CLS) e de que forma tais estruturas se relacionam com a gestação em receptoras gestantes acíclicas tratadas com progestágeno. Sendo assim, os principais objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do tratamento com altrenogest durante 70 ou 120 dias de gestação sobre a manutenção da gestação em receptoras acíclicas e correlacionar os achados com o número de CLS, tempo de formação e concentração de P4 encontrada no momento da interrupção do tratamento, visando melhorar a compreensão da fisiologia da gestação e avaliar a possibilidade de redução do tempo da administração de progestágenos em receptoras acíclicas gestantes. Foram avaliadas 25 éguas, gestantes por transferência de embrião (TE) na fase de anestro, transição e durante a estação de monta, distribuídas em diferentes agrupamentos, de acordo com a variável estudada: tempo de tratamento hormonal com altrenogest (grupos 70ALT, 120ALT e Controle), período de formação dos CLS e perfil de P4 (grupos Anestro, Transição e Controle). Os animais foram avaliados por meio de ultrassonografia e quantificação de P4 plasmática até os 130 dias de gestação. Após interrupção hormonal aos 70 dias no grupo 70ALT, observou-se manutenção de cinco gestações e dois abortamentos. No grupo 120ALT não ocorreu abortamento após a interrupção do tratamento aos 120 dias de gestação. O período médio (dias) da primeira formação dos CLS foi similar ($p=0,32$) nos grupos 70ALT e 120ALT e maior ($p<0,01$) que o encontrado no Controle. As médias da primeira formação dos CLS foram diferentes ($p<0,01$) entre os grupos Anestro, Transição e Controle. Nas éguas acíclicas a síntese de P4 ocorreu em período mais avançado da gestação e apresentou menor concentração ao longo dos 130 dias de gestação em relação às cíclicas. Sugere-se que a interrupção do tratamento com altrenogest em receptoras gestantes acíclicas aos 70 dias permite a

manutenção da gestação quando as éguas apresentam formação de CLS há pelo menos 10 dias e aos 120 dias permite a manutenção em todas as receptoras, independente da presença de CLS nos ovários. Além disso, a primeira formação dos CLS em éguas acíclicas ocorre em período mais avançado da gestação do que nas cíclicas e quando as acíclicas encontram-se em anestro no momento da TE a formação dos CLS ocorre em período gestacional mais avançado em relação àquelas que se tornam gestantes na fase transicional.

Palavras-chave: corpos lúteos suplementares; éguas acíclicas; progesterona; tratamento hormonal.

SILVA, E.S.M. **Effect of two treatment periods on pregnancy maintenance in non-cyclic recipient mares.** Botucatu, 2012. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

There are few reports about progesterone (P4) synthesis by supplementary corpora lutea (SCL) and how these structures interfere with gestation in non-cyclic pregnant recipient mares treated with progestagens. Therefore, the main objectives of this study were to evaluate the effect of altrenogest treatment during 70 or 120 days of gestation on pregnancy maintenance in non-cyclic recipient mares and to correlate these findings with SCL number, formation period and P4 concentration at the moment of treatment interruption, in order to improve the understanding of pregnancy physiology and to evaluate the possibility of progestagens treatment reduction in non-cyclic recipient mares. Twenty five pregnant mares by embryo transfer (ET) in anestrous, transitional and ovulatory phase were evaluated and distributed into different groups, according to the studied variable: altrenogest treatment period (70ALT, 120ALT and Control groups), SCL formation period and P4 profile (Anestrous, Transition and Control groups). Mares were evaluated by ultrasonography and quantification of plasma progesterone until 130 days of gestation. After hormonal withdrawal on group 70ALT, five pregnancy maintenance and two abortions were observed at 75 days of gestation. No abortion was noted on group 120ALT after treatment interruption. The mean period (days) of first SCL formation was similar ($p=0,32$) in 70ALT and 120ALT groups and greater ($p<0.01$) than Control group. Means of the first SCL formation were different ($p<0.01$) among Anestrous, Transition and Control groups. Progesterone synthesis in non-cyclic mares occurred in more advanced gestational period and showed lower concentration during the 130 days in relation to cyclic mares. It is suggested that progestagen treatment interruption in non-cyclic recipient mares at 70 days of gestation enables pregnancy maintenance when mares present SCL formation for at least 10 days and at 120 days enables maintenance in all recipient mares, regardless of the presence of SCL in the ovaries. In addition, the first SCL formation in non-cyclic mares occurs in more

advanced period of gestation than in cyclic mares and when the acyclic ones are in anestrus at the moment of ET the SCL formation occurs in more advanced stage of pregnancy in relation to those that become pregnant at transitional phase.

Key-words: supplementary corpora lutea; non-cyclic mares; progesterone, hormonal treatment.

1. INTRODUÇÃO

Éguas são consideradas poliéstricas estacionais e o início da estação reprodutiva na primavera depende de diversos fatores fisiológicos e ambientais, tais como idade, raça, condição corporal e principalmente o fotoperíodo (GINTHER, 1992; NAGY et al., 2000). A sazonalidade reprodutiva é dividida em quatro fases, baseada na dinâmica folicular: fase de anestro, fase de transição de primavera, fase ovulatória e fase de transição de outono (GINTHER et al., 2004).

A baixa oferta de alimentos durante o período de transição (inverno-primavera) e o manejo diferenciado oferecido a doadoras e receptoras, nas propriedades rurais e centrais de transferência de embriões, faz com que éguas doadoras iniciem a atividade cíclica mais cedo no ano enquanto as receptoras permanecem em anestro. Desta forma, existe um reduzido número de receptoras cíclicas disponíveis nesta fase que, para algumas associações de criadores de equinos, são extremamente desejáveis nos programas de transferência de embriões (TE) (ROCHA FILHO et al., 2004).

Com o intuito de aumentar a produtividade das doadoras ao longo do ano, utilizam-se métodos para antecipar a ciclicidade das receptoras, como a utilização de luz artificial (FREEDMAN et al., 1979; NAGY et al., 2000) e métodos que permitem o estabelecimento da gestação em éguas acíclicas, por meio da administração de protocolos hormonais. Diversos estudos confirmam a eficácia de protocolos que utilizam estrógeno e progesterona para o preparo e manutenção de éguas acíclicas como receptoras em programas de transferência de embriões (LAGNEAUX E PALMER, 1993; CARNEVALE et al., 2000, ROCHA FILHO et al., 2004). A disponibilidade destes hormônios (naturais ou sintéticos) possibilita a indução de mudanças endometriais similares às que ocorrem nas éguas que se tornam naturalmente gestantes (PINTO, 2011), como a formação do edema uterino, causado pelo estrógeno durante o estro e posteriormente o aumento do tônus e estímulo à secreção histiotrófica, provocados pelos progestágenos (VANDERWALL, 2011).

Sabe-se que, em éguas cíclicas gestantes, a progesterona tem inicialmente origem ovariana, sendo secretada pelo corpo lúteo primário (CLP) e, a partir dos 36-40 dias de gestação, pelo conjunto CLP e corpos lúteos

suplementares (CLS). Aproximadamente aos 180 dias de gestação não há mais produção de progesterona pelos corpos lúteos da égua e a unidade feto-placentária, embora já contribuindo com a produção de progestágenos no período anterior à regressão dos CLS, assume a produção até a fase final da gestação. (GINTHER, 1992).

Atualmente, nos protocolos hormonais utilizados em éguas acíclicas, faz-se uso da suplementação com progestágenos até aproximadamente 100 a 120 dias de gestação, para assegurar concentrações adequadas de progesterona até o completo desenvolvimento feto-placentário. Considerando o desenvolvimento dos CLS a partir de 36-40 dias de gestação e que estes são responsáveis pela produção suplementar de progesterona até que a gestação torne-se placentário-dependente, é provável que o tratamento com progestágeno exógeno possa ser interrompido mais precocemente durante a gestação.

Este trabalho relata a ocorrência de perda ou manutenção gestacional após a interrupção do tratamento com altrenogest, em éguas receptoras acíclicas, aos 70 e 120 dias de gestação, correlacionando os achados com o número de CLS, tempo de formação e a concentração de progesterona encontrada no momento da interrupção. Descreve também o perfil plasmático de progesterona endógena pós-desenvolvimento de corpos lúteos suplementares de éguas gestantes sem corpos lúteos primários. Os resultados são de grande importância para melhor compreensão da fisiologia da gestação e, conseqüentemente, para avaliar a possibilidade de redução do tempo da administração de protocolos hormonais em receptoras acíclicas em programas de transferência de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos relacionados à sazonalidade reprodutiva da égua

A égua apresenta um comportamento reprodutivo poliéstrico estacional e o início da estação ovulatória, caracterizada pela primeira ovulação do ano, ocorre na primavera, com o fotoperíodo em ascensão. A atividade folicular máxima coincide com alta luminosidade diária, enquanto que a baixa atividade ocorre em períodos de baixa luminosidade (FREEDMAN et al., 1979). Além do fotoperíodo, diversos fatores fisiológicos e ambientais, tais como idade, raça e condição corporal interferem na atividade reprodutiva em éguas (GINTHER, 1992).

Vários autores já observaram que a nutrição está relacionada com o início da atividade ovulatória (VAN NIEKERK E VAN HEERDEN, 1972; GINTHER, 1974; McDANIEL et al., 1979; HENNEKE et al., 1984; KUBIAK et al., 1987). Algumas éguas ovulam durante todo o ano (KOSKINEN E KATILA, 1991; GENTRY et al., 2002) e nos animais que apresentam este tipo de comportamento observa-se maior porcentagem de gordura corporal que naqueles que entram em fase de anestro (FITZGERALD E McMANUS, 2000). A partir destas observações sugeriu-se que o peso corporal, a reserva de gordura e a disponibilidade de alimentos são importantes fatores que afetam a duração do período reprodutivo e que a nutrição pode ser um fator que interage com o fotoperíodo para determinar o início e duração da atividade e inatividade ovariana em éguas (SALAZAR-ORTIS et al. 2011).

Durante o período de transição (inverno-primavera), há uma baixa oferta de alimentos para os animais (MORROWS E BURNS, 2007). Além disso, neste período as éguas apresentam aumento na atividade folicular sem a ocorrência de ovulação (GINTHER, 1974). Estas condições favorecem a existência de um reduzido número de éguas cíclicas disponíveis e a utilização de receptoras acíclicas nesta fase é extremamente desejável nos programas de TE (ROCHA FILHO, 2004).

Algumas associações de criadores de cavalos estabeleceram uma data oficial de nascimentos para potros, o ano hípico (1° de janeiro no hemisfério norte e 1° de julho no hemisfério sul), resultando na mesma idade oficial para

todos os potros nascidos numa mesma estação (GINTHER, 1992). Isso resulta numa pressão econômica para que os potros nasçam o mais próximo possível do início do ano hípico, para que obtenham vantagem sobre os demais que venham a nascer mais tardiamente na estação (NAGY et al., 2000). Os animais nascidos próximo ao início do ano hípico possuem melhor desempenho nas modalidades esportivas que os nascidos num período mais tardio (LANGLOIS E BLOUIN, 1996). Esta data tem estimulado os pesquisadores a desenvolverem métodos que antecipem a ciclicidade das éguas (NAGY et al., 2000) e que permitam a utilização de receptoras acíclicas em programas de transferência de embriões.

No período de anestro e transição, a utilização da hormonioterapia com estrógenos e progestágenos tem possibilitado a indução de ciclos artificiais em éguas acíclicas. O tratamento hormonal tem permitido um maior aproveitamento dos animais que apresentam limitações impostas pela sazonalidade reprodutiva (FARIA E GRADELA, 2010).

2.2 Síntese de progesterona durante a gestação em éguas

A progesterona (P4) é o hormônio fundamental para a manutenção da prenhez (ALLEN, 2001a; HAFEZ, 2004). Todos os animais domésticos necessitam da constante síntese de P4 e de seus ativos metabólicos biológicos, como as 5α – dihidroprogesteronas (5α DHP), para manter adequado ambiente uterino para o desenvolvimento do feto. Diferentemente da cabra, porca, vaca e cadela, que apresentam a produção total de progesterona da gestação a partir do prolongamento da funcionalidade do corpo lúteo, a égua necessita de quatro componentes que se combinam para gerar a produção total de progesterona e progestágenos (Ex: 5α -pregnonas) necessários à manutenção da gestação, sendo estes o corpo lúteo primário, os corpos lúteos suplementares, o alantocório e as glândulas adrenais do feto (ALLEN, 2001a).

Para o objetivo desta revisão, o alantocório e as glândulas adrenais do feto serão tratadas em conjunto como a terceira fonte de progesterona e progestágenos, denominada unidade feto-placentária.

2.2.1. Corpo lúteo primário

O corpo lúteo primário é aquele formado logo após a ovulação cujo ovócito liberado pelo folículo levou à formação do concepto. Em éguas gestantes o CLP persiste além da sua vida cíclica normal de 14-16 dias devido ao reconhecimento materno da gestação, período no qual o embrião secreta fatores luteostáticos para permitir a continuidade da gestação (GINTHER, 1992; ALLEN, 2001b). Tendo resistido ao processo da luteólise durante os dias 14-16 pós-ovulação, o CLP persiste nos ovários, mas as concentrações de progesterona decrescem gradativamente durante os próximos 20 dias ou mais (ALLEN, 2001b).

Células da cinta coriônica invadem o epitélio uterino adjacente e, ao redor dos 35 dias de gestação, se diferenciam para formar os cálices endometriais, responsáveis pela secreção da gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Allen et al., 1973). A eCG induz o estímulo necessário à manutenção do corpo lúteo primário (GINTHER, 1992; DAELS et al., 1998). Ginther e First (1971), Squires et al. (1974a) e Squires et al. (1974b), ao comparar o tempo de funcionalidade do CLP em éguas prenhes e histerectomizadas, sugeriram que a vida útil do CLP é prolongada pela ação luteotrópica da eCG. Além disso, Bergfelt et al. (1989) encontraram elevação de progesterona sérica concomitante ao início da síntese da eCG, antes da formação dos corpos lúteos suplementares e Ginther (1992) observou, por meio do exame ultrassonográfico, aumento no tamanho do CLP após o 35º dia de gestação. Portanto, acredita-se que a eCG, além de levar a formação dos CLS, também regule a esteroidogênese do CLP (DAELS et al., 1998). A esta nova secreção de P4 e ao novo estímulo de crescimento utiliza-se o termo ressurgimento do corpo lúteo primário (GINTHER, 1992).

2.2.2. Corpos lúteos suplementares

A eCG é observada em amostras de sangue de éguas gestantes em torno de 37 a 41 dias, aumentando rapidamente para níveis elevados ao redor dos 60-80 dias, quando então decresce lentamente para níveis baixos ou não detectáveis por volta dos 120 a 160 dias (COLE E HART, 1930; BRINSKO et

al., 2011). A eCG possui capacidade de expressar atividade biológica tanto de FSH (hormônio folículo estimulante) quanto de LH (hormônio luteinizante), em uma fração de 1.4:1, no entanto, a fração FSH possui baixa capacidade de se ligar aos receptores gonadais dos próprios equinos (STEWART et al., 1979).

No início da gestação, os ovários maternos apresentam ondas de crescimento folicular, assim como no ciclo estral, que são estimuladas pela contínua secreção de FSH pela pituitária (EVANS E IRVINE, 1975; URWIN E ALLEN, 1982). No entanto, nenhum destes folículos amadurece e ovula em função do efeito negativo da progesterona sobre a secreção de LH pela pituitária (ALLEN, 2001a). A partir dos 38 a 40 dias de gestação, com o início da secreção do eCG pelos cálices endometriais recentemente formados, os corpos lúteos suplementares são formados por meio da ovulação ou luteinização dos folículos mais avançados das ondas foliculares, devido à fração LH da eCG (STEWART et al., 1976).

A luteinização dos folículos anovulatórios origina os corpos lúteos acessórios e a ovulação dos folículos os corpos lúteos secundários. O conjunto dos corpos lúteos acessórios e corpos lúteos secundários recebe a denominação de corpos lúteos suplementares (GINTHER, 1992; BRINSKO et al., 2011). A progesterona secretada pelos CLS complementa a P4 sintetizada pelo CLP e juntos mantêm a gestação nos primeiros cinco meses de prenhez (BRINSKO et al., 2011). Todos os corpos lúteos, tanto o primário quanto os suplementares, degeneram por volta dos 150-200 dias de gestação (SQUIRES et al. 1974c; MARTIN et al., 1989; GINTHER, 1992; ALLEN, 2001b; BRINSKO et al, 2011).

2.2.3. Unidade feto-placentária

Durante o período de expansão do alantocório, entre os dias 40 e 120 de gestação, as células trofoblásticas adquirem capacidade de sintetizar diversos hormônios (ALLEN, 2001a). Dentre eles, destaca-se a progesterona e os metabólitos 5 α DHP e 20 α -hidroxi-5 α -pregnane-3-ona, observados ao redor dos 70 dias de gestação, sendo produzidos pela utilização exclusiva de fontes maternas de colesterol (HOLTAN et al., 1979).

Desta forma, entre os dias 70 e 150 de gestação, as concentrações de progesterona e progestágenos encontrados no plasma representam uma mistura de P4 secretada pelos corpos lúteos primário e suplementares em processo de declínio e pelos progestágenos da placenta secretados pelo alantocório em crescimento (ALLEN, 2001a).

Nas últimas 4 a 6 semanas de gestação, as glândulas adrenais em crescimento e em processo de maturação do feto secretam quantidades crescentes de pregnenolona, a qual é convertida à progestágeno pelo alantocório (THORBURN, 1993).

2.3 Protocolos de progestágenos utilizados em éguas receptoras acíclicas

O termo “progestágenos” se refere ao grupo dos esteróides naturais ou sintéticos com efeito similar ao da progesterona (PINTO, 2011). Os progestágenos são aplicados em programas de transferência de embriões em equinos a fim de se manter a gestação em receptoras acíclicas (HINRICHS et al., 1986; MCKINNON et al., 1988; LAGNEAUX e PALMER, 1993; CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004; GRECO et al., 2008).

A disponibilidade de produtos progestacionais (naturais ou sintéticos) possibilita a indução de mudanças endometriais similares às que ocorrem nas éguas naturalmente gestantes, viabilizando assim o uso de éguas acíclicas como receptoras de embriões (PINTO, 2011). Primeiramente administra-se estrógeno antes da administração de progesterona. O estrógeno simula a condição hormonal de estro e estimula a expressão de receptores para progesterona (ZAVY et al., 1979; WATSON et al., 1992; McDOWELL et al., 1999; AUPPERLE H. et al., 2000). Após a verificação do edema uterino pelo exame ultrassonográfico, administra-se os progestágenos.

Os principais progestágenos utilizados são o altrenogest (progestágeno sintético) e a progesterona injetável (progesterona natural oleosa). Estes são aplicados 5 a 8 dias antes da égua receber o embrião (CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004), com o objetivo de estabelecer um ambiente uterino favorável no momento da transferência. Ambos possuem resultados satisfatórios na manutenção da gestação em equinos (HINRICHS et al., 1986; MCKINNON et al., 1988; MCKINNON et al., 2000; ROCHA FILHO, 2004).

Nos anos 80, utilizavam-se éguas ovariectomizadas como receptoras acíclicas. Hinrichs et al. (1985, 1986, 1987) realizavam as ovariectomias no mínimo três semanas antes de realizar as transferências, com o objetivo de reduzir o manejo com rufiações e palpções retais normalmente realizados em receptoras intactas.

Nos trabalhos conduzidos por Hinrichs et al. (1985,1986), os autores utilizaram apenas os progestágenos para o preparo de receptoras ovariectomizadas e Mckinnon et al. (1988) utilizaram o estrógeno, previamente à administração e em conjunto com os progestágenos, uma vez que foi demonstrado que o estrógeno estimulava o aumento dos receptores de progesterona (ZAVY et al., 1979). As taxas de gestação foram similares entre os trabalhos de Hinrichs et al. (1985) e McKinnon et al. (1988), variando de 70% (3 gestações de 4 transferências) e 70 a 80% entre os protocolos testados (7/10, 8/10, 14/20), respectivamente. McKinnon e colaboradores concluíram que, independente do período de administração do estradiol, o requisito primário para o preparo e a manutenção da gestação é uma concentração adequada de progesterona ou altrenogest.

Um estudo foi realizado para avaliar o efeito da aplicação da progesterona injetável (sem aplicação prévia de estrógeno) em diferentes momentos sobre a taxa de prenhez nas receptoras ovariectomizadas (HINRICHS et al., 1987). Após preparar éguas sincronizadas (tratamento iniciado dois dias após ovulação da doadora) e não sincronizadas (início do tratamento pelo menos quatro dias antes da ovulação da doadora), concluiu-se que é necessário haver sincronia entre doadora e receptora para que se obtenha adequadas taxas de gestação. Este trabalho demonstra a importância da sincronia do ambiente uterino entre doadora e receptora na sobrevivência do embrião, apesar das receptoras em questão não produzirem hormônios esteroidais.

Nos últimos anos, receptoras intactas acíclicas foram introduzidas nos programas de TE por meio da utilização de protocolos hormonais. O uso de receptoras intactas acíclicas (anestro ou transição) dispensa a realização de cirurgia, tornando-se uma opção vantajosa. Lagneaux e Palmer (1993) afirmaram que tanto éguas ovariectomizadas quanto em anestro podem ser utilizadas com sucesso como receptoras de embriões.

Ao utilizar receptoras acíclicas, Carnevale et al. (2000) encontraram taxas de gestação similares entre éguas transicionais e cíclicas, administrando altrenogest diariamente às receptoras acíclicas, 5 a 7 dias antes da TE, até os 120 dias, quando confirmada a gestação no 16º dia. Rocha Filho et al. (2004), ao compararem a taxa de gestação e morte embrionária entre éguas receptoras cíclicas e acíclicas suplementadas com progesterona de curta ou longa ação, mantendo-se o tratamento até os 100 dias de gestação, concluíram que éguas em anestro ou no período de transição recebendo ambos os tratamentos podem ser utilizadas como receptoras.

O tratamento com o hormônio é mantido até o período em que a unidade feto-placentária assume a manutenção da gestação, por meio da própria produção de progestágenos, aproximadamente aos 100 dias de gestação (HOLTAN et al., 1979). Na tentativa de reduzir o tempo de tratamento com hormônio, Lagneaux e Palmer (1993) administraram extrato de pituitária (LH) à éguas em anestro com objetivo de antecipar a secreção de progesterona ovariana, com a formação dos corpos lúteos suplementares, de forma a reduzir o tempo de tratamento com altrenogest. No entanto, não foi observada diferença significativa no aumento da concentração de progesterona entre éguas tratadas e não tratadas com LH e o tratamento não foi considerado eficiente.

Greco et al. (2008) sugeriram que a interrupção do tratamento pode ser realizada antes do maturação feto-placentária, a partir dos 40 dias de gestação quando os CLS surgem nos ovários. Estes achados sugerem que os corpos lúteos suplementares são capazes de manter a gestação, no entanto, mais estudos são necessários para avaliar as características da formação dos CLS e a concentração de progesterona produzida por estas estruturas.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram: a) avaliar o efeito do tratamento com altrenogest durante 70 e 120 dias de gestação sobre a manutenção da gestação em receptoras acíclicas; b) descrever as características da formação dos CLS em receptoras cíclicas e acíclicas; c) descrever o perfil de progesterona em éguas acíclicas gestantes (anestro e transição) tratadas com altrenogest; d) avaliar o desenvolvimento do concepto em receptoras tratadas com altrenogest (acíclicas) e não tratadas (cíclicas).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Animais e grupos experimentais*

Foram utilizadas vinte e cinco receptoras gestantes mestiças, ginecologicamente sadias e com bom estado corpóreo. Os animais foram alimentados com feno, ração, suplementação mineral e água *ad libidum*.

Dentre os animais, foram utilizadas éguas acíclicas (em anestro ou transição) e cíclicas. Éguas receptoras acíclicas receberam tratamento hormonal previamente a transferência de embrião e durante a gestação. Foram consideradas éguas acíclicas aquelas que apresentaram folículos com diâmetro menor que 15 mm e ausência de corpo lúteo (éguas em anestro) e aquelas que apresentaram folículos variando de 15 a 25 mm e ausência de CL, indicando a não ocorrência da primeira ovulação da estação (éguas em transição). As éguas cíclicas foram aquelas que apresentaram ciclos estrais regulares com presença de folículo ovulatório ou CL.

As éguas foram divididas em três grupos de acordo com o tratamento hormonal utilizado: Controle (8 éguas), 120ALT (9 éguas) e 70ALT (8 éguas). O grupo Controle foi composto por éguas gestantes cíclicas não-tratadas com altrenogest. Para os grupos 120ALT e 70ALT foram utilizados somente éguas receptoras gestantes acíclicas tratadas com altrenogest. As éguas do grupo 120ALT foram suplementadas com o hormônio até 120 dias de gestação,

enquanto que os animais do grupo 70ALT foram tratados até o dia 70 de gestação, sendo neste momento o tratamento interrompido.

Para realizar a descrição do perfil da concentração de progesterona de éguas acíclicas os animais do grupo 70ALT e 120ALT foram considerados em conjunto (n=17). Além disso, as éguas acíclicas (70ALT + 120ALT) foram subdivididas nos grupos Anestro (n=9) e Transição (n=8) para avaliar o período da primeira formação dos corpos lúteos suplementares e descrever o perfil da concentração de progesterona de acordo com a característica reprodutiva no momento do início do tratamento hormonal.

Para avaliar o desenvolvimento do concepto os grupos 70ALT e 120ALT também foram tratados como um único grupo e denominados grupo Altrenogest (n=17).

4.2 Tratamento hormonal

Inicialmente, éguas receptoras acíclicas foram tratadas com dose única de 2,5 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin® - Farmavet – Brasil). Um dia pós-tratamento as éguas foram examinadas por meio de ultrassonografia para avaliação do edema uterino. Confirmada a presença de edema, as éguas foram suplementadas com 33 mg (15 mL) de altrenogest (Progestal® – ProSer – Argentina – dose recomendada 22-44 mg/dia), via oral, a cada 24 horas. Realizada a transferência de embrião (D8) e a confirmação da gestação (D15), a administração do altrenogest foi continuada diariamente até os 120 dias de gestação no grupo 120ALT e até o 70º dia de gestação no grupo 70ALT.

4.3 Coleta, manipulação e transferência dos embriões

A coleta e transferência dos embriões foram realizadas pelo procedimento não cirúrgico (SQUIRES et al., 2003). Os embriões foram coletados no 8º dia pós-ovulação da doadora por meio de lavagem uterina, para posterior manipulação e transferência para a receptora. A transferência de embrião foi realizada entre o 4º e 6º dia pós-início do tratamento com altrenogest nas éguas tratadas (70ALT e 120ALT) e entre o 4º e 6º dia pós-ovulação nas éguas do grupo Controle.

4.4 Exame ultrassonográfico

As éguas foram examinadas por meio de ultrassonografia transretal modo-B (Mindray®, DP-3300Vet) usando transdutor linear de 5 MHz de frequência. O exame ultrassonográfico foi empregado, em todos os grupos, para a avaliação da condição uterina e ovariana das receptoras, assim como para o diagnóstico e confirmação da manutenção da gestação nos dias 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 100, 115, 130, ressaltando que a partir do dia 35 foram avaliadas também a formação dos CLS em todos os grupos.

Além disso, foram realizadas mensurações da vesícula embrionária e do embrião (20 aos 35 dias de gestação) e posteriormente feto (40 aos 60 dias de gestação) a cada cinco dias. O diâmetro (mm) da vesícula foi definido pela média da altura e largura da imagem congelada por meio do ultrassom a partir do dia 15 aos 45 de gestação (Fig.1A) Já o embrião/feto foi mensurado utilizando o comprimento crânio-caudal (Crown-rump), do dia 20 aos 60 de gestação (Fig.1B).

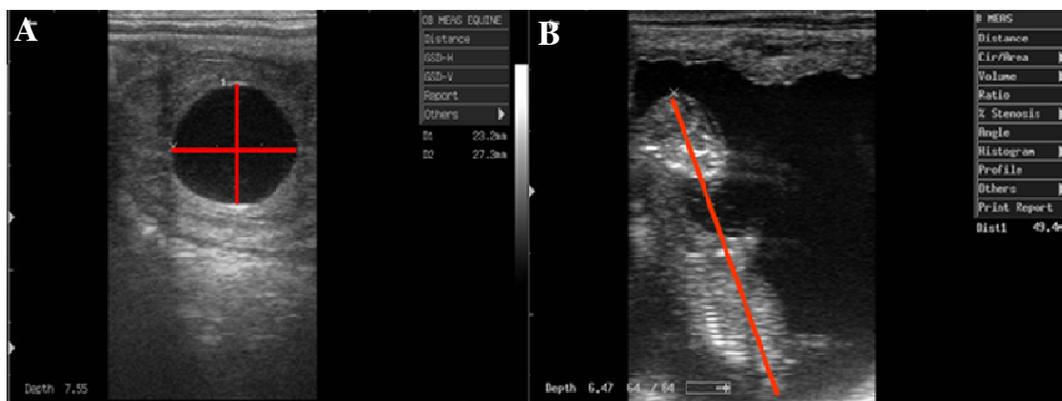


Figura 1: Mensurações ultrassonográficas (7,5 MHz): (A) Média da altura e largura (linhas vermelhas) da imagem congelada de vesícula embrionária com 15 dias de idade e (B) comprimento crânio-caudal (linha vermelha) de feto com 60 dias.

4.5 Colheita de sangue e dosagem de progesterona

No grupo Controle, amostras de sangue foram colhidas anteriormente à ovulação (D0) da receptora e nos grupos 120ALT e 70ALT a colheita de sangue foi realizada imediatamente antes da primeira aplicação de altrenogest. Nos grupos sob tratamento com progestágeno exógeno, foi considerado como D0 o dia da primeira administração do altrenogest. Em todos os grupos houve colheita de sangue com intervalo de cinco dias, a partir do momento anterior à ovulação ou à primeira administração de altrenogest continuando-se até os 130 dias de gestação. Nos dias que houve coincidência entre a obtenção da amostra de sangue e a aplicação do progestágeno, a colheita foi executada imediatamente antes da administração do altrenogest.

A colheita de sangue foi realizada por meio de venopunção da veia jugular em tubos heparinizados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (900g/10 min) e o plasma armazenado a -20°C até o momento da dosagem hormonal. As concentrações plasmáticas de progesterona foram mensuradas por meio do radioimunoensaio (RIA) utilizando kit comercial de fase sólida (Coat-A-Count Progesterone® - Siemens Medical Solutions Diagnostics – Los Angeles, CA, USA). As mensurações foram realizadas em dois ensaios e o antisoro foi específico para progesterona, com sensibilidade mínima de 0,0057 ng/mL para o ensaio 1 e 0,040 ng/mL para o ensaio 2.

O antisoro utilizado no RIA não possui reação cruzada com altrenogest (MCKINNON et al., 1988; VOLLER et al., 1991) e apresentou baixa reação cruzada com outros hormônios esteroidais conforme descrito no kit: corticosterona, 0,9%; cortisol, 0,03%; danazol, 0,006%; 11-deoxicorticosterona, 2,2%; 11-deoxycortisol, 0,01%; DHEA-SO₄, 0,002%; 20 α -dihidroprogesterona, 0,2%; 17 α -hidroxiprogesterona, 3,4%; medroxiprogesterona, 0,3%; 5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona, 0,05%; 5 α -pregnan-3,20-diona, 9,0%; 5 β -pregnan-3,20-diona, 3,2%; pregnenolona, 0,1%; 5-pregnen-3 β -ol-20-ona-sulfato, 0,05%, testosterona, 0,1%.

A precisão intra e inter-ensaio foi determinada por três repetições em cada ensaio de amostra controle constituída por um “pool” de plasmas. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi, respectivamente, de 8,6% e 10,4%

4.6 Estatística

O teste de Fisher foi usado para testar a associação entre grupo experimental e a ocorrência de abortamento (variável binária na qual 1 = aborto e 0 = manutenção da gestação) após a interrupção do tratamento nos dias 70 e 120 e no grupo Controle. Para esta análise as observações da resposta foram supostamente independentes porque foram medidas em éguas diferentes.

Curvas de sobrevivência (testes de Wilcoxon e Log-Rank) foram utilizadas para comparar o tempo médio da primeira formação dos corpos lúteos suplementares entre os grupos 70ALT, 120ALT e Controle e entre os grupos Anestro, Transição e Controle. Para analisar a variabilidade das médias o erro padrão da média (E.P.M.) foi utilizado.

Análise de Variância com medidas repetidas foi usada para comparar as médias do diâmetro da vesícula embrionária (mm) ou comprimento do embrião/feto (mm) como função do grupo experimental (tratamento ou controle, variável categórica) e dia de medida (variável categórica). A interação entre dia de medida e grupo experimental foi testada no modelo. Como o crescimento da vesícula embrionária pareceu ser curvilíneo, um modelo adicional de regressão linear com medidas repetidas foi utilizado para testar o efeito do grupo experimental na média do diâmetro da vesícula ou do comprimento do embrião/feto. A variável explanatória “dia de medida” foi considerada contínua (medida em dias). Termos para a interação entre dia de medida e tratamento e grupo experimental, e dia como efeito quadrático foram incluídos e testados no modelo. O modelo final para ambas as repostas (tamanho da vesícula e do embrião/feto) foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \alpha + \text{grupo experimental}_j + \beta_1(\text{dia de medida}_k) + \beta_2(\text{dia de medida}_k)^2 + \gamma_i + \varepsilon_{ijk}$$

No qual Y_{ijk} é o tamanho médio da vesícula (modelo 1) ou embrião/feto (modelo 2), α é a ordenada na origem, $\text{grupo experimental}_j$ é a variável para o grupo de estudo (j = tratamento ou controle), $\beta_1(\text{dia de medida}_k)$ é o coeficiente para dia de medida $_k$, $\beta_2(\text{dia de medida}_k)^2$ é o coeficiente para o termo quadrático relativo ao dia de medida $_k$, e ε_{ijk} é um termo residual com distribuição suposta $\varepsilon_{ijk} \sim N$

$(0, \sigma_{\varepsilon}^2)$. O termo γ_i é um termo aleatório para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro da égua_{*i*}. A estrutura de covariância auto-regressiva (AR-1) foi a que resultou no melhor ajuste para o modelo. Os modelos utilizados foram desenvolvidos usando PROC MIXED (SAS Institute, 2009). Quando comparações entre médias de quadrados mínimos foram feitas, o método de Tukey foi usado para ajustar o valor P para cada contraste comparado. Para analisar a variabilidade das médias o erro padrão da média (E.P.M.) foi utilizado.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito de dois períodos de tratamento com altrenogest sobre a manutenção da gestação

Durante o acompanhamento da gestação, antes dos dias previstos para a interrupção do tratamento, três perdas embrionárias foram verificadas entre os dias 21 e 25 de gestação, sendo observada uma em cada grupo.

Após a interrupção hormonal no grupo 70ALT, observou-se a manutenção de cinco gestações (5/7-71,4%) e dois abortamentos (2/7-28,6%) aos 75 dias de gestação. Os abortamentos foram verificados na égua C, onde foi observada apenas a presença de fluido intra-uterino e na égua G, que não apresentava acúmulo de líquido no útero na avaliação seguinte a interrupção do tratamento. Nas éguas em que foi verificada a manutenção da gestação aos 75 dias, observou-se a viabilidade fetal nas avaliações subsequentes. No grupo 120ALT o abortamento não foi verificado em nenhum dos animais (n=8) após a interrupção do tratamento aos 120 dias. O abortamento também não foi observado no grupo Controle (n=7). Apesar da ocorrência de dois abortamentos no grupo 70ALT, não foi verificada diferença estatística significativa entre os três grupos avaliados ($p=0,18$).

As éguas do grupo 70ALT, no momento da interrupção do tratamento com altrenogest (70 dias), apresentaram diferentes números e períodos de formação dos CLS, assim como concentrações de progesterona variáveis (Tab.1). O mesmo foi verificado no grupo 120ALT, no momento da interrupção hormonal aos 120 dias de gestação (Tab.2).

Tabela 1: Fase reprodutiva encontrada no início do tratamento com altrenogest, primeira detecção dos CLS por meio da ultrassonografia, total de CLS formados até os 70 dias, concentração de progesterona encontrada no dia da interrupção hormonal e ocorrência de perda ou manutenção gestacional após a interrupção, por égua, no grupo 70ALT.

Égua	Fase início tratamento hormonal	1° formação CLS (média em dias)	Total CLS até 70 dias (número)	Concentração P4 aos 70 dias (ng/mL)	Manutenção da gestação
A	Transição	38	2	4,09	Positiva
B	Transição	38	6	12,34	Positiva
C	Transição	63	1	1,41	Negativa
D	Transição	78	0	0,52	Positiva
E	Anestro	93	0	0,31	Positiva
F	Transição	58	2	3,09	Positiva
G	Anestro	Não formou	0	0,31	Negativa

Tabela 2: Fase reprodutiva encontrada no início do tratamento com altrenogest, primeira detecção dos CLS por meio da ultrassonografia, total de CLS formados até os 120 dias, concentração de progesterona encontrada no dia da interrupção hormonal e ocorrência de perda ou manutenção gestacional após a interrupção, por égua, no grupo 120ALT.

Égua	Fase início tratamento hormonal	1° formação CLS (média em dias)	Total CLS até 120 dias (número)	Concentração P4 aos 120 dias (ng/mL)	Manutenção da gestação
H	Transição	53	5	14,25	Positiva
I	Anestro	63	3	8,49	Positiva
J	Transição	48	2	4,55	Positiva
K	Anestro	68	1	4,10	Positiva
L	Anestro	Não formou	0	2,82	Positiva
M	Anestro	63	3	3,99	Positiva
N	Anestro	Não formou	0	1,70	Positiva
O	Anestro	Não formou*	-	-	Positiva

* O acompanhamento ultrassonográfico foi realizado até os 90 dias de gestação.

5.2 Período de formação, número e características dos corpos lúteos suplementares

Nas receptoras do grupo 70ALT que permaneceram gestantes após a interrupção do tratamento hormonal aos 70 dias (n=5), o número de CLS variou de dois a seis em cada égua até os 130 dias de gestação. Nos animais onde ocorreu o abortamento foi observado um CLS (égua C) e a ausência da formação deste (égua G) até os 70 dias de gestação. Nos animais que apresentaram formação lútea do grupo 120ALT, de um a cinco CLS em cada égua foram observados até os 130 dias de gestação. Neste grupo, a formação dos CLS não foi observada em duas éguas (égua L e N) até os 130 dias e em uma égua (égua O) até os 90 dias. Esta receptora foi encaminhada ao proprietário pela central onde estava alojada e conseqüentemente as demais avaliações não foram realizadas. No grupo Controle todas as éguas apresentaram formação de CLS, variando de dois a nove CLS por animal.

O período médio, em dias, da primeira formação dos CLS foi similar ($p=0,32$) nos grupos 70ALT e 120ALT e maior ($p<0,01$) que o encontrado no grupo Controle (Tab.3). Os períodos de formação de cada CLS por égua nos grupos 70ALT, 120ALT e Controle encontram-se nas tabelas 7, 8 e 9 dos Anexos, respectivamente.

Tabela 3: Total de CLS formados por animal até os 130 dias de gestação e média (\pm E.P.M.), em dias, da primeira detecção dos CLS nos grupos 70ALT, 120ALT e Controle.

Grupo	Éguas com CLS	Total CLS formados/ animal	Média 1° formação CLS (dias)
70ALT (n=7)	6	1 a 6	61,3 \pm 8,9 ^a
120ALT (n=8)	5	1 a 5	59,0 \pm 3,7 ^a
Controle (n=7)	7	2 a 9	39,4 \pm 0,9 ^b

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si ($p<0,01$).

Quando os animais foram agrupados pela característica reprodutiva, o grupo Anestro apresentou a primeira formação dos CLS, em média, aos $71,7 \pm 7,2$ dias e total de um a três CLS por animal. O grupo Transição apresentou a primeira formação aos $53,7 \pm 5,4$ dias, em média e o total de um a seis CLS por égua (Tab.4). As médias da primeira formação dos CLS foram significativamente diferentes ($p < 0,01$) entre os grupos Anestro, Transição e Controle (Tab.4). Além disso, foi possível observar que, aos 70 dias de gestação, o grupo Anestro apresentou, aproximadamente, 40% do total dos primeiros CLS formados, o grupo Transição apresentou 85% e o grupo Controle apresentou 100% (Fig.2).

Tabela 4: Total de CLS formados por animal até os 130 dias de gestação e média (\pm E.P.M.), em dias, da primeira detecção dos CLS nos grupos Anestro, Transição e Controle.

Grupo	Éguas com CLS	Total CLS formados/ animal	Média 1° formação CLS (dias)
A (n=8)	4	1 a 3	$71,7 \pm 7,2^a$
T (n=7)	7	1 a 6	$53,7 \pm 5,4^b$
C (n=7)	7	2 a 9	$39,4 \pm 0,9^c$

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si ($p < 0,01$).

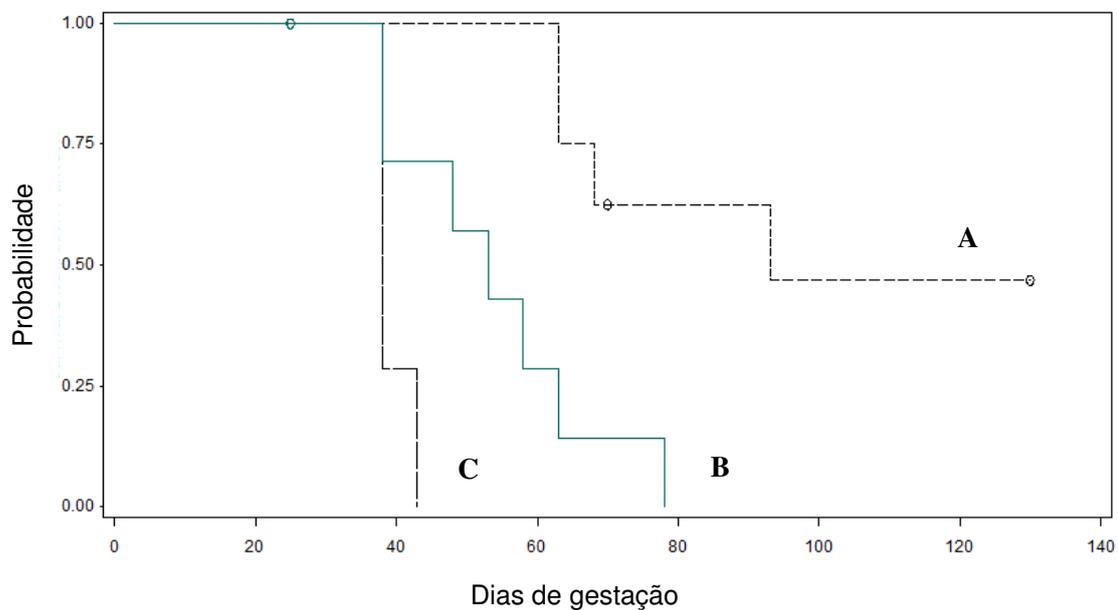


Figura 2: Probabilidade dos animais não apresentarem formação dos corpos lúteos suplementares ao longo do tempo de gestação. Cada degrau representa as formações dos CLS. O grupo Anestro (A) formou aproximadamente 40% do total dos CLS até os 70 dias de gestação; grupo Transição (B) 85% e grupo Controle (C) 100% dos CLS. O símbolo (○) representa a ausência de dados relativos a formação dos CLS devido a perda embrionária entre 21 e 25 dias de gestação (n=3), bem como a não-formação até os 70 (n=1) e 130 (n=2) dias.

Nos três grupos avaliados, os folículos que originaram os corpos lúteos secundários atingiram diâmetro ≥ 30 mm e os que originaram os corpos lúteos acessórios apresentaram diâmetros variáveis, de 25 a 50 mm. Além disso, o padrão de formação dos CLS foi similar. No período compreendido entre 36-70 dias, os CLS se formaram principalmente após a ovulação, embora houvesse também a formação pelo processo de luteinização. No período subsequente (71 a 130 dias), os CLS se formaram pela luteinização dos folículos. Como exceção, na primeira égua que se tornou gestante (égua H), pertencente ao grupo 120ALT, a formação de todos os CLS ocorreu pelo processo de luteinização.

Quanto às características ultrassonográficas, foram encontrados CLS que inicialmente apresentavam aspecto de folículo hemorrágico, ocorrendo a luteinização posteriormente (Fig.3A). Outros CLS apresentaram-se ecogênicos com centro anecóico (cavitários) (Fig.3B), esféricos com ecogenicidade homogênea (Fig.3C) e ainda com ecogenicidade homogênea em direção à fossa de ovulação (Fig.3D), sugerindo ocorrência após o processo de ovulação. Não foram observadas diferenças nas características ultrassonográficas dos CLS entre éguas cíclicas e acíclicas. Ao longo do período de avaliação, os CLS apresentaram redução gradual da ecogenicidade e do diâmetro em todos os grupos.

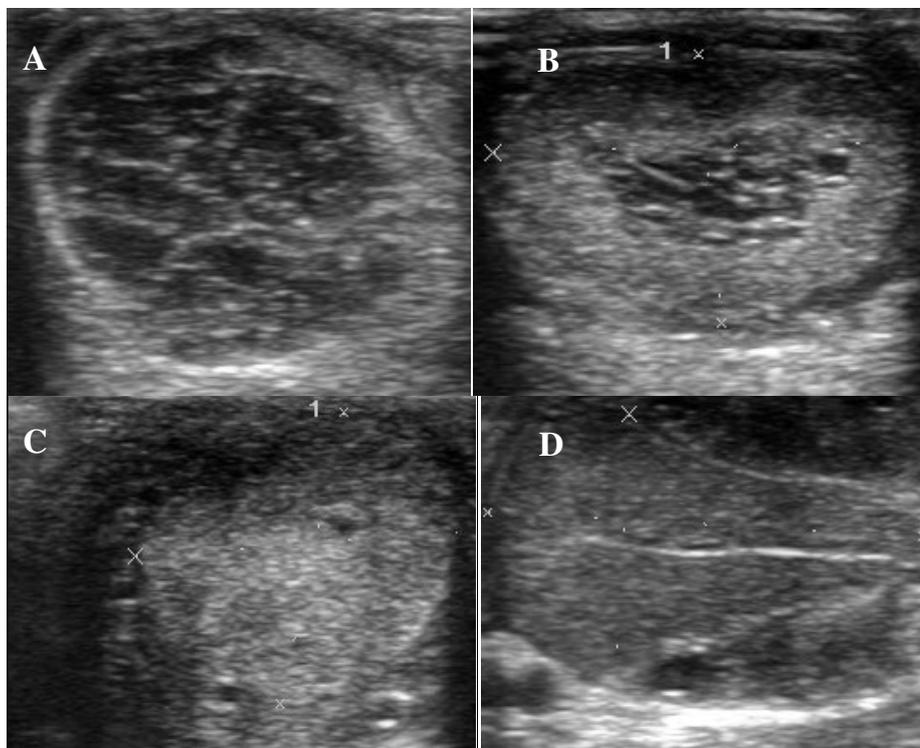


Figura 3: Corpos lúteos suplementares apresentando diferentes características ultrassonográficas (7,5 MHz). (A) CLS com aspecto de folículo hemorrágico, (B) CLS ecogênico com centro anecóico (cavitário), (C) CLS esférico com ecogenicidade homogênea e (D) CLS com ecogenicidade homogênea em direção à fossa da ovulação.

5.3 Perfil de progesterona

O perfil de progesterona das éguas acíclicas combinadas (grupo 70ALT e 120ALT) permaneceu abaixo de 1 ng/mL no período compreendido entre o dia 0 e os 45 dias de gestação. A partir dos 45 dias, foi observada uma elevação gradual na concentração de P4, atingindo valores de $3,2\pm 0,9$ ng/mL aos 70 dias de gestação e $7,5\pm 1,1$ ng/mL aos 130 dias de gestação (Fig.4).

Quando as éguas acíclicas do grupo 70ALT e 120ALT foram subdivididas e classificadas em anestro e transição, uma similaridade no perfil de progesterona foi observada entre o dia 0 e 40 de gestação, onde a concentração se manteve abaixo de 1 ng/mL. A partir dos 45 dias o grupo Transição apresentou uma elevação gradual da concentração de P4, atingindo valores de $5,3\pm 1,6$ ng/mL aos 70 dias de gestação e continuou aumentando até os 120 dias, quando atingiu valores máximos de $10,7\pm 2,2$ ng/mL. A partir dos 120 dias uma diminuição gradual da concentração de P4 foi observada. O grupo Anestro, em contrapartida, manteve as concentrações de progesterona abaixo de 1ng/mL até os 65 dias de gestação, quando então apresentou elevação gradual da concentração até a última avaliação, observando-se valores de $1,2\pm 0,6$ ng/mL aos 70 dias de gestação e de $5,4\pm 1,4$ ng/mL aos 130 dias (Fig.5).

Em relação às éguas cíclicas do grupo Controle, no dia 0 a concentração de P4 encontrava-se abaixo de 1 ng/mL. Cinco dias após a ovulação a média observada foi de $9,3\pm 0,7$ ng/mL, mantendo-se estável até os 20 dias, seguido de um declínio gradual até os 30 dias de gestação, quando atingiu valores de $6,5\pm 1,0$ ng/mL. Nova elevação foi observada entre os dias 35 e 60 de gestação, seguido por concentrações médias estáveis até os 110 dias (máximo $16,5\pm 4,3$ ng/mL no dia 75 e mínimo $12,6\pm 2,9$ ng/mL no dia 105 de gestação), ressaltando-se variabilidade entre animais. A partir de então, declínio gradual da P4 foi observado até os 130 dias ($13,9\pm 5,5$ ng/mL) (Fig.4 e 5).

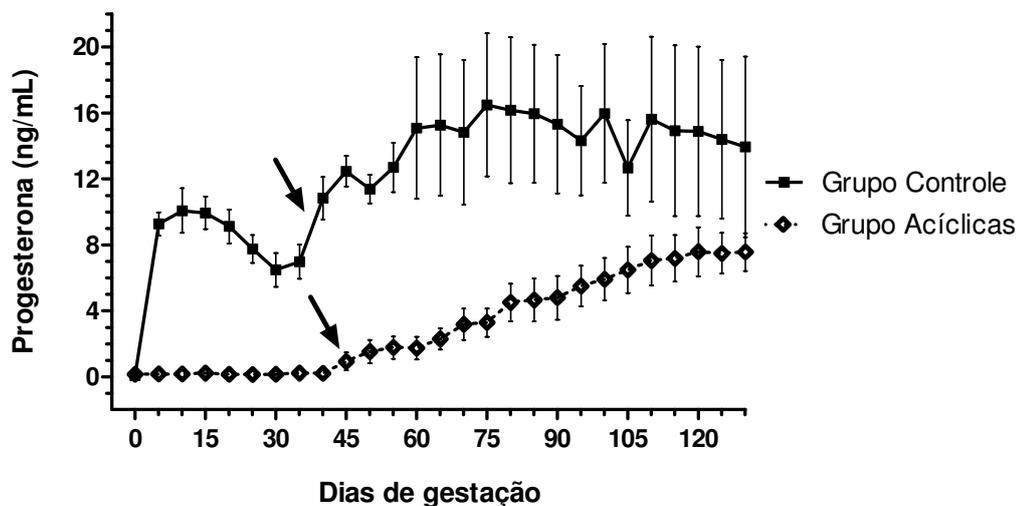


Figura 4: Concentrações de progesterona (Média±E.P.M.) do grupo Controle e do grupo de éguas acíclicas combinadas (70ALT + 120ALT). As setas indicam o início da síntese de progesterona pelos CLS nos grupos.

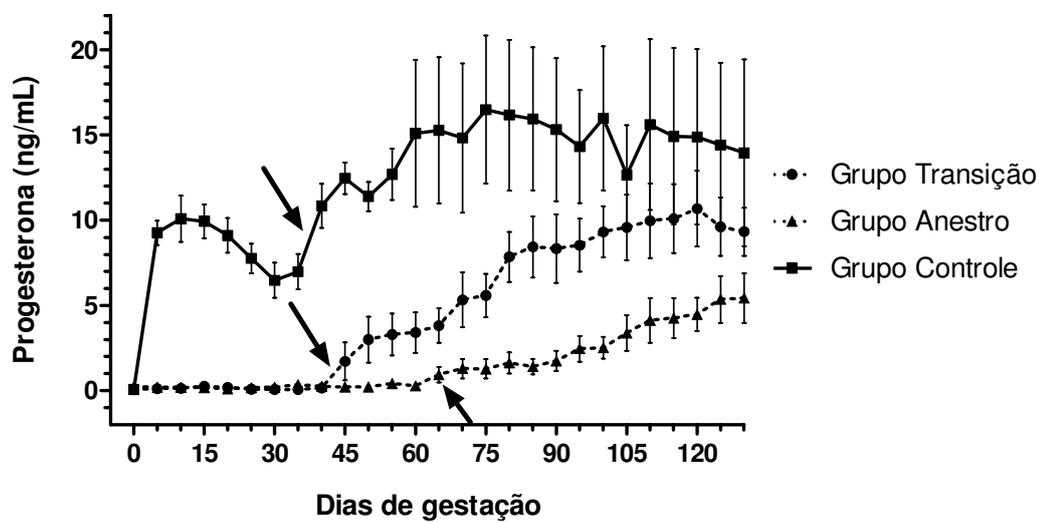


Figura 5: Concentrações de progesterona (Média±E.P.M.) dos grupos Transição, Anestro e Controle. As setas indicam o início da síntese de progesterona pelos CLS nos grupos.

Nas éguas acíclicas que não apresentaram formação de CLS o aumento nas concentrações de progesterona (>1 ng/mL) ocorreu a partir dos 90 dias de gestação (Fig.8L, Anexos). Adicionalmente, perfis individuais de P4 de éguas acíclicas que apresentaram a primeira formação de CLS por ovulação (Fig.8A), por luteinização (Fig.8M e 8E), que sofreram abortamento (Fig.8G) e o perfil de uma égua cíclica (Fig.8P) estão apresentadas nos Anexos.

5.4 Desenvolvimento do conceito

Quando a variável dia foi considerada categórica, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias do grupo tratado com altrenogest e grupo controle nos diferentes dias de avaliação para vesícula embrionária ($p>0,05$). Quando a variável dia foi considerada contínua, o desenvolvimento da vesícula foi curvilíneo entre os dias 15 e 45 de gestação para os grupos Altrenogest e Controle [diâmetro= $13,5 + 0,3(\text{dia}) + 2,8(\text{grupo}) + 0,01(\text{grupo}^2)$] (Fig.6A). O diâmetro da vesícula embrionária aumentou significativamente ($p<0,05$) nos dois grupos entre os dias 15 e 45, com exceção do período compreendido entre 20 e 30 dias, onde foi observada uma redução na taxa de crescimento (Tab.5 e Fig.6A).

Em relação ao embrião/feto, também não foram encontradas diferenças significativas entre as médias do grupo tratado e não-tratado nos diferentes dias de avaliação. Um crescimento curvilíneo foi observado para os grupos Altrenogest e Controle [comprimento= $11,2 - 0,88(\text{dia}) - 0,37(\text{grupo}) + 0,03(\text{grupo}^2)$] entre os dias 20 e 60 de gestação (Fig.6A). O desenvolvimento do embrião/feto nos dois grupos ocorreu de forma similar, cujo comprimento aumentou significativamente ($p<0,05$) entre os dias 20 e 60 de gestação (Tab.6 e Fig.7A).

Tabela 5: Diâmetro (Média±E.P.M.) da vesícula embrionária nos grupos Controle e Altrenogest, do dia 15 aos 45 de gestação.

Dias de gestação	Grupos	
	Altrenogest (mm)	Controle (mm)
15	22,3±2,6 ^C	21,6±2,6 ^C
20	31,9±5,2 ^A	28,7±2,2 ^A
25	33,4±3,9 ^{AB}	28,8±1,9 ^A
30	37,4±4,1 ^B	32,1±4,2 ^A
35	43,9±4,3 ^D	43,1±3,3 ^B
40	52,9±3,4 ^E	48,1±4,6 ^B
45	58,7±5,4 ^F	57,7±2,6 ^D

Médias seguidas por letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 6: Comprimento (Média±E.P.M.) do embrião/feto nos grupos Controle e Altrenogest, do dia 20 aos 60 de gestação.

Dias de gestação	Grupos	
	Altrenogest (mm)	Controle (mm)
20	3,1±0,5 ^A	3,4±0,4 ^A
25	8,0±1,2 ^B	8,4±1,6 ^B
30	13,0±1,9 ^C	13,8±1,8 ^C
35	16,9±2,0 ^D	16,5±2,5 ^C
40	20,7±2,3 ^E	22,6±4,2 ^D
45	27,6±2,8 ^F	28,2±2,9 ^E
50	42,0±2,3 ^G	40,7±1,3 ^F
55	52,9±2,6 ^H	52,4±3,7 ^G
60	63,2±3,0 ^I	64,9±0,1 ^H

Médias seguidas por letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

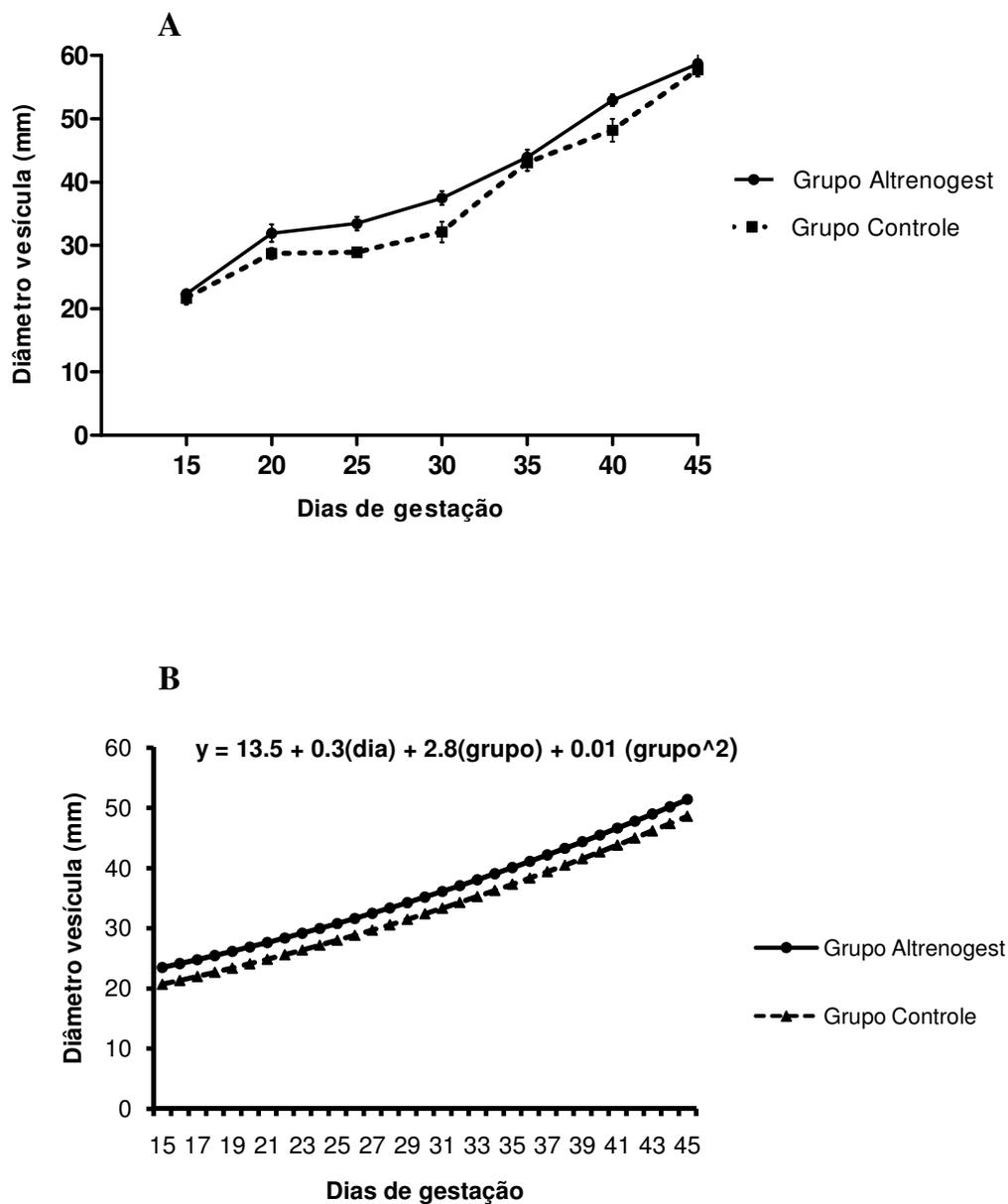


Figura 6: (A) Crescimento da vesícula embrionária (Média±E.P.M.) entre 15 e 45 dias de gestação nos grupos Altrenogest e Controle e (B) curva predita do crescimento vesicular.

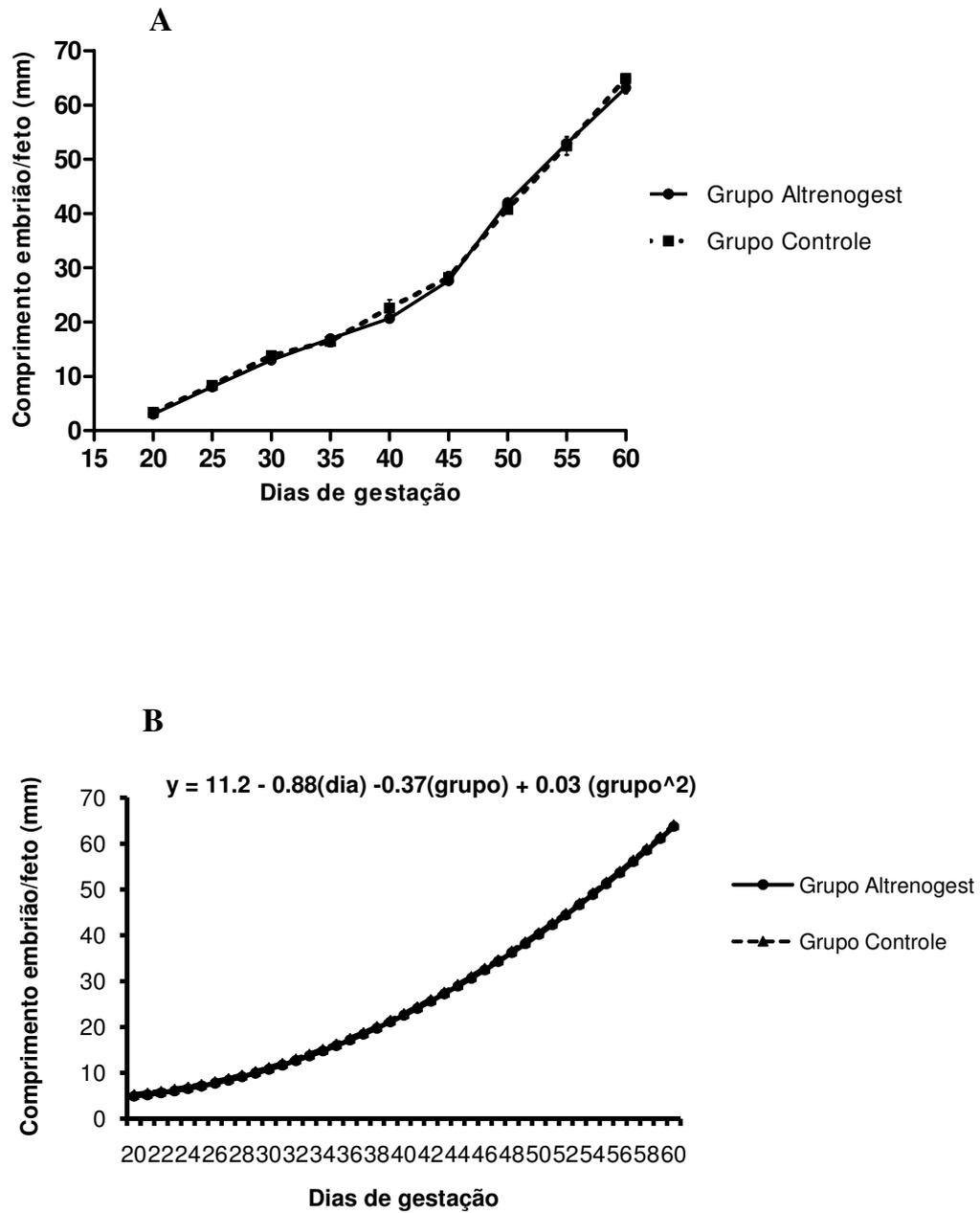


Figura 7: (A) Crescimento do embrião/feto (Média±E.P.M.) entre 20 e 60 dias de gestação nos grupos Altrenogest e Controle e (B) curva predita do crescimento embrionário/fetal.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou o efeito do tratamento com altrenogest durante 70 ou 120 dias de gestação sobre a manutenção da gestação em receptoras acíclicas, com ausência de corpo lúteo primário. Após a interrupção do tratamento aos 70 dias de gestação em sete éguas, observou-se a manutenção de cinco gestações e dois abortamentos.

Sabe-se que entre 40 e 120 dias de prenhez o alantocório em expansão adquire capacidade de sintetizar diversos hormônios e aos 70 dias os metabólitos da progesterona, como o 5 α DHP e 20 α -hidroxi-5 α -pregnane-3-ona podem ser detectados (HOLTAN et al., 1975, 1991). Além disso, a eCG, responsável pela formação dos CLS juntamente com o FSH da pituitária, é observada em torno dos 37-41 dias de gestação, aumentando gradativamente para níveis elevados ao redor dos 60-80 dias (COLE E HART, 1930; BRINSKO et al., 2011). Pelo exposto, aos 70 dias de gestação é esperado que a égua sintetize sua própria progesterona e progestágenos por meio dos CLS e da unidade feto-placentária. No entanto, os resultados deste trabalho mostram que há uma grande variação no número de CLS e na concentração de progesterona encontrados neste período.

As éguas que sofreram abortamento apresentavam, no período da interrupção hormonal aos 70 dias, concentrações de progesterona inferior a 1,4 ng/mL. A égua C apresentava um CLS, formado no período compreendido entre 61-65 dias e na égua G não foi observado tecido luteal. Shideler et al. (1982) demonstraram que éguas apresentando concentração de P4 <2 ng/mL são mais susceptíveis ao abortamento e McKinnon et al. (1988) observaram que 2,5 ng/mL de progesterona, aproximadamente, são necessários para manter a gestação. Entretanto, nas éguas D e E, que não apresentaram CLS até os 70 dias, foram encontradas concentrações de 0,5 e 0,3 ng/mL, respectivamente, no momento da interrupção e ainda assim mantiveram a gestação. Este fato nos leva a sugerir que, em alguns animais aos 70 dias de prenhez, a produção de progestágenos pela unidade feto-placentária já é o suficiente para dar continuidade à gestação sem a contribuição hormonal dos ovários, como já foi relatado por Holtan et al. (1979) e McKinnon et al. (1988).

Salienta-se que o método utilizado para a mensuração hormonal foi específico para progesterona, com baixa reação cruzada (não específico) com outros progestágenos. Este fato possivelmente contribuiu para a não detecção da real concentração endógena de progestágenos sintetizados pela unidade feto-placentária. Holtan et al. (1979) observaram a presença dos metabólitos da progesterona ao redor dos 70 dias de gestação, os quais, provavelmente, encontravam-se elevados o suficiente neste estudo para manter a gestação nas éguas D e E.

As demais éguas do grupo 70ALT que mantiveram a gestação (éguas A, B e F) apresentaram concentrações de progesterona acima de 3 ng/mL no momento da interrupção hormonal. Todas apresentaram formação de CLS, embora em diferentes períodos. A primeira formação dos CLS foi observada, em média, aos 38 dias de gestação nas éguas A e B e aos 58 dias na égua F. Os resultados da concentração de progesterona destas receptoras mostram que após a formação dos CLS foram necessários 5 dias, aproximadamente, para que a progesterona atingisse valores $\geq 2,5$ ng/mL. Estes animais passaram, no mínimo, por um período de 30 dias (éguas A e B) e 10 dias (égua F) pós-formação do primeiro CLS até a última aplicação hormonal, o que possibilitou a elevação da progesterona a concentrações suficientes para dar continuidade à gestação.

Greco et al. (2008) afirmaram que os corpos lúteos suplementares são capazes de manter a gestação sem o tratamento exógeno com progesterona em receptoras gestantes acíclicas. No presente trabalho, uma égua do grupo 70ALT (égua C) apresentou um CLS no momento da interrupção hormonal e a gestação foi perdida. Esta égua, apesar de apresentar um CLS com no mínimo cinco dias de formação no momento da interrupção, não atingiu concentração de P4 suficiente para manter a gestação (1,4 ng/mL). É importante salientar que este corpo lúteo foi formado por meio da luteinização de um folículo, ao passo que os CLS das éguas A, B e F foram formados a partir da ovulação dos folículos. Possivelmente o CLS da égua C, por ser originado de um folículo anovulatório, sofreu um processo de luteinização mais lento e conseqüentemente a concentração de progesterona aumentou em menor velocidade. Apesar desta condição ter ocorrido em apenas um animal, é

prudente esperar um período maior que cinco dias da formação dos CLS para realizar a interrupção do tratamento hormonal.

O grupo 120ALT, assim como o 70ALT, foi composto por éguas que apresentaram formação de CLS em diferentes períodos e éguas que não apresentaram formação lútea até a última avaliação (130 dias de gestação). Nas éguas que receberam altrenogest até os 120 dias nenhum abortamento foi constatado. A concentração de progesterona encontrada por égua aos 120 dias de gestação variou de 1,7 ng/mL a 14,2 ng/mL, de acordo com a presença, ausência e número de corpos lúteos formados.

Holtan et al. (1979) mostraram que após a realização de ovariectomia aos 70 dias em éguas prenhes a gestação foi mantida em 8 de 14 animais e que todas as éguas ovariectomizadas aos 140 e 200 dias permaneceram gestantes. Os autores concluíram que a placenta se torna suficientemente madura para assumir a produção de progestágenos entre 70 e 100 dias de gestação. Desta forma, aos 120 dias, independente da presença de progesterona secretada pelos CLS, a unidade feto-placentária já tem capacidade de manter a gestação. Além disso, nesta fase o alantocório já se expandiu para o topo dos cornos uterinos permitindo a junção de todo o epitélio luminal às células trofoblásticas do alantocório, possibilitando a difusão direta dos progestágenos produzidos pela placenta para o útero (ALLEN, 2001).

Neste estudo foi relatado também o período de formação, número e características dos CLS em éguas cíclicas e acíclicas. O período médio da primeira formação dos CLS por égua nos Grupos 70ALT e 120ALT mostrou grande variação, no entanto, no Grupo Controle, o primeiro CLS foi observado em um intervalo de tempo mais homogêneo. Ao comparar os grupos 70ALT e 120ALT, o dia médio da primeira formação dos CLS foi similar, pois ambos continham éguas acíclicas em sua composição, independente do tempo de tratamento hormonal. Ao comparar com o grupo controle, as éguas acíclicas apresentaram o primeiro CLS em período significativamente maior que as éguas cíclicas.

Confirmando este achado, quando as éguas acíclicas foram subdivididas nos grupos Anestro e Transição e comparadas com as éguas cíclicas do grupo Controle, foi observado que nas éguas onde o tratamento foi iniciado no período de anestro, a primeira formação dos CLS foi mais tardia (média

71,7±7,2 dias) nos animais que apresentaram a formação destas estruturas. Nas éguas onde o tratamento foi iniciado no período de transição a formação dos CLS ocorreu mais cedo (média 53,7±5,4 dias) em relação às éguas em anestro. Já no grupo controle as éguas apresentaram formação do primeiro CLS, em média, aos 39,4±0,9 dias. Em porcentagem, foi possível observar que as éguas cíclicas apresentaram 100% das primeiras formações de CLS antes dos 70 dias de gestação e as éguas em transição e anestro apresentaram 85% e 40%, respectivamente, aos 70 dias. Estes achados levam-nos a sugerir que, quanto maior a atividade folicular no início do tratamento hormonal em éguas acíclicas, mais precoce é a formação dos CLS.

A formação dos CLS está ligada ao componente LH da eCG juntamente com o FSH secretado pela glândula pituitária. Sabe-se que o FSH sofre influência da estação do ano em éguas não-gestantes (GINTHER, 1992) e Squires et al. (1974a) avaliaram o efeito da estação sobre a atividade ovariana em éguas gestantes e observaram que o desenvolvimento folicular até os 30 dias foi maior a medida que a estação reprodutiva avançava. Segundo estes autores, assim como ocorre em éguas não-prenhes, isto pode ser atribuído ao efeito estacional sobre a produção de FSH. A eCG, em contrapartida, não sofre influência da estação (ALLEN, 1974).

Neste estudo foi observado também que os corpos lúteos secundários se originaram de folículos com diâmetro ≥ 30 mm e que os corpos lúteos acessórios se originaram de folículos anovulatórios com diâmetro ≥ 25 mm. Este fato nos leva a sugerir que os folículos se tornam responsivos à fração LH da eCG, quando presente em concentrações adequadas, quando atingem o diâmetro mínimo de 25 mm, assim como já foi demonstrado em éguas não-gestantes durante o ciclo estral (HAYNA et al., 2004). Desta forma o aumento da atividade folicular, influenciado pela sazonalidade, está ligado à formação dos CLS quando a eCG está presente no terço inicial da gestação.

As características ultrassonográficas dos CLS foram diferentes durante o acompanhamento das gestações. Semelhante ao desenvolvimento dos corpos lúteos primários (GINTHER, 1992), alguns CLS apresentaram-se ecogênicos com centro anecóico (cavitários) e posteriormente com células luteais em toda sua dimensão. Outros CLS apresentaram ecogenicidade homogênea em direção à fossa de ovulação, sugerindo formação pós-ovulação, conforme

relatado por Squires et al. (1974c) e Martin et al. (1989), onde estruturas lúteas que apresentam prolongamento em direção à fossa da ovulação são originadas posterior à ocorrência da ovulação. As características descritas acima para a identificação do corpo lúteo secundário (formado pós-ovulação) foram utilizadas no auxílio da caracterização dos CLS, uma vez que o exame ultrassonográfico neste estudo foi realizado a cada cinco dias.

Já os corpos lúteos acessórios apresentaram formato esférico durante o processo de organização e amadurecimento, assim como observado por Squires et al. (1974c). Pelo fato dos corpos lúteos acessórios apresentarem um processo gradual de luteinização a caracterização deste CLS foi possível ser realizada no momento da detecção por meio da imagem ultrassonográfica.

A formação dos CLS nos três grupos apresentou um padrão similar quanto ao período de predominância de ovulações ou luteinizações. Possivelmente, a predominância da formação dos CLS por ovulação no período compreendido entre 36 e 70 dias de gestação se deve ao surgimento e gradual elevação da concentração da eCG e conseqüentemente do LH. A partir deste período, inicia o processo de declínio na concentração do hormônio, devido à regressão dos cálices endometriais (BRINSKO et al., 2011), o que poderia justificar a maior formação dos corpos lúteos acessórios (folículos anovulatórios luteinizados) no período entre 71 e 130 dias. Em éguas cíclicas não-prenhes, já foi sugerido que a formação de folículos anovulatórios pode ser decorrente da baixa concentração de LH (McKINNON, 1997).

O período da formação dos corpos lúteos secundários e acessórios estão de acordo com o encontrado por Squires et al. (1974c). Considerando o total de corpos lúteos formados durante os primeiros 130 dias de gestação, a maioria foi formada a partir do processo de luteinização, assim como observado por Martin et al. (1989) e Ginther (1992) em éguas e por Meira et al. (1998) em jumentas.

O número de corpos lúteos suplementares formados até os 130 dias de gestação variou de 0 a 6 no grupo 70ALT e 0 a 5 no grupo 120ALT. No grupo controle, verificou-se a formação de 2 a 9 CLS, similar ao encontrado por Martin et al. (1989) em éguas e Meira et al. (1998) em jumentas, que observaram 2 a 7 CLS por animal. Quando as éguas foram agrupadas em Anestro e Transição, observou-se a formação de 0 a 3 CLS (Anestro) e 1 a 6

CLS (Transição) por animal. Foi possível observar que nas receptoras acíclicas não ocorreu ou ocorreu formação de CLS em menor número em relação às receptoras cíclicas (grupo Controle). A ausência da formação dos CLS em algumas éguas já foi relatada por Brinsko et al. (2011), no entanto, a causa deste evento ainda não foi descrita. Neste trabalho foi possível observar que somente três éguas não apresentaram formação dos CLS e destes animais todos pertenciam ao grupo Anestro. No grupo Transição todas as éguas apresentaram formação de CLS e estes foram observados em maior número que no grupo Anestro. Estes achados nos levam a sugerir que a condição reprodutiva da égua no início do tratamento hormonal, além de influenciar no período de formação dos CLS, influencia no número de CLS formados.

Quando as médias da concentração de progesterona foram observadas nos grupos Anestro e Transição, verificou-se que o início da síntese de P4 no grupo Anestro é mais tardio que no grupo Transição. O aumento na concentração de P4 em período mais inicial da gestação no grupo Transição se deve à formação dos CLS em fase mais inicial, devido, possivelmente, a maior atividade folicular encontrada no período em que a eCG começa a ser observada no sangue, entre 37 e 41 dias de gestação, como relatado por Cole e Hart (1930) e Brinsko et al. (2011). Em contrapartida, as éguas do grupo Anestro apresentaram baixa atividade folicular nos ovários no período em que já foi relatado o aparecimento do eCG e somente com o avançar da estação e conseqüentemente com o aumento do FSH que, provavelmente, algumas éguas do grupo Anestro (4 de 7) tornaram-se responsivas ao eCG circulante, formando os CLS.

No período compreendido entre 45 e 120 dias de gestação, aproximadamente, as concentrações de progesterona do grupo Transição foram maiores que as do grupo Anestro. É importante mencionar que o perfil de progesterona do grupo Transição reflete a produção de progesterona de sete éguas e que todas contribuíram com a formação de CLS, variando de um a seis por animal, até os 130 dias de gestação. Já o perfil de progesterona do grupo Anestro reflete a produção de P4 por 8 éguas, no entanto, apenas quatro contribuíram com a formação de CLS até os 130 dias e o número de corpos lúteos por animal variou de um a três. Este achado justifica as menores concentrações de progesterona encontradas no grupo Anestro.

As concentrações de progesterona nas éguas cíclicas encontravam-se abaixo de 1 ng/mL no dia da ovulação e aumentaram até o 10º dia de gestação, diminuindo nos 20 dias subsequentes. Estes achados estão de acordo com os encontrados por vários autores em éguas (GINTHER, 1992; HOLTAN et al., 1975; SQUIRES et al., 1974; ALLEN, 2001a) e por Meira et al. (1998) em jumentas e são atribuídos a formação do corpo lúteo primário. A partir dos 30 dias de gestação, antes da primeira detecção dos CLS (38 dias em média), foi observado um aumento na concentração de P4. Este aumento pode ter sido causado pela ação da eCG sobre o corpo lúteo primário, provocando seu ressurgimento, como já foi descrito por alguns autores (BERGFELT et al.; 1989; DAELS et al., 1998, GINTHER, 1992).

O aumento na concentração de P4 a partir dos 35 dias de gestação foi contínuo e decorrente das primeiras formações dos CLS entre 38 e 43 dias, atingindo níveis elevados entre 60 e 120 dias, devido à produção de P4 pelos CLS em crescente formação. É importante observar os valores altos do erro padrão encontrados entre os dias 60 e 130 de gestação. Este achado é atribuído à grande variabilidade no número de CLS formados, uma vez que neste grupo foram encontrados 2 a 9 CLS por animal e a medida que a gestação avançava um maior número de CLS foram encontrados.

Quando os perfis de progesterona foram comparados entre o grupo de éguas cíclicas e acíclicas, foi possível constatar que até os 40 dias, aproximadamente, os valores de P4 nas éguas acíclicas foram menores que 1 ng/mL, devido a ausência de corpo lúteo primário e à não detecção do altrenogest pela técnica de radioimunoensaio (MCKINNON et al., 1988; VOLLER et al., 1991). A partir dos 38 e 45 dias de gestação, as concentrações de P4 se elevaram no grupo Controle e Acíclicas, respectivamente, como resultado do início da formação dos CLS, embora em maior proporção nas éguas cíclicas, em função da contribuição do CLP à síntese de P4 pelos CLS. Além disso, a maior concentração de P4 nas éguas cíclicas se deve também ao maior número de CLS formados ao longo do tempo.

A partir dos 110 dias as concentrações de progesterona das éguas cíclicas do grupo Controle iniciaram um processo de declínio e nas éguas acíclicas as concentrações permaneceram em elevação. As formações dos

primeiros e últimos CLS nas éguas cíclicas ocorreram em fase mais inicial da gestação (38 e 93 dias, em média, respectivamente), o que possivelmente pode ter levado ao declínio das concentrações de P4 em período mais inicial. Nas éguas acíclicas, a maioria das primeiras formações de CLS ocorreu em fase mais tardia da gestação e as últimas foram observadas, em média, aos 123 dias, o que poderia justificar a continuidade do processo de elevação da concentração de P4 até os 130 dias.

O aumento na concentração de P4 (>1 ng/mL) a partir dos 90 dias de gestação nas éguas acíclicas que não apresentaram formação de CLS pode ser atribuído a crescente produção de progestágenos pela unidade feto-placentária nesta fase gestacional, como relatado por Lagneaux e Palmer (1993) e Holtan et al. (1979) em éguas ovariectomizadas.

O desenvolvimento da vesícula embrionária foi similar entre o grupo tratado com altrenogest e o grupo Controle. Este achado está de acordo com o estudo de Voller et al. (1991), onde não foi encontrado efeito da administração de altrenogest sobre o desenvolvimento da vesícula em éguas gestantes tratadas com PGF2 α para destruir o corpo lúteo primário. Adicionalmente, Willman et al. (2011) suplementaram receptoras cíclicas (com corpo lúteo primário) com altrenogest e também não observaram efeito do tratamento sobre o tamanho da vesícula embrionária.

Durante o processo de desenvolvimento da vesícula embrionária foi observada uma redução na taxa de crescimento entre 20 e 30 dias de gestação, similar ao observado por Ginther (1995) em éguas e Gastal et al. (1993) e Meira et al. (1998) em jumentas, sendo atribuído ao aumento do tônus uterino limitando a expansão da vesícula.

Quanto ao conceito, as médias encontradas entre 20 e 60 dias de gestação foram similares em todas as avaliações entre o grupo tratado e controle. Willmann et al. (2011), ao investigar o efeito do tratamento com altrenogest em éguas prenhes, contendo corpo lúteo primário, sobre o desenvolvimento do conceito, observaram uma melhora no desenvolvimento embrionário/fetal em éguas tratadas, com idade acima de 8 anos, no período de 30 a 45 dias de gestação. No presente trabalho não foi observada influência do altrenogest sobre o desenvolvimento do conceito quando administrado para manter a gestação em receptoras acíclicas

7. CONCLUSÕES

- a) Sugere-se que a interrupção do tratamento com progestágeno em receptoras gestantes acíclicas aos 70 dias permite a manutenção da gestação quando as éguas apresentam formação de CLS há pelo menos 10 dias. Além disso, a interrupção do tratamento aos 120 dias de gestação permite a continuidade da gestação em todas as receptoras, independente da presença ou ausência dos CLS nos ovários.
- b) A primeira formação dos CLS em éguas acíclicas ocorre em período mais avançado da gestação do que em éguas cíclicas. Quando éguas acíclicas encontram-se em anestro no momento da transferência de embrião a formação dos CLS ocorre em período gestacional mais avançado em relação àquelas que se tornam gestantes na fase transicional. Adicionalmente, éguas em transição formam maior número de CLS em relação às éguas em anestro.
- c) A elevação da concentração de progesterona sintetizada pelos CLS em éguas receptoras acíclicas gestantes inicia em período gestacional mais avançado, assim como o perfil da concentração do hormônio durante os primeiros 130 dias de gestação apresenta-se inferior em relação às receptoras cíclicas.
- d) O desenvolvimento do concepto em éguas acíclicas tratadas com altrenogest é similar ao de éguas não tratadas nos primeiros 60 dias de gestação.

8. REFERENCIAS

ALLEN, W.E. Ovarian changes during gestation in pony mares. *Equine Veterinary Journal*, v.6, p.135-138, 1974.

ALLEN, W.R. Luteal Deficiency and Embryo Mortality in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*, v.36, p.121-131, 2001a.

[ALLEN, W.R.](#) Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v.121, p.513-527, 2001b.

AUPPERLE, H.; OZGEN SSSHOON, H.A.; SCOON, D.; HOPPEN, H.O.; SIEME, H.; TANNAPFEL, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Veterinary Journal*, v.32, n.3, p.228-232, 2000.

BERGFELT, D.R.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*, v.21, p.261-270, 1989.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. Pregnancy: Physiology and Diagnosis. In: *Manual of Equine Reproduction*, 3 ed., Editora Mosby Elsevier, 2011. chap.7, p.85-93.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWAL, D.K; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.54, p.965-79, 2000.

COLE, H.H., HART, G.H. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *American Journal of Phisiology*, v. 83, p.57-68, 1930.

DAELS, P.F.; ALBRECHT, B.A.; MOHAMMED, H.O. Equine Chorionic Gonadotropin Regulates Luteal Steroidogenesis in Pregnant Mare. *Biology of Reproduction*, v.59, p.1062-1068, 1998.

DE MESTRE, A.M.; ANTCZAK, D.F.; ALLEN, W.R. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG). In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER D.D. *Equine Reproduction*. 2 ed., Editora Blackwell Publishing, 2011. chap.172, p.1648-1663.

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*, Supplement 23, p.193-200, 1975.

FARIA, D.R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.2, p.114-122, 2010.

FITZGERALD, B.P.; McMANUS, C.J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mares. *Biology of Reproduction*, v.63, p. 335-340, 2000.

FREEDMAN, L.J.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. *Biology of Reproduction*, v.20, p.567-574, 1979.

GASTAL E.L.; SANTOS G.F.; HENRY, M.; PIEDADE H.M. Embryonic and fetal development in donkeys. *Equine Veterinary Journal*, v.15 (Suppl), p.10-13, 1993.

GINTHER, O.J.; FIRST, N.L. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *American Journal of Veterinary Research*, v.32, p.1687-1691, 1971.

GINTHER, O.J. Occurrence of anestrous, estrous, diestrus and ovulation over a twelve-month period in mares. *American Journal of Veterinary Research*, v.35, p.1173-1179, 1974.

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

GINTHER, O.J. Embryo. In: *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses, Book 2*. Cross Plains WI:Equiservices, p.123-155, 1995.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction*, v.1, n.1, p. 31-44, 2004.

GENTRY L.R.; THOMPSON, D.L.; GENTRY, JR. G.T.; DAVIS, K.A.; GODKE, R.A.; CARTMILL. J.A. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *Journal of Animal Science*, v.80, p. 2695-2703, 2002.

GRECO, G.M.; AVANZI, B.R.; FIORATTI, E.G.; QUEIROZ, F.J.R.; MEIRA, C.; ALVARENGA, M.A. Efeito da interrupção do tratamento com progesterona em éguas receptoras acíclicas apresentando a formação de corpos lúteos acessórios. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36 (Supl.2), 2008.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7 ed. Editora Manole, 2004. 513p.

HAYNA, J.T.; MADILL, S.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of transvaginal follicular aspiration on Corpus luteum formation in mares. In: *6TH International Symposium on Equine Embryo Transfer*. Rio de Janeiro, Brasil, p.35, 2004.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, v.21, p.897-909, 1984.

HINRICHS K, SERTICH PL, CUMMINGS MR, KENNEY MR. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*, Suppl. 3, p.74-75, 1985.

HINRICHS K, SERTICH PL, KENNEY RM. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology*, v.26, p.455-60, 1986.

HINRICHS, K.; KENNEY, R.M. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized mares. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.35, p.439-443, 1987.

HOLTAN, D.W.; NETT, T.M.; ESTERGREEN, V.L. Plasma progesterone in pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 23, p.419-424, 1975.

HOLTAN, D.W.; SQUIRES, E.L.; LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 27, p.457-463, 1979.

HOLTAN, D.W.; HOUGHTON, E.; SILVER, M.; FOWDEN, A.L.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P.D. Plasma progestagens in the mare fetus and newborn foal. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 44, p.517-528, 1991.

KOSKINEN, E.; KATILA, T. Onset of luteal activity in non-foaling mares during the early breeding season in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.32, p.319-325, 1991.

KUBIAK, J.R.; CRAWFORD, B.H.; SQUIRES, E.L.; WRIGLEY, R.H.; WARD, G.M. The influence of energy intake and percentage body fat on the reproductive performance of nonpregnant mare. *Theriogenology*, v.28, p.587-598, 1987.

LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine Veterinary Journal*, Suppl. 15, p. 107-110, 1993.

LANGLOIS, B.; BLOUIN, C. Effect of a horse's month of birth on its future performances. In: 47th Annual Meeting of the European Association for Animal production, 1996. *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the European Association for Animal production*, 1996.

MARTIN, J.L.; SALTIEL, A.; EVANS, J.W. Progesterone synthesis by different types of corpora lutea during the first 198 days of pregnancy. *Equine Veterinary Science*, v.9, p.84-87, 1989.

McDANIEL, J.B; KREIDER, J.L.; THRASHER, D.M. The influence of artificial light and a nutritional supplement on the onset of the breeding season in mares. *Journal of Animal Science*, v.49. suppl. 1, p. 54-55, 1979.

McDOWELL KJ, ADAMS MH, ADAM CY, SIMPSON KS. Changes in equine endometrial oestrogen receptor α and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.117, p. 135-142, 1999.

McKINNON AO, SQUIRES EL, CARNEVALE EM, HERMENET MJ. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, v.29, p.1055-63, 1988.

McKINNON, A.O. Ovarian Abnormalities. In: RANTANEN, N.W.; McKINNON, A.O. *Equine Diagnostic Ultrasonography*. Baltimore, Williams e Wilkins, 1997.

McKINNON, A.O.; LESCUN, T.B.; WALKER, J.H.; VASEY, J.R.; ALLEN, W.R. The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. *Equine Veterinary Journal*, v.32, n.1, p. 83-85, 2000.

MEIRA, C.; FERREIRA, J.C.P.; PAPA F.O.; HENRY, M. Ovarian activity and plasma concentrations of progesterone and estradiol during pregnancy in jennies. *Theriogenology*, v. 49, p. 1465-1473, 1998.

MORROW, C.M.; BURNS, P.J. Evaluation of bio-release altrenogest LA 150 for maintenance of pregnancy in mares. In: Conferencia Internacional de Caballos de Deporte, 2007, San Jose, Costa Rica, *Anais de CICADE*, 2007, 4p.

NAGY, P.; GUILLLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.245-62, 2000.

PINTO, C.R.F. Progestagens and Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. 2^o Ed. Blackwell Publishing, 2011. vol.2, chap.189, pg.1811-1817.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSÔA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004.

SALAZAR-ORTIS, J.; CAMOUS, S.; BRIANT, C.; LARDIC, L.; CHESNEAU, D.; GUILLAUME, D. Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9:130, 16p., 2011.

SAS INSTITUTE, 2009. SAS/STAT 9.2 User's Guide. 2 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; EIKENBERRY, D.J.; PICKETT, B.W. Progestogen therapy of ovariectomized pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 32, p.459-464, 1982.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. *Journal of Animal Science*, v.38, p.823–830, 1974a.

SQUIRES, E.L.; WENTWORTH B.C.; GINTHER, O.J. Progesterone concentration in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. *Journal of Animal Science*, v.39, p.759–767, 1974b.

SQUIRES, E.L.; DOUGLAS, R.H.; STEFFENHAGEN, W.P.; GINTHER, O.J. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. *Journal of Animal Science*, v.38, n.2, p.330-338, 1974c.

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

STEWART, F.; ALLEN, W.R.; MOOR, R.M. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *Journal of Endocrinology*, v. 71, p 371-382, 1976.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. *Journal of Reproduction and Fertility* ,Supplement 27, p.431-440, 1979.

THORBURN, G.D. A speculative view of parturition in the mare. *Equine Veterinary Journal*, Suppl. 14, p.41-49, 1993.

URWIN, V.E.; ALLEN, W.R. Pituitary and chorionic gonadotrophin control of ovarian function during early pregnancy in equids. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 32, p.371-382, 1982.

VAN NIEKERK, C.H.; VAN HEERDEN, J.S. Nutrition and ovarian activity of mares early in the breeding season. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, v.43, p.351-360, 1972.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. 2^o Ed. Blackwell Publishing, 2011. vol.2, chap.170, pg.1637-1641.

VOLLER, B.E.; PARRY-WEEKS, L.C.; HOLTAN, D.W. The effect of Regu-Mate, a synthetic progestin, on early pregnancy maintenance, conceptus growth, and corpora lutea development in pregnant pony mares. *Equine Nutrition and Physiology Society (Refereed Papers from the 11th Symposium)*, v.11, n.1, p.46-50, 1991.

WATSON ED, SKOLNIK SB, ZANECOSKY HZ. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology*, v.38, p.575-580, 1992.

WILLMANN, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; PARVIZI, N.; AURICH, C. Effects of age and altrenogest treatment on conceptus development and secretion of LH, progesterone and eCG in early- pregnant mares. *Theriogenology*, v.75, p.425-428, 2011.

ZAVY MT, MAYER R, VERNON MW, BAZER FW, SHARP DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.27, p.403-411, 1979

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para a revista “**Veterinária e Zootecnia**” (protocolo de envio está apresentado na página 74 dos Anexos).

ISSN: 0102-5716

Normas para publicação disponível em:

http://www.fmvz.unesp.br/revista/port/instrucoes_autores.pdf

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

**ASPECTOS RELACIONADOS À FORMAÇÃO, FUNÇÃO E REGRESSÃO
DOS CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES EM ÉGUAS**

**ASPECTS RELATED TO FORMATION, FUNCTION AND REGRESSION OF
SUPPLEMENTARY CORPORA LUTEA IN MARES**

**ASPECTOS RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN, FUNCIÓN Y
REGRESIÓN DE LOS CUERPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES EN YEGUAS**

Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva¹
José Nicolau Próspero Puoli Filho²
Cezinande de Meira³

¹ Mestranda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu – SP – Brasil

² Professor Assistente Doutor do Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu – SP – Brasil

³ Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu – SP – Brasil.

Autor para correspondência: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva. Email: elisa_santanna@yahoo.com.br
Endereço: Depto. de Reprod. Animal e Radiol. Vet., FMVZ, Unesp – Campus de Rubião Jr., s/n – Botucatu – SP – Brasil. CEP: 18.618 – 970. Tel.: (14) 3811 6249

1 **RESUMO**

2 **ASPECTOS RELACIONADOS À FORMAÇÃO, FUNÇÃO E REGRESSÃO**
3 **DOS CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES EM ÉGUAS**

4 Os corpos lúteos suplementares (CLS) são estruturas ovarianas que se
5 desenvolvem a partir dos 36-40 dias de gestação, através do estímulo
6 hormonal da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) secretada pelos cálices
7 endometriais. Os CLS são compostos pelos corpos lúteos acessórios,
8 resultantes da luteinização dos folículos anovulatórios e pelos corpos lúteos
9 secundários, formados a partir da ovulação de alguns folículos. Junto com o
10 corpo lúteo primário e a unidade feto-placentária, constitui-se em uma das
11 fontes de progesterona que contribui para a manutenção da gestação nos
12 equinos. O processo que dá origem aos corpos lúteos suplementares envolve,
13 além do aspecto endocrinológico, fatores imunológicos desencadeados pela
14 origem aos cálices endometriais, que por sua vez secretarão o eCG
15 estimulando a formação dos CLS. No entanto, o significado desta invasão e
16 posterior resposta imunológica vão além da formação dos CLS e envolve
17 mecanismos responsáveis pela manutenção da gestação. A suplementação de
18 progesterona por estes corpos lúteos possui tempo limitado e a regressão
19 dessas estruturas está ligada ao mecanismo de regressão dos cálices
20 endometriais, embora este último ocorra antes da regressão dos CLS. O
21 estudo dos CLS possibilita o esclarecimento da real contribuição destes à
22 manutenção da gestação, além de possibilitar redução nos tratamentos
23 hormonais utilizados em programas de transferência de embriões.

24

25 **Palavras-chave:** Corpos lúteos suplementares; Cálices endometriais; Égua;
26 Progesterona.

27

28 **ABSTRACT**

29 **ASPECTS RELATED TO FORMATION, FUNCTION AND REGRESSION OF**
30 **SUPPLEMENTARY CORPORA LUTEA IN MARES**

31 Supplementary corpora lutea (SCL) are ovarian structures that develop from 36-
32 40 days of gestation through equine chorionic gonadotropin (eCG) hormonal
33 stimulation, secreted by the endometrial cups. The SCL are composed by

1 accessory corpora lutea, resulting from follicle luteinization and by secondary
2 corpora lutea, which arise from follicle ovulation. These structures, together with
3 the primary corpus luteum and the fetoplacental unit, constitute one of the
4 progesterone sources that contribute to pregnancy maintenance in equine
5 species. The process that gives rise to the supplementary corpora lutea
6 involves endocrine and immunological features. Trophoblastic fetal cells invade
7 the underlying endometrium and differentiate themselves into endometrial cups,
8 that in turn secrete eCG stimulating the SCL formation. However, the purpose
9 of this invasion and its subsequent immunological response involves pregnancy
10 maintenance mechanisms. Progesterone supplementation by these corpora
11 lutea is limited, so that around 180-200 days there is no luteal structures on
12 ovarian tissue. Regression of supplementary corpora lutea is connected to
13 endometrial cups regression, although the latter occurs before the SCL
14 regression. The SCL review allows explanation of the real contribution of these
15 structures to pregnancy maintenance and also enables hormone treatment
16 reduction applied in embryo transfer programs.

17

18 **Key-words:** Supplementary corpora lutea; Endometrial cups; Mares;
19 Progesterone

20

21 **RESUMEN**

22 **ASPECTOS RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN, FUNCIÓN Y** 23 **REGRESIÓN DE LOS CUERPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES EN YEGUAS**

24 Los cuerpos lúteos suplementarios (CLS) son estructuras ováricas que se
25 desarrollan a partir de los 36-40 días de gestación, a través del estímulo
26 hormonal de la gonadotropina coriónica equina (eCG) secretada por las copas
27 endometriales. Los CLS están compuestos por los cuerpos lúteos accesorios
28 que resultan de la luteinización de los folículos anovulatorios y por los cuerpos
29 lúteos secundarios, formados a partir de la ovulación de algunos folículos. En
30 conjunto con el cuerpo lúteo primario y la unidad fetoplacentaria, los CLS
31 constituyen una de las fuentes de progesterona encargadas de mantener la
32 gestación en los équidos. El proceso que da origen a los CLS involucra,
33 además del aspecto endocrinológico, factores inmunológicos desencadenados

1 a consecuencia de la génesis de las copas endometriales, que a su vez,
2 secretaran eCG estimulando así la formación de los CLS. Sin embargo, el
3 significado de esta invasión y la respuesta inmunológica ulterior va más allá de
4 la formación de los CLS y está relacionada con los mecanismos responsables
5 por el mantenimiento de la gestación. La secreción de progesterona por parte
6 de los CLS tiene un periodo limitado y su regresión está ligada al mecanismo
7 de regresión de las copas endometriales, a pesar de este último ocurrir antes
8 que la de los CLS. El estudio de los CLS posibilita el esclarecimiento de la
9 contribución real de estas estructuras al mantenimiento de la gestación,
10 además de posibilitar la reducción de los tratamientos hormonales utilizados en
11 programas de transferencia de embriones.

12

13 **Palabras-clave:** Cuerpos lúteos suplementarios; Copas endometriales;
14 Yeguas; Progesterona

15

16 **INTRODUÇÃO**

17 A manutenção da gestação em equinos, assim como nas demais
18 espécies domésticas, requer constante síntese de progesterona. Sabe-se que
19 em éguas a progesterona tem inicialmente origem ovariana, sendo secretada
20 pelo corpo lúteo primário (CLP) e, a partir dos 36-40 dias de gestação, pelo
21 conjunto CLP e corpos lúteos suplementares (CLS). Aproximadamente aos 180
22 dias de gestação não há mais produção de progesterona pelos corpos lúteos
23 da égua e a unidade feto-placentária, embora já contribuindo com a produção
24 de progestágenos no período anterior à regressão dos CLS, assume a
25 produção até a fase final da gestação (1).

26 A embriogênese na espécie equina possui uma característica única no
27 que diz respeito ao desenvolvimento da cinta coriônica e à sua posterior
28 invasão do endométrio (2). No início da gestação, concentrações altas do
29 hormônio gonadotrofina coriônica equina (eCG) aparecem no soro materno. O

1 eCG é secretado por estruturas placentárias chamadas cálices endometriais,
2 as quais se originam das células trofoblásticas da cinta coriônica e, após certo
3 tempo de atividade, são imunologicamente destruídas (3, 4). Este hormônio,
4 juntamente com o hormônio folículo estimulante (FSH) liberado pela glândula
5 pituitária, é responsável pela formação dos CLS na égua gestante. Os CLS
6 complementam a produção de progesterona secretada pelo CLP, sendo
7 observadas aproximadamente no 40° dia de gestação e regredindo em torno
8 dos 150-200 dias (4).

9 O objetivo deste trabalho é discorrer sobre os principais aspectos
10 relacionados aos corpos lúteos suplementares. Serão abordados os complexos
11 mecanismos envolvidos com sua origem, assim como suas características,
12 função e os processos responsáveis pela sua regressão. Além disso, será
13 discutida a relação dos CLS com o tempo de tratamento com progestágenos
14 administrado em receptoras acíclicas nos atuais programas de transferência de
15 embriões.

16

17 **REVISÃO DE LITERATURA**

18 **Produção de progesterona durante a gestação em éguas**

19 A progesterona (P4) é o hormônio fundamental para a manutenção da
20 prenhez (5, 6). Todos os animais domésticos necessitam da constante
21 produção de P4 e de seus ativos metabólicos biológicos, como as 5 α –
22 dihidroprogesteronas (5 α DHP), para manter adequado ambiente uterino para o
23 desenvolvimento do feto. Diferentemente da cabra, porca, vaca e cadela, que
24 apresentam a produção total de progesterona da gestação a partir do
25 prolongamento da funcionalidade do corpo lúteo, a égua necessita de quatro

1 componentes que se combinam para gerar a produção total de progesterona e
2 progestágenos (Ex: 5 α -pregnonas) necessários à manutenção da gestação,
3 sendo estes o corpo lúteo primário, os corpos lúteos suplementares, o
4 alantocório e as glândulas adrenais do feto (5).

5 O corpo lúteo primário (CLP) é aquele formado logo após a ovulação
6 cujo ovócito liberado pelo folículo levou à formação do concepto. Em éguas
7 gestantes o CLP persiste além da sua vida cíclica normal de 14-16 dias devido
8 ao reconhecimento materno da gestação, período no qual o embrião secreta
9 fatores luteostáticos para permitir a continuidade da gestação (1, 7). Tendo
10 resistido ao processo da luteólise durante os dias 14-16 pós-ovulação, o CLP
11 persiste nos ovários, mas os níveis de progesterona decrescem
12 gradativamente durante os próximos 20 dias ou mais (7).

13 Os corpos lúteos suplementares começam a se desenvolver nos ovários,
14 ao redor dos 40 dias de gestação (1, 4, 8, 9). Os CLS produzem progesterona
15 após a ovulação ou luteinização dos folículos, em resposta à fração LH do eCG
16 sobre os folículos mais avançados das ondas foliculares estimuladas pela
17 contínua secreção de FSH pela pituitária (1, 7, 10).

18 A progesterona produzida pelos CLS complementa a P4 produzida pelo
19 CLP e juntos mantêm a gestação nos primeiros cinco meses de prenhez (4).
20 Todos os corpos lúteos, tanto o primário quanto os suplementares, degeneram
21 por volta dos 150-200 dias de gestação (1,4, 7, 8, 9).

22 Durante o período de expansão do alantocório, entre os dias 40 e 120 de
23 gestação, as células trofoblásticas adquirem capacidade de sintetizar diversos
24 hormônios (5). Dentre eles, destaca-se a progesterona e os metabólitos 5 α DHP
25 e 20 α -hidroxi-5 α -pregnane-3-ona, observados ao redor dos 70 dias de

1 gestação, sendo produzidos pela utilização exclusiva de fontes maternas de
2 colesterol (11).

3 Desta forma, entre os dias 70 e 120 de gestação, as concentrações de
4 progesterona e progestágenos encontrados no plasma representam uma
5 mistura de P4 secretada pelos corpos lúteos primário e suplementares em
6 processo de declínio e pelos progestágenos da placenta secretados pelo
7 alantocório em crescimento (5).

8 Nas últimas 4 a 6 semanas de gestação, as glândulas adrenais em
9 crescimento e em processo de maturação do feto secretam quantidades
10 crescentes de pregnenolona, a qual é convertida à progestágeno pelo
11 alantocório (12).

12

13 **Cálices endometriais**

14 Por volta do 25º dia de gestação, células trofoblásticas fetais sofrem
15 mudanças celulares para formar a cinta coriônica no local de junção do
16 alantóide em desenvolvimento com o saco vitelínico em regressão. Essas
17 células trofoblásticas da cinta coriônica invadem o epitélio uterino adjacente
18 aproximadamente aos 38 dias de gestação, migrando para a lâmina própria
19 para se diferenciar nos cálices endometriais (4, 7, 10). Cada unidade destes é
20 composta de uma densa massa de células trofoblásticas epitelióides,
21 binucleadas, entremeadas por alguns vasos sanguíneos e pelas porções
22 fúndicas distendidas das glândulas endometriais (13). Macroscopicamente, os
23 cálices constituem protuberâncias endometriais em forma de círculo ou
24 ferradura ao redor do concepto no corno uterino gravídico (1). Medem 1 a 2 cm
25 de largura, podendo variar consideravelmente no comprimento, desde

1 estruturas bem individualizadas de 1 a 3 cm a “fitas” alongadas que podem
2 medir acima de 20 cm de comprimento. Essas diferenças advêm da
3 configuração do endométrio e da tonicidade do miométrio no momento da
4 invasão da cinta coriônica (14).

5 A formação dos cálices endometriais possui dois aspectos importantes
6 na manutenção da gestação. O primeiro diz respeito ao aspecto
7 endocrinológico, em que há secreção de eCG pelas células dos cálices. O
8 eCG, hormônio glicoprotéico de alto peso molecular, é liberado inicialmente
9 para a circulação materna através do sistema linfático que drena o útero e mais
10 tarde se acumula na secreção exócrina das glândulas endometriais, através da
11 liberação dos componentes presentes nas células dos cálices em degeneração
12 (15). Este hormônio é observado em amostras de sangue de éguas gestantes
13 em torno de 37 a 41 dias, aumentando rapidamente para níveis elevados ao
14 redor dos 60-80 dias, quando então decresce lentamente para níveis baixos ou
15 não detectáveis por volta dos 120 a 160 dias (4, 16). A característica mais
16 incomum e interessante da molécula de eCG é a capacidade que possui de
17 expressar atividade biológica tanto de FSH quanto de LH (hormônio
18 luteinizante), em uma fração de 1.4:1 (17), quando administrado para outras
19 espécies domésticas (10). No entanto, o eCG possui baixa capacidade de se
20 ligar aos receptores gonadais dos próprios equinos (<2%) em relação a
21 capacidade ligante do FSH e LH da pituitária (18).

22 Na égua, durante o período de plena atividade, o componente LH do
23 eCG luteiniza folículos que se desenvolvem durante a primeira metade da
24 gestação pela contínua liberação de FSH pela pituitária (não pela fração FSH
25 do eCG) ou eventualmente estimula a ovulação desses folículos (7), formando

1 os corpos lúteos acessórios (luteinização dos folículos anovulatórios) e corpos
2 lúteos secundários (ovulação dos folículos). O conjunto dos corpos lúteos
3 acessórios e corpos lúteos secundários recebe a denominação de corpos
4 lúteos suplementares (1,4)

5 O segundo aspecto diz respeito à reação imunológica causada pelas
6 células trofoblásticas invasoras que irão formar os cálices endometriais. Estas
7 células especializadas expressam altas concentrações de antígenos paternos
8 ligados ao complexo de histocompatibilidade maior da classe I (MHC I) antes e
9 alguns dias após a invasão. Desta forma provocam uma forte resposta imune
10 humoral pela mãe, verificado pela presença de altos títulos de anticorpos anti-
11 paternos no soro (19,20). Além disso, a invasão pelas células coriônicas
12 também provoca uma forte resposta celular no endométrio. O aparecimento de
13 linfócitos no estroma endometrial ocorre poucas horas após a invasão inicial
14 das células da cinta coriônica e aumentam em número drasticamente a partir
15 do dia 60-70 de gestação. Nesta fase também há o aparecimento de células
16 mononucleares, como as células do plasma, macrófagos e eosinófilos (21,22).

17 As interações imunológicas que ocorrem pela formação dos cálices
18 endometriais possuem importantes significados. O breve período de expressão
19 dos antígenos conjugados ao MHC I pelas células da cinta coriônica provoca
20 um estímulo específico ao sistema imune materno, possivelmente
21 neutralizando a citotoxicidade das células NK (do inglês “natural killer”)
22 presentes no epitélio uterino no momento da invasão das células da cinta
23 coriônica (23). Além disso, Donaldson et al. (24) demonstraram que os cálices
24 endometriais já diferenciados não expressam moléculas do MHC I. A
25 expressão prolongada do MHC I poderia ser deletéria, por provocar a geração

1 de linfócitos T citotóxicos e conseqüente perda dos cálices endometriais e do
2 feto.

3 A expressão dos antígenos conjugados ao MHC I também torna capaz a
4 produção de células T auxiliares, como evidenciados pela presença de
5 anticorpos anti-paternos na égua, assim como possibilita o reconhecimento
6 pelos linfócitos T CD8+. A explicação mais aceitável para estes eventos
7 imunológicos, a partir da presença desses elementos, é o direcionamento do
8 sistema imune materno para a elaboração do padrão Th2 (tipo de célula
9 auxiliar) de resposta, o qual favorece a manutenção da prenhez (25) .

10 É importante ressaltar o estudo realizado por Allen et al. (26), em que foi
11 realizado a transferência de um embrião de jumento para uma égua receptora.
12 No estudo em questão, foi verificado um pobre desenvolvimento das células
13 trofoblásticas que constituem a cinta coriônica nos dias 36-38 de gestação.
14 Como resultado, não houve o desenvolvimento dos cálices endometriais e não
15 foi constatado a presença do eCG no sangue materno. Ainda assim, o
16 concepto continuou a se diferenciar e desenvolver até aproximadamente os
17 dias 60-65 de gestação, quando então, na ausência da interdigitação normal
18 das vilosidades coriônicas com o endométrio que acontecem normalmente nos
19 dias 42-45, iniciou um processo de degeneração e morte.

20 O modelo experimental de Allen e colaboradores mostra a importância
21 da reação causada pela formação dos cálices endometriais para ocorrer a
22 placentação e a sobrevivência do embrião, pelo forte estímulo antigênico que
23 as células trofoblásticas da cinta coriônica causam no organismo materno,
24 fornecendo uma resposta imunológica protetora em relação ao feto.

1 A falha no desenvolvimento dos cálices endometriais neste modelo
2 “embrião de jumento em útero de égua” ocorreu em 70% dos casos. Por outro
3 lado, constatou-se que este processo não ocorreu nos 30% dos casos
4 restantes. Não houve o desenvolvimento dos cálices endometriais, entretanto
5 ocorreu a implantação e interdigitação do alantocórion com o endométrio, em
6 menor velocidade que nos casos de implantação convencionais (embrião égua
7 – útero égua), porém ocorreu o desenvolvimento normal do feto e o nascimento
8 a termo (13). Este fato levantou a questão de quando este fenômeno pode ser
9 imunologicamente ou geneticamente mediado. Além disso, questionou a real
10 importância dos CLS, levando em consideração a ocorrência de gestações
11 viáveis na ausência do desenvolvimento dos cálices endometriais e
12 conseqüentemente dos corpos lúteos suplementares (7).

13

14 **Características dos corpos lúteos suplementares**

15 Os corpos lúteos suplementares são glândulas associadas à dinâmica
16 folicular. Essas estruturas começam a se formar aproximadamente no 40° dia
17 de gestação, se desenvolvendo em glândulas luteais funcionais, muitas das
18 quais são comparáveis ao corpo lúteo primário (1). O número de corpos lúteos
19 aumenta à medida que a gestação avança, com relatos de formação até os 100
20 dias (27,28). Os CLS ainda são observados nos ovários de alguns animais aos
21 180-200 dias de gestação (1,9).

22 A aparência dos CLS varia consideravelmente, refletindo em uma
23 divergência na morfologia. Entre os dias 40 e 70, aproximadamente, alguns
24 CLS são extremamente grandes e possuem inicialmente aparência de um
25 coágulo. Estes, com o tempo, reduzem em tamanho e adquirem células luteais

1 de forma semelhante ao corpo lúteo maduro. Entretanto, alguns corpos lúteos
2 suplementares passam por estágios de desenvolvimento semelhantes àqueles
3 do corpo lúteo primário: alguns são relativamente sólidos, enquanto outros
4 apresentam cavidades centrais de diferentes diâmetros (1). Estruturas
5 esféricas são originadas de folículos anovulatórios (8), ao passo que estruturas
6 que apresentam um prolongamento em direção à fossa da ovulação são
7 originadas do processo de ovulação (8,9).

8 O estudo de Martin et al. (9) relata diferença quanto à fase de ocorrência
9 dos corpos lúteos acessórios e dos corpos lúteos secundários. Observou-se
10 maior número de corpos lúteos formados a partir da ovulação (secundários)
11 durante os primeiros 120 dias de gestação, com a primeira observação
12 realizada nos dias 39-45 de gestação, enquanto verificou-se maior número de
13 corpos lúteos formados pela luteinização (acessórios) durante os 121-198 dias
14 de gestação, sendo o primeiro observado no 39º dia. Já Squires et al. (8) e
15 Silva et al. (28) sugerem que os corpos lúteos secundários estejam presentes
16 em uma fase mais inicial da gestação, compreendida entre os 40 e 70 dias e os
17 acessórios principalmente após os 70 dias. Considerando o total de corpos
18 lúteos formados durante a gestação, pelo menos dois terços dos CLS se
19 formam a partir da luteinização dos folículos (1,9). No período compreendido
20 entre 80 e 100 dias de gestação, observou-se o maior número de CLS (8,28).

21 Meira et al. (27) avaliaram a atividade ovariana e a concentração
22 plasmática de estrógeno e progesterona em jumentas gestantes, detectando-se
23 o primeiro corpo lúteo secundário no dia 41.8 ± 1.0 e aumento em número até
24 o dia 100 de gestação. Segundo este autor, a maioria dos CLS formados
25 (79.3%) apresentava formato esférico e pouca ecogenicidade, sugerindo que

1 foram formados pela luteinização de folículos < 30 mm de diâmetro. Já 13.8%
2 do total de CLS apresentavam formato irregular, eram hiperecogênicos e
3 pareciam se prolongar em direção à fossa ovulatória, sugerindo que alguns
4 corpos lúteos suplementares podem se formar após a ovulação de grandes
5 folículos. Esses achados mostram a similaridade do padrão de
6 desenvolvimento morfológico dos corpos lúteos suplementares em éguas e
7 jumentas.

8 Em relação à concentração de progesterona produzida pelos CLS,
9 Ginther (1), Allen (7) e De Mestre et al. (10) avaliaram o perfil hormonal de
10 éguas no período em que os CLS encontravam-se presentes nos ovários,
11 observando valores máximos de 15 a 20 ng/mL, aproximadamente, similares
12 aos encontrados por Meira et al. (27) ao avaliar a concentração de P4 em
13 jumentas gestantes.

14 Outra informação a se considerar é o número de corpos lúteos
15 suplementares formados por animal ou ovário. É importante observar que esta
16 informação é escassa na literatura. Martin et al. (9) observaram a presença de
17 2 a 7 corpos lúteos suplementares por animal. Meira et al. (27) e Silva et al.
18 (28) encontraram valores semelhantes em jumentas (2 a 7) e éguas (2 a 6),
19 respectivamente, mostrando uma similaridade no número de CLS encontrado
20 pelos autores citados.

21

22 **Regressão dos cálices endometriais e corpos lúteos suplementares**

23 Logo após a descoberta da gonadotrofina coriônica equina em 1930,
24 Cole e colaboradores chamaram a atenção para a próxima relação existente
25 entre a secreção do ECG e o desenvolvimento de corpos lúteos suplementares

1 nos ovários da égua (29). Assim como há uma coincidência entre o
2 desenvolvimento e persistência dos cálices endometriais produtores de eCG e
3 os CLS, quando ocorre a regressão dos cálices, cessa o estímulo para a
4 formação dos CLS (10). No entanto, a regressão dos cálices endometriais não
5 coincide exatamente com a regressão dos CLS. A regressão dos corpos lúteos
6 suplementares ocorre mais tardiamente, sendo possível observar a presença
7 de CLS funcionais (com capacidade sintética de progesterona) até o dia 198 de
8 gestação. Porém, na grande maioria dos casos, a redução da produção de
9 progesterona é verificada a partir dos 160 dias de gestação, sugerindo que a
10 partir deste momento ocorreu o processo de regressão (9).

11 A regressão dos cálices, responsável por cessar o estímulo à formação
12 dos CLS, está ligado à resposta imune celular. O aparecimento de linfócitos no
13 estroma do endométrio ocorre poucas horas após a invasão inicial das células
14 da cinta coriônica e aumentam em número drasticamente a partir do dia 60-70
15 de gestação. Nesta fase também há o aparecimento de células mononucleares,
16 como as células do plasma, macrófagos e eosinófilos (21,22). Inicialmente, o
17 acúmulo de leucócitos apenas reveste as células fetais estranhas ao organismo
18 materno, porém, acima do 70^o dia de gestação, quando as células da região
19 central dos cálices endometriais começam a degenerar, os leucócitos invadem
20 ativamente o tecido e atacam os cálices endometriais, culminando na morte e
21 descamação de todo o cálice em processo de necrose aproximadamente nos
22 dias 100-120 de gestação (22).

23 Antczac & Allen (30) acreditavam que a morte dos cálices endometriais
24 nos dias 100-120 de gestação era resultado da reação leucocitária que se
25 formava no tecido materno em resposta à presença dos cálices fetais.

1 Entretanto, estudos recentes sugerem que os mecanismos envolvidos são mais
2 complexos. Primeiro, os cálices endometriais não expressam moléculas do
3 MHC I (24) e também não expressam o MHC da classe II (31), responsável por
4 montar resposta citotóxica. A ausência destas moléculas que apresentariam o
5 antígeno paterno ao sistema imune evita que os cálices sejam destruídos pelos
6 linfócitos citotóxicos (10). Segundo, a infiltração de células CD4+ presente ao
7 redor dos cálices não inclui apenas linfócitos T auxiliares tradicionais e sim
8 linfócitos T que possuem capacidade de regular e suprimir a resposta imune
9 (32). Terceiro, as células fetais dos cálices endometriais possuem atividade
10 inerente de modular a imunidade; produtos secretórios das células da cinta
11 coriônica suprimem a proliferação de linfócitos e a expressão de citocinas (33).

12 Além disso, ao serem transplantadas para locais fora do útero em éguas
13 não-prenhes (34, 35), as células da cinta coriônica apresentam características
14 similares às dos cálices, incluindo secreção de eCG e a habilidade de resistir à
15 resposta imune celular e humoral montadas pela receptora (10). Estas
16 habilidades apresentadas sugerem que as células binucleadas (cinta coriônica
17 e cálices endometriais) possuem autocontrole, controlando seu próprio destino
18 (10) e é possível que a reação leucocitária formada é simplesmente em
19 resposta à presença dos cálices endometriais em degeneração no final de seu
20 tempo normal de vida (36).

21

22 **Corpos lúteos suplementares e tratamento hormonal em éguas** 23 **receptoras acíclicas**

24 Atualmente, nos programas de transferência de embriões, faz-se uso da
25 administração de progestágenos exógenos (progesterona natural ou sintética)

1 em receptoras de embriões acíclicas, com objetivos de estabelecer e manter a
2 gestação. Os protocolos hormonais utilizados preparam a receptora para
3 receber o embrião, mimetizando as condições fisiológicas que ocorrem nas
4 éguas cíclicas (37). Além disso, acredita-se que a aplicação dos progestágenos
5 é necessária até o momento em que a unidade feto-placentária está
6 suficientemente madura para manter a gestação, com a produção de seus
7 próprios progestágenos (11).

8 Em contrapartida, pesquisas recentes correlacionam a interrupção do
9 tratamento com a formação dos corpos lúteos suplementares. Greco et al. (38)
10 sugerem que a interrupção do tratamento pode ser realizada antes da
11 maturação feto-placentária, a partir dos 40 dias de gestação, quando os CLS
12 surgem nos ovários.

13 Já Silva et al. (39) sugerem que o número de CLS formados e o tempo
14 decorrido desde a primeira formação até o dia da interrupção do tratamento
15 são variáveis importantes envolvidas na manutenção da gestação. Segundo
16 estes autores, análises da concentração da progesterona plasmática,
17 sintetizada pelos CLS, são necessárias para definir o momento de interrupção
18 do tratamento. Em um futuro próximo, é possível que o tratamento hormonal
19 administrado nas receptoras acíclicas seja reduzido, beneficiando proprietários
20 e veterinários.

21

22 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

23 A produção extra de progesterona secretada pelos corpos lúteos
24 suplementares auxilia na manutenção da gestação até aproximadamente os
25 100 dias, quando então a unidade feto-placentária está suficientemente madura

1 para assumir a produção de progesterona sem a contribuição dos ovários. No
2 entanto, como demonstrado por Allen e colaboradores em 1987, foi verificado a
3 sobrevivência de 30% das gestações extraespecíficas de jumentos em éguas
4 sem a presença de qualquer corpo lúteo suplementar pela falha no
5 desenvolvimento dos cálices endometriais. Este fato leva a crença de que a
6 progesterona secretada pelos corpos lúteos suplementares pode não ser
7 essencial para a manutenção da gestação.

8 Estudos envolvendo os corpos lúteos suplementares permitem o
9 esclarecimento da real contribuição destes à manutenção da gestação e
10 possibilita a redução do tempo de tratamento de protocolos hormonais
11 utilizados em receptoras acíclicas, amplamente utilizados em programas de
12 transferência de embriões.

13

14 **REFERÊNCIAS**

- 15 **1.** Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.
16 Second Edition. Cross Plains WI:Equiservices; 1992.
- 17 **2.** Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. Proceedings of the
18 Annual Convention of the AAEP, 2000; 46:338-54.
- 19 **3.** Allen WR, Moor RM. The origin of the equine endometrial cups. Production of
20 PMSG by fetal trophoblast cells. J. Reprod. Fertil., 1972; 29:313-16.
- 21 **4.** Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Scumacher J, Love CC, Hinrichs K, et
22 al. Manual of Equine Reproduction, Terceira Edição, Mosby Elsevier; 2011.
- 23 **5.** Allen WR. Luteal Deficiency and Embryo Mortality in the Mare. Reprod.
24 Domest. Anim., 2001; 36:121-31.
- 25 **6.** Hafez ESE, Hafez, B. Reprodução Animal. Sétima Edição, Manole; 2004.

- 1 **7.** [Allen WR](#). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy.
2 *Reprod.*, 2001; 12: 513-27.
- 3 **8.** Squires EL, Douglas RH, Steffenhagen WP, Ginther OJ. Ovarian changes
4 during the estrous cycle and pregnancy in mares. *J. Anim. Sci.*, 1974; 38:330-8.
- 5 **9.** Martin JL, Saltiel A, Evans JW. Progesterone synthesis by different types of
6 corpora lutea during the first 198 days of pregnancy. *Eq. Vet. Sci.*, 1989; 9:84-7.
- 7 **10.** De Mestre AM, Antczak DF, Allen WR. Equine Chorionic Gonadotropin
8 (eCG). In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine*
9 *Reproduction*. Segunda Edição, Blackwell Publishing; 2011. p.1648-63.
- 10 **11.** Holtan DW, Squires EL, Lapin DR, Ginther OJ. Effect of ovariectomy on
11 pregnancy in mares. *J. Reprod. Fertil.*, 1979; Suppl. 127:457-63.
- 12 **12.** Thorburn GD. A speculative view of parturition in the mare. *Eq. Vet. J.* 1993;
13 Suppl. 14:41-9.
- 14 **13.** Allen, WR, Short RV. Interspecific and Extraspecific Pregnancies in Equids:
15 Anything goes. *J. Hered.*, 1995; 88:384-92.
- 16 **14.** Allen WR, Wilsher S. A review of implantation and early placentation in the
17 mare. *Placenta*, 2009; 30:1005-15.
- 18 **15.** Allen WR, STEWART F. Equine Chorionic Gonadotropin. In: McKinnon AO,
19 Voss JL. *Equine Reproduction*. Lea & Febinger, Malvern Pennsylvania, 1993.
20 p. 397 – 403.
- 21 **16.** Cole HH, Hart GH. The potency of blood serum of mares in progressive
22 stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am. J.*
23 *Physiol.*, 1930; 83:57-68.

- 1 **17.** Stewart F, Allen WR, Moor RM. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio
2 of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by
3 radioreceptor assay. *J. Endocrinol.*, 1976; 71: 371-82.
- 4 **18.** Stewart F, Allen WR. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal
5 tissues. *J. Reprod. Fertil.*, 1979; Suppl. 27:431-40.
- 6 **19.** Antczak DF, Bright SM, Remick LH, Bauman B. Lymphocyte alloantigens of
7 the horse. I Serologic and genetic studies. *Tissue Antigens*, 1982; 20:172-187.
- 8 **20.** Kydd J, Miller J, Antczak DF, Allen WR. Maternal anti-fetal cytotoxic
9 antibody responses of equids during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 1982; Suppl.
10 32:361-369.
- 11 **21.** Amoroso EC. The endocrinology of pregnancy. *Br. Med. Bull.*, 1955; 17:
12 117-25.
- 13 **22.** Allen WR. The Influence of fetal genotype upon endometrial cup
14 development and PMSG and progesterone production in equids. *J. Reprod.*
15 *Fertil.*, 1975; Suppl. 23:405-413.
- 16 **23.** Lannier LL, Phillips JH. Natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 1992;
17 4:38-42.
- 18 **24.** Donaldson WL, Oriol JG, Plavin A, Antczak DF. Developmental regulation of
19 class I major histocompatibility complex antigen expression by equine
20 trophoblastic cells. *Differentiation*, 1992; 52:69-78.
- 21 **25.** Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann, TR. Bidirectional cytokine
22 interactions in the maternal-fetal relationship is successful pregnancy a TH2
23 phenomenon? *Immunol. Today*, 1993; 14:353-56.

- 1 **26.** Allen WR, Kydd JH, Boyle MS, Antczak DF. Extraspecific donkey-in-horse
2 pregnancy as a model of early fetal death. *J. Reprod. Fertil.*, 1987; Suppl.
3 35:197-209.
- 4 **27.** Meira C, Ferreira JCP, Papa FO, Henry M. Ovarian activity and plasma
5 concentrations of progesterone and estradiol during pregnancy in jennies.
6 *Theriogenology.*, 1998; 49:1465-73.
- 7 **28.** Silva ESM, Frade SF, Meira C. Characterization of secondary corpora lutea
8 formation in non-cyclic and cyclic embryo recipient mares (partial results). In:
9 XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; 2011,
10 Cumbuco, CE. *Acta Scientiae Veterinariae*; 2011; 39 (Suppl.1). p 415.
- 11 **29.** Cole HH, Howell CF, Hart GH. The changes occurring in the ovary of the
12 mare during pregnancy. *Anat. Rec.*, 1931; 49:199-209.
- 13 **30.** Antczak DF, Allen WR. Maternal immunological recognition of pregnancy in
14 equids. *J. Reprod. Fertil.*, 1989; Suppl. 37:69-78.
- 15 **31.** Donaldson WL, Zhang CH, Oriol JG, Antczak DF. Invasive equine
16 trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex
17 antigens. *Development*, 1990; 110:63-71.
- 18 **32.** De Mestre AM, Noronha L, Wagner B, Antczak, DF. Split immunological
19 tolerance to trophoblast. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010; 54:445-55.
- 20 **33.** Flaminio MJ, Antczak DF. Inhibition of lymphocyte proliferation and
21 activation: a mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the
22 maternal immune response. *Placenta*, 2005; 26:148-59.
- 23 **34.** De Mestre AM, Bacon SJ, Costa CC, Leadbeater JC, Noronha LE, Stewart
24 F, et al. Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle
25 vesicles. *Placenta*, 2008; 29:158-69.

- 1 **35.** Adams AP, Antczak DF. Ectopic transplantation of equine invasive
2 trophoblast. *Biol. Reprod.*, 2001; 64:753-63.
- 3 **36.** Lunn P, Vagnoni KE, Ginther OJ. The equine immune response to
4 endometrial cups. *J. Reprod. Immunol.*, 1997; 34: 203-16.
- 5 **37.** Pinto CRF. Progestagens and Progesterone. In: Mc Kinnon AO; Squires EL,
6 Vaala WE, Varner DD. *Equine Reproduction*. 2^o ed. Blackwell Publishing; 2011.
7 p. 1811-17.
- 8 **38.** Greco GM, Avanzi BR, Fioratti EG, Queiroz FJR, Meira, C, Alvarenga MA.
9 Efeito da interrupção do tratamento com progesterona em éguas receptoras
10 acíclicas apresentando a formação de corpos lúteos acessórios. *Acta Scientiae*
11 *Veterinariae*, 2008: 36 (Supl.2). p.590.
- 12 **39.** Silva ESM, Frade S, Ferreira JC, Puoli filho JNP, Meira C. Effect of
13 interrupting altrenogest treatment in non-cyclic recipient mares on pregnancy
14 maintenance: partial results. *Resúmenes del II Congreso Argentino de*
15 *Reproducción Equina*, Universidad Nacional de Rio Cuarto, 2011. p. 551-553.
- 16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

ANEXOS

Tabela 7: Número e período de formação dos corpos lúteos suplementares (CLS) por égua do grupo 70ALT até os 130 dias de gestação.

Égua	Formação dos CLS (Dias de gestação)	Número de CLS formados	Total CLS
A	36-40	1	2
	41-45	1	
B	36-40	1	6
	46-50	3	
	61-65	2	
C	61-65	1*	1
D	71-85	1	4
	86-100	1	
	101-115	1	
	116-130	1	
E	86-100	1	3
	101-115	1	
	116-130	1	
F	56-60	1	5
	61-65	1	
	86-100	2	
	101-115	1	

* Égua C apresentou a formação de um CLS até os 70 dias de gestação.

Tabela 8: Número e período de formação dos corpos lúteos suplementares (CLS) por égua do grupo 120ALT até os 130 dias de gestação.

Égua	Formação dos CLS (Dias de gestação)	Número de CLS formados	Total CLS
H	56-60	1	5
	71-85	3	
	86-100	1	
I	61-65	1	3
	86-100	1	
	101-115	1	
J	46-50	1	3
	71-85	1	
	116-130	1	
K	66-70	1	1
M	61-65	1	3
	71-85	1	
	101-115	1	

Tabela 9: Número e período de formação dos corpos lúteos suplementares (CLS) por égua do grupo Controle até os 130 dias de gestação.

Égua	Formação dos CLS (Dias de gestação)	Número de CLS formados	Total CLS
P	41-45	1	4
	51-55	1	
	66-70	1	
	71-85	1	
Q	36-40	1	2
	86-100	1	
R	36-40	1	3
	86-100	2	
S	36-40	1	6
	51-55	1	
	56-60	1	
	66-70	1	
	71-85	1	
T	86-100	1	2
	36-40	1	
	41-45	1	
U	61-65	1	9
	86-100	6	
	36-40	1	
V	41-45	1	9
	61-65	1	
	66-70	4	
	71-85	2	
	86-100	1	

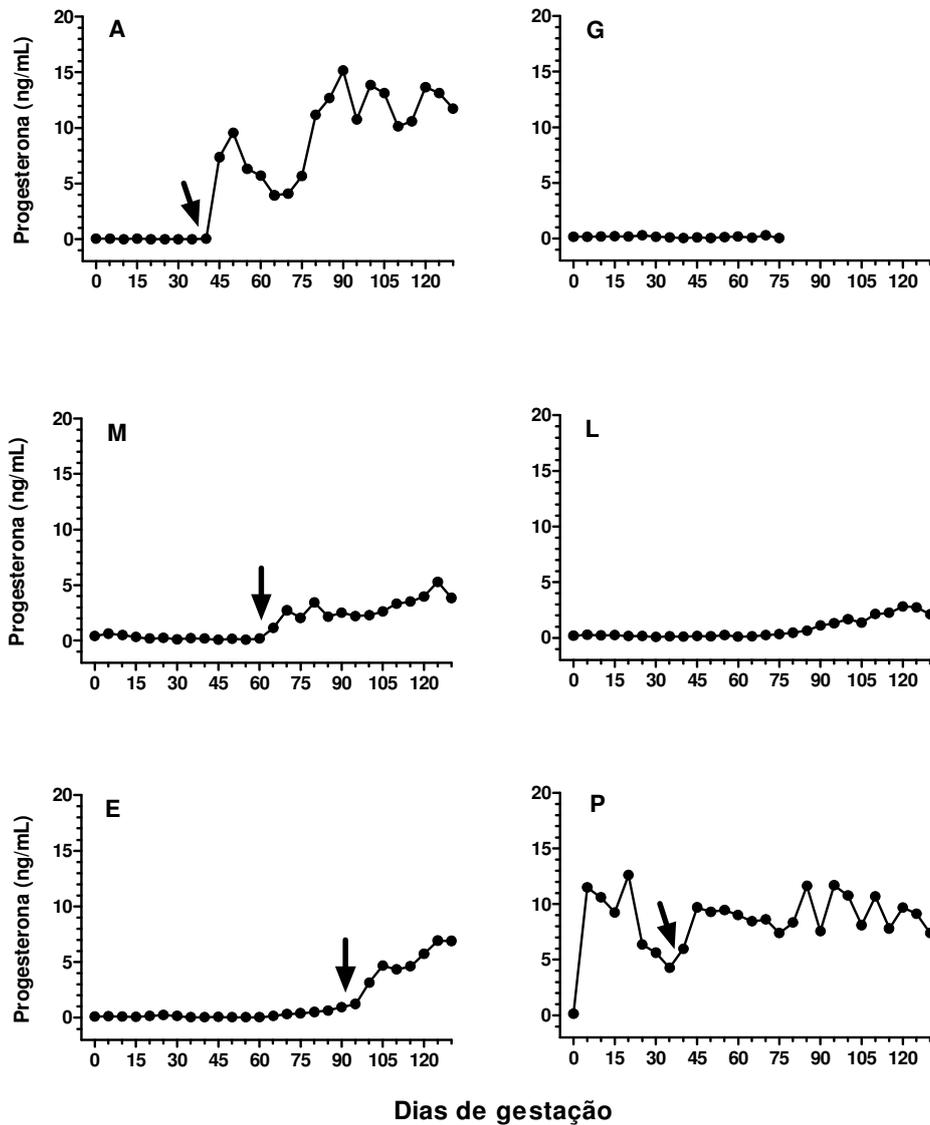


Figura 8: Perfil individual da concentração de progesterona de algumas éguas dos grupos 70ALT, 120ALT e Controle: (A) égua que apresentou a primeira formação dos CLS, por ovulação, aos 38 dias em média; éguas que apresentaram a primeira formação por luteinização, em média, aos 63 dias (M) e 93 dias (E); éguas que não apresentaram a formação de CLS até os 70 dias (G) e até os 130 dias (L); (P) égua com corpo lúteo primário e formação de CLS do grupo Controle. As setas representam a detecção do primeiro CLS. Na égua G foi observado abortamento aos 75 dias de gestação e a colheita de sangue e dosagem de P4 não foram realizadas nas avaliações seguintes.



Botucatu, 15 de Dezembro de 2011.

Ilmo(a). Sr(a).

Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Prezado(a) Senhor(a).

Acusamos o recebimento do trabalho intitulado "**Aspectos relacionados à formação, função e regressão dos corpos lúteos suplementares em éguas**". O referido artigo foi registrado sob nº 574/11 e foi encaminhado para apreciação dos assessores.

Renovando protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,


Prof. Titular Helio Langoni
Editor-Chefe

