KLEBER MENEGON LEMES

**Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo
sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de
progesterona em éguas no período pós-parto**

Pirassununga

2013

KLEBER MENEGON LEMES

Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Pirassununga

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2880
FMVZ

Lemes, Kleber Menegon

Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto / Kleber Menegon Lemes. -- 2013.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Égua. 2. Pós-parto. 3. Vascularização. 4. Doppler. 5. Dinâmica Folicular. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto", protocolado sob o nº 2375/2011, utilizando 10 (dez) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Assessment of ovarian dynamics, uterine characteristics, uterine and ovarian blood flow and serum progesterone concentrations of plasma in the postpartum period in mares", protocol number 2375/2011, utilizing 10 (ten) horses, under the responsibility Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 10 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LEMES, Kleber Menegon

Título: Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Gilberto e Leonice, que apesar da distância e de todas as dificuldades, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e auxiliando na medida do possível. Apesar da longa jornada e todos esses anos afastados pela distância, não houve nenhum dia sequer em que vocês não estivessem em minhas orações e pensamentos. Esta vitória, acima de tudo, também é de vocês!

Às minhas irmãs, Kelly e Karoline, que da mesma forma, sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Além disso, com a graça de DEUS, me presentearam com duas sobrinhas lindas! Amo todas vocês!

À minha namorada Vanessa, pelo companheirismo, atenção, carinho e amor prestados a cada dia. Muito Obrigado também pela paciência e pelo suporte em todos os momentos difíceis passados lado a lado, além de toda a ajuda em tudo que precisei. Agradeço a DEUS todos os dias por ter me dado um presente tão especial... Simplesmente, AMO VOCÊ!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, por ter me aceitado como orientado e acreditado em meu potencial. Muito Obrigado pelos ensinamentos diários e por ser um exemplo profissional. Sua ética e postura profissional com certeza estarão comigo onde quer que eu esteja, pois certamente serão o diferencial em tudo que eu fizer durante minha carreira profissional. Muito Obrigado pelo exemplo prestado como educador e pela disposição em defender nossa profissão de forma tão leal e intensa, como o Senhor faz diariamente. São exemplos como este que precisam estar presentes na formação de todos os profissionais de Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, o grande Mestre dos Céus, por sempre ter guiado meus passos... Apesar de todos os momentos de provas e dificuldades, sempre me deu forças para suportar e nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus tios Laércio e Suely e minha Avó Ana, que desde o final do ensino médio e durante toda a graduação acreditaram em mim e não mediram esforços para ajudar no que fosse preciso... Com certeza, se não fosse vocês, hoje eu não teria chegado até aqui! Serei eternamente grato por tudo que fizeram por mim, assim como peço a DEUS, todos os dias, que lhes abençoe infinitamente!

Ao Sr. Ricardo A. Alonso, que disponibilizou os animais e o local para a realização do experimento, além de nunca medir esforços para apoiar e incentivar as atividades de pesquisa. Muito Obrigado pela gentileza e amizade. O Senhor é um grande exemplo para todos!

À Dra. Maria Augusta Alonso (Guta), pelo exemplo profissional e por toda a ajuda prestada durante a minha estadia na Fazenda Santa Rita, assim como durante todo o período na Pós-Graduação. Além dos incontáveis ensinamentos profissionais, agradeço também pela imensa amizade e por estar sempre à disposição para o que for necessário, inclusive o auxílio na correção da dissertação. Muito Obrigado por tudo!

Da mesma forma, agradeço à Dra. Juliana Nascimento Bittar, pois desde minha chegada em Pirassununga sempre esteve disposta a ensinar e ajudar no que fosse preciso. Agradeço também pela disposição em ajudar a corrigir a dissertação. Muito Obrigado por tudo Ju!

Ao Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade, por todos os ensinamentos durante meu estágio curricular e início da Pós-Graduação, assim como por todos os momentos de descontração durante a rotina de atividades...

Ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, por toda a ajuda durante o planejamento do experimento, assim como por todo o trabalho e análise dos dados obtidos. Muito Obrigado pela paciência, atenção e disposição de sempre e por todos os ensinamentos durante estes últimos meses! Para mim, é uma honra poder ter convivido e aprendido tanto com o Senhor. Meus sinceros agradecimentos!

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, que apesar da árdua missão de transmitir conhecimentos de estatística, nunca mediu esforços para que os alunos pudessem entender e desfrutar desta ferramenta tão preciosa em nossas vidas!

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal, sediados em Pirassununga: Prof. Dr. Mario Binelli, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi e Prof. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini. Muito obrigado pelo exemplo profissional e pela ajuda prestada sempre que precisei! Acima de tudo, muito obrigado também pela convivência e amizade durante todo o período que estive no VRA!

Aos meus grandes amigos, que me receberam de braços abertos quando cheguei em Pirassununga: Gustavo (Dunha), Fábio (Cirrose) e Heiti (Rufião), assim como ao Danilo (Ku Seco), principal agregado da casa. Muito Obrigado pela amizade prestada e pelo companheirismo de sempre. Com certeza, você são amigos que levarei para toda a vida...

Aos amigos da Casa do Departamento de Reprodução Animal e companheiros de quarto: Henrique (Índio), por ser um companheiro desde que cheguei em Pirassununga, pois sempre estivemos juntos em todas as atividades desenvolvidas no VRA... Você é e sempre será um grande amigo; Milton (Mirtão), um exemplo de simplicidade e humildade, além do exemplo de inteligência e trabalho... Sua dedicação e disposição me impressionam até hoje; Thiago (Arroz), pelo companheirismo e amizade prestados, sempre com sua irreverência e prestatividade sempre que solicitado... Agradeço também aos demais moradores da casa do VRA, com quem tive o prazer de conviver e hoje compartilhar de vossa amizade: Zé Rodrigo, Moana, Dani (Tônia), Milena, Roney, Ticiano, Shirley... Muito Obrigado por tudo!

Aos demais companheiros e amigos da Pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal, com quem tive o prazer de conviver: Andrés Mejia, Aline Kehrle, Patrícia Míguez, Simone Martins, Fernando Mesquita, Guilherme Pugliese, Saara Scolari, Estela Araújo, Leonardo Batissaco, Fábio Pinaffi, Maíra Bianchi, Gisele Mouro, João Diego Agostini, Daniel Angrimani, Fernanda Affonso, Roberta Harue, Bruna Oliveira, Carolina Serrano, Everton Lopes, Renata Lançoni, Mariana Sponchiado, Angela Gonella.

Aos estagiários que passaram pelo VRA e/ou auxiliaram durante o experimento na Fazenda Santa Rita: Marcos Felipe (Colômbia), Camilo Ernesto (Colômbia), Lady Johanna (Colômbia), Jeicson Jaimes (Colômbia), Carol (Mineira), Nara França (Portugal), Joanna Franco (Portugal), Rui Martins, Gonçalo Neves, Mariana Grancho, Roberto Sousa, Miguel Lousas, Fidel Grabert, Tiago Salício, Gabriela Ferreira, Gabriel De Carli, Danilo França

(Baiano), Thiago Resende (Mineiro), Paloma Balboa (Anã), Juliana Schleich, Naiara Dadalt, Natália Bernstein... A ajuda de vocês foi importantíssima, mas acima de tudo, a amizade conquistada sempre será o bem maior de todos nós!

Ao secretário do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Clayton Costa. Muito Obrigado pela eficiência e disposição em tudo que foi solicitado. Muito Obrigado também pela paciência e amizade de sempre!

Aos funcionários do VRA: Zé Maria, João Carlos, Márcio, Elaine, Tati, Alexandra, Sandra... Muito Obrigado pela amizade e pela ajuda sempre que solicitados e pelos momentos de descontração durante todo este período!

Aos funcionários da Fazenda Santa Rita, por toda a ajuda e amizade durante o tempo que permaneci na fazenda. Em especial, meus agradecimentos ao Zé, pelo exemplo de amor e cuidado com os animais, além de todo o apoio prestado. Muito Obrigado!

À Sra. Harumi Shiraishi, pela atenção e ajuda na resolução de todos os problemas!

À Bibliotecária Neusa Kazue Habe, pela disposição e auxílio na normalização da dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa durante o Mestrado, assim como à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo recurso concedido para a aquisição dos materiais para a realização dos experimentos.

Aos cavalos, sem os quais nada disso teria se tornado realidade... A cada dia que passei junto a estes animais maravilhosos um novo aprendizado era adquirido, assim como a paixão por eles tomava proporções inestimáveis. Muito Obrigado pela confiança e carinho durante todo este tempo! Vocês são motivo do meu imenso amor e respeito!

De coração, meus sinceros agradecimentos a todos que participaram, direta ou indiretamente, desta vitória. Muito Obrigado por tudo!

“Então, sabe que assim é a sabedoria para a tua alma; se a achares, haverá bom futuro, e não será frustrada a tua esperança.”

Provérbios, 24:14.

RESUMO

LEMES, K. M. **Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto.** [Assessment of ovarian dynamics, uterine characteristics, uterine and ovarian blood flow and serum progesterone concentrations in the postpartum period in mares]. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as características de dinâmica ovariana, aspectos do processo de involução uterina e características da hemodinâmica uterina e ovariana em éguas durante o período pós-parto ($n = 10$). Para isso, o conteúdo apresentado nesta dissertação está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, os aspectos do processo de involução uterina e características de vascularização endometrial e mesometrial foram avaliados. Uma drástica redução ($P < 0,05$) no diâmetro uterino foi observada durante os primeiros 7 dias pós-parto, com subsequente diminuição nas taxas de involução uterina, sendo que este processo se completou em torno de 21 dias para o corno anteriormente não gravídico (CNG) e 24 dias para o corno anteriormente gravídico (CG). Em relação às quantidades de fluido intrauterino, foi observado aumento nas quantidades entre os dias 1 e 2 pós-parto (d1 e d2), com significativa redução entre o d4 e d7, sendo que nenhuma quantidade de fluido foi observada em nenhum animal após o d16, ou após o terceiro dia pós-ovulação (D3). Nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada entre os cornos uterinos (CG e CNG) em relação às características de vascularização. Neste contexto, foi observado aumento ($P < 0,05$) nos escores de vascularização endometrial entre d1 e d4, permanecendo semelhante até o d13, assim como aumento ($P < 0,05$) de vascularização mesometrial entre o d1 e d2. No entanto, houve redução ($P < 0,05$) nos escores de vascularização mesometrial do d2 ao d10. Após a ovulação, foi observado aumento de vascularização endometrial do D0 ao D5, com redução dos escores do D5 ao D11 e um novo aumento entre o D11 e o D14. De forma semelhante, o padrão de vascularização mesometrial foi similar ao observado no endométrio. No segundo capítulo, foram avaliados os aspectos de desenvolvimento e vascularização folicular durante o primeiro estro pós-parto, assim como as características de desenvolvimento e vascularização do corpo lúteo (CL) e níveis séricos de progesterona (P4) durante os 16 dias após a primeira ovulação pós-parto. Adicionalmente, os animais foram divididos em dois grupos, sendo o grupo precoce (ovulação antes do d10) ou tardia (ovulação após o d10). Em relação ao desenvolvimento folicular, nenhuma diferença foi observada entre os grupos nos dias relativos à primeira ovulação pós-parto, no entanto, quando

avaliados os dias relativos ao parto, diferenças foram observadas entre os grupos. Neste contexto, o grupo precoce apresentou maior diâmetro ($P < 0,05$) do folículo dominante (F1) em todos os dias no período pós-parto inicial (d1-d7), assim como apresentou um maior número de folículos ($P < 0,05$) na classe > 25 mm durante os primeiros dias pós-parto (d1-d3). Adicionalmente, os animais do grupo tardia apresentaram maior número de folículos ($P < 0,05$) na classe de 20-25 mm durante período pós-parto inicial (d4-d7). Em relação às características de vascularização, nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada entre os grupos quanto a vascularização do F1, pedículo ovariano ipsilateral ao F1, área e vascularização do CL ou níveis séricos de P4. Portanto, no período pós-parto inicial, padrões distintos nas características de vascularização uterina foram observados, porém, após a primeira ovulação pós-parto, os padrões observados assemelham-se aos de éguas não prenhes, possivelmente refletindo um retorno às características uterinas pré-gestacionais. Em relação às características de desenvolvimento folicular, não foram observadas diferenças entre os grupos em relação aos dias precedendo a primeira ovulação pós-parto, assim como as características de dinâmica folicular se assemelham aos resultados obtidos em ciclos de éguas não gestantes. No entanto, quando avaliadas as características em relação ao pós-parto imediato, diferenças no perfil de desenvolvimento folicular foram observadas entre os grupos, devido ao maior desenvolvimento folicular no grupo precoce durante a primeira semana pós-parto. Portanto, apesar do número reduzido de animais, os resultados observados sugerem que eventos cruciais ocorrem antes do parto, levando ao maior desenvolvimento folicular em alguns animais, principalmente os que apresentam rápido desenvolvimento folicular e ovulação pós-parto.

Palavras-chave: Égua. Pós-Parto. Vascularização. Doppler. Dinâmica Folicular.

ABSTRACT

LEMES, K. M. **Assessment of ovarian dynamics, uterine characteristics, uterine and ovarian blood flow and serum progesterone concentrations in the postpartum period in mares.** [Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto]. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The aim of this study was to evaluate the characteristics of ovarian dynamics, aspects of the uterine involution process and characteristics of uterine and ovarian hemodynamic during the postpartum period in mares ($n = 10$). Thus, the content presented in this thesis is divided into two chapters. In the first chapter, the aspects of the uterine involution process and characteristics of endometrial and mesometrial vascularization were evaluated. A rapid reduction ($P < 0,05$) in uterine diameter was observed during the first 7 days postpartum, with subsequent decrease in the rate of uterine involution, and this process was completed in about 21 days for formerly nongravid horn (CNG) and 24 days for the formerly gravid horn (CG). For intrauterine fluid accumulations, an increase ($P < 0,05$) was observed between days 1 and 2 postpartum (d1 and d2), with a significant reduction between d4 and d7, and no amount of fluid collections was observed in the animals after d16 or after the third day post-ovulation (D3). No differences ($P > 0,05$) was observed between the uterine horns (CG and CNG) in relation to vascular perfusion characteristics. In this context, an increase ($P < 0,05$) in the endometrial vascularity scores was observed between d1 and d4, remaining similar until d13, as well as an increase ($P < 0,05$) in mesometrial vascularization occurred between d1 and d2. However, a reduction ($P < 0,05$) in scores of mesometrial vasculature was observed from d2 to d10. After ovulation, an increase of endometrial vascularization was observed from D0 to D5, with reduction in scores from D5 to D11 and a further increase between D11 and D14. Similarly, the pattern of mesometrial vascularization was similar to that observed in the endometrium. In the second chapter, follicular development and vascularization were assessed during the first postpartum estrus, as well the characteristics of development and vascular perfusion of the corpus luteum (CL) and serum progesterone (P4) during the 16 days after the first postpartum ovulation. Additionally, the animals were divided into two groups: the group early (ovulation before the d10) or late (ovulation after d10). With regard to follicular development, no difference was observed between groups in days relative to the first postpartum ovulation, however, when evaluated on the day of parturition, differences were observed between groups. In this respect,

the early group had a larger diameter ($P<0,05$) of the dominant follicle (F1) each day in the early postpartum period (d1-d7) and had a greater number of follicles ($P<0,05$) in the > 25 mm class during the first days postpartum (d1-d3). Additionally, the animals in the late group showed a greater number of follicles ($P<0,05$) in the 20-25 mm class during early postpartum period (d4-d7). Regarding the characteristics of vascular perfusion, no difference ($P>0,05$) was observed between groups regarding the vascularization of F1, ipsilateral ovarian pedicle blood flow, area and vascularization of the CL or serum P4. Therefore, in the initial postpartum period, distinct patterns in the characteristics of uterine vascularization was observed, however, after the first ovulation postpartum, the observed patterns resemble those observed in non-pregnant mares, possibly reflecting a return to nonpregnant uterine characteristics. Regarding the characteristics of follicular development, no differences were observed between groups in relation to the days prior to the first postpartum ovulation, as well the characteristics of follicular dynamics are similar to the results obtained in cycles of non-pregnant mares. However, when the characteristics were evaluated concerning the immediate postpartum period, differences in the profile of follicular development were observed between groups, due to increased follicular development in the early group during the first week postpartum. Therefore, although a small number of animals, the results suggest that critical events occur before foaling, leading to increased follicle development in some animals, particularly those with rapid follicular development and postpartum ovulation.

Keywords: Mare. Postpartum. Blood Flow. Doppler. Follicular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) para o diâmetro uterino (CG e CNG), quantidades de fluido intrauterino, escores de morfoecogenicidade (ecotextura) e tônus (uterino e cervical) durante o período pós-parto em éguas (n = 10).....	56
Figura 2 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) dos escores de vascularização endometrial e mesometrial do corno anteriormente gravídico (CG) e anteriormente não gravídico (CNG), avaliados em modo Doppler-colorido durante o período pós-parto em éguas (n = 10).....	59
Figura 3 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) dos diâmetros dos seis maiores folículos, determinados diariamente através de identidade folicular, durante os 7 primeiros dias pós-parto ou durante os 7 dias precedendo a primeira ovulação pós-parto, caracterizando o perfil de desenvolvimento folicular para as éguas do grupo precoce e tardia.....	72
Figura 4 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) dos diâmetros para os dois maiores folículos (F1 e F2), avaliados durante os primeiros dias pós-parto ou em relação aos 7 dias antecedendo a primeira ovulação pós-parto.....	74
Figura 5 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) do número de folículos agrupados por classes, referentes às comparações realizadas entre os grupos durante o primeiro período avaliado (d1 ao d7).....	74
Figura 6 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) para as características de diâmetro e vascularização do folículo pré-ovulatório (F1) e vascularização do pedículo ovariano ipsilateral, relativos às comparações entre os dois grupos durante os 7 dias antecedendo a primeira ovulação pós-parto.....	77
Figura 7 -	Médias ($\pm$ E.P.M.) para as características de área e vascularização do corpo lúteo (CL) e concentrações séricas de progesterona (P4), durante os 16 dias após a primeira ovulação pós-parto.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias ($\pm$ E.P.M.) para o número de folículos agrupados por classes e características de desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, relativos às comparações entre os grupos (precoce e tardia).....	75
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	corno anteriormente gravídico
CL	corpo lúteo
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CNG	corno anteriormente não gravídico
D	dia relativo à ovulação
d	dia relativo ao parto
D	efeito de dia (estatística)
E ₂	estradiol
E.P.M.	erro padrão da média
EDV	velocidade diastólica final
F1	folículo dominante
F2	primeiro folículo subordinado
FSH	hormônio folículo estimulante
<i>g</i>	gravidade
G	efeito de grupo (estatística)
GD	efeito de interação grupo x dia (estatística)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
Hz	hertz
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBPs	proteínas ligantes ao fator de crescimento semelhante à insulina
IIO	intervalo interovulatório
kg	quilograma
LH	hormônio luteinizante
MHz	megahertz
miRNAs	microRNAs
mL	mililitro
mm	milímetro
n	número
ng	nanograma
PGF2 α	prostaglandina F2 alpha

PI	índice de pulsatilidade
PSI	Puro Sangue Inglês
PSV	velocidade do pico sistólico
RI	índice de resistividade
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
TAMV	média das velocidades máximas
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 NÍVEIS HORMONAIS.....	24
2.2 INVOLUÇÃO UTERINA.....	25
2.3 DINÂMICA FOLICULAR	27
2.3.1 Intervalo Interovulatório	28
2.3.2 Seleção Folicular.....	28
2.3.3 Ondas Foliculares.....	29
2.3.4 Emergência Folicular	30
2.3.5 Divergência ou Desvio Folicular	31
2.3.6 Dominância Folicular.....	32
2.3.7 Múltiplos Folículos Dominantes e Ovulações.....	33
2.3.8 Ovulações de Diestro	33
2.4 DINÂMICA FOLICULAR - ENDOCRINOLOGIA.....	34
2.4.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	34
2.4.2 Hormônio Luteinizante (LH)	35
2.4.3 Estradiol (E ₂)	36
2.4.4 Inibina	37
2.4.5 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF)	38
2.4.6 Outros Fatores	39
2.5 DINÂMICA FOLICULAR - PERÍODO PÓS-PARTO.....	40
2.6 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER.....	41
2.7 VASCULARIZAÇÃO UTERINA.....	43
2.7.1 Vascularização Uterina - Período Pós-Parto	45
2.8 VASCULARIZAÇÃO OVARIANA.....	47
2.8.1 Vascularização Ovariana - Período Pós-Parto	49
3 CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VASCULARIZAÇÃO UTERINA DURANTE O PERÍODO PÓS-PARTO EM ÉGUAS	51
3.1 INTRODUÇÃO	51
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.2.1 Animais.....	52
3.2.2 Ultrassonografia	53
3.2.3 Análise Estatística	54

3.3 RESULTADOS	55
3.3.1 Involução Uterina	55
3.3.2 Fluido Intrauterino e Morfoecogenicidade (Ecotextura)	57
3.3.3 Tônus Uterino e Cervical	57
3.3.4 Vascularização Uterina	58
3.4 DISCUSSÃO	59
3.4.1 Involução Uterina	59
3.4.2 Fluido Intrauterino	60
3.4.3 Morfoecogenicidade (Ecotextura)	61
3.4.4 Tônus Uterino e Cervical	62
3.4.5 Vascularização Uterina	63
3.5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
4 CAPÍTULO 2 - DINÂMICA E VASCULARIZAÇÃO OVARIANA DURANTE O PRIMEIRO CICLO ESTRAL PÓS-PARTO EM ÉGUAS	66
4.1 INTRODUÇÃO	66
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.2.1 Animais	67
4.2.2 Ultrassonografia	68
4.2.3 Análise Estatística	70
4.3 RESULTADOS	71
4.3.1 Dinâmica Folicular	71
4.3.2 Vascularização Folicular e Ovariana	76
4.3.3 Área e Vascularização do Corpo Lúteo (CL) e Produção de Progesterona (P4)	76
4.4 DISCUSSÃO	78
4.4.1 Dinâmica Folicular	79
4.4.2 Vascularização Folicular e Ovariana	82
4.4.3 Área e Vascularização do Corpo Lúteo (CL) e Produção de Progesterona (P4)	84
4.5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

O puerpério é caracterizado como o período compreendido entre o parto e o retorno às funções reprodutivas normais, favoráveis ao início e manutenção de uma nova gestação (GINTHER, 1992). Em relação aos grandes animais domésticos (p.ex., vaca, ovelha, cabra, porca), a égua é a única fêmea que possui um curto intervalo (cerca de 9 dias) entre o parto e a primeira ovulação (intervalo pós-parto), sendo capaz de conceber e manter uma gestação neste período (KIRACOFÉ, 1980; GINTHER, 1992). Além disso, para se alcançar o máximo retorno econômico em sistemas de criação, é desejável que o número de potros produzidos por égua seja maximizado. No entanto, considerando uma gestação com duração de 335-340 dias, para que se consiga a produção de um potro por ano, é necessário que a concepção ocorra em até 25-30 dias após o parto (BLANCHARD et al., 1989; CAMILLO et al., 1997). Sendo assim, os eventos reprodutivos no período pós-parto são cruciais para que o intervalo entre partos seja mantido em torno de 12 meses.

Durante o puerpério, o útero sofre involução e os ovários mudam de um estado relativamente quiescente para um estado ativo, sendo estes processos mediados por uma série de mudanças hormonais, que têm por objetivo normalizar as mudanças ocorridas no útero e induzir uma nova ovulação pós-parto. Portanto, o período pós-parto em éguas é caracterizado por um rápido processo de involução uterina, assim como por um período de estro (comumente chamado de cio do potro), culminando com o retorno a uma condição compatível com a fertilidade (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1975; GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979). Este primeiro estro inicia-se em 5 a 12 dias após o parto, com as ovulações ocorrendo em até 20 dias na maioria das éguas (LOY, 1980; GINTHER, 1992), nas quais a maior frequência de ovulações é observada entre 12 a 15 dias pós-parto (KATILA; KOSKINEN; OIJALA, 1988; BLANCHARD et al., 1991; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKİZ, 2008; KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), sendo tais resultados semelhantes aos observados em jumentas (DADARWAL et al., 2004; TOSI et al., 2013).

Embora este primeiro estro pós-parto seja reconhecido como fértil (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1975; GINTHER, 1992), há controvérsias em relação à fertilidade obtida neste período. Geralmente, menores taxas de prenhez (9 a 20%) são descritas em relação à fertilidade do primeiro estro pós-parto quando comparadas à fertilidade de ciclos estrais subsequentes (LOY, 1980; KOSKINEN; KATILA 1987; KATILA; KOSKINEN; OIJALA, 1988; GINTHER, 1992). No entanto, outros autores relatam taxas de prenhez similares entre os

diferentes ciclos pós-parto (CAMILLO et al., 1997; MALSCHITZKY et al., 2002), entre o primeiro estro pós-parto e ciclos de éguas não gestantes (GRIFFIN; GINTHER, 1991a; CAMILLO et al., 1997) ou até mesmo altas taxas de prenhez (> 80%) em éguas inseminadas no cio do potro (BRUEMMER; BRADY; BLANCHARD, 2002). Por outro lado, maior potencial para perdas gestacionais (MERKT; GÜNZEL, 1979; MEYERS; BONNETT; MCKEE, 1991; GINTHER, 1992; MORRIS; ALLEN, 2002) ou menores taxas de recuperação embrionária (HUHTINEN; REILAS; KATILA, 1996) tem sido atribuídas ao primeiro estro pós-parto quando comparado a ciclos de éguas não gestantes.

Recentemente, em um estudo realizado com grande número de ciclos pós-parto (3184 ciclos), os autores relataram alguns fatores que influenciam os resultados reprodutivos em éguas no período pós-parto, tais como: 1) idade, com redução da probabilidade de prenhez nas fêmeas com idade superior a 18 anos; 2) dia do puerpério, com redução da probabilidade para éguas acasaladas antes do dia 22 após o parto; 3) aumento da probabilidade para perdas gestacionais em éguas com idade superior a 18 anos; e 4) aumento da probabilidade para perdas gestacionais em éguas acasaladas antes de 13 dias pós-parto (BLANCHARD et al., 2012). De forma semelhante, em outro estudo recente utilizando jumentas no período pós-parto, os autores observaram redução nas taxas de prenhez em animais que apresentavam estro na primeira semana pós-parto quando comparados a animais que apresentam estro a partir da segunda semana, assim como uma redução nas taxas de prenhez foi atribuída à animais mais velhos (14 a 16 anos) em comparação aos mais jovens (< 6 anos) (TOSI et al., 2013).

Atualmente, poucas informações sobre os processos de desenvolvimento e seleção foliculares durante o primeiro estro pós-parto são encontradas (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), assim como limitadas informações sobre a relação entre as características do folículo pré-ovulatório e as taxas de prenhez têm sido relatadas em grandes animais (SILVA et al., 2006). Adicionalmente, grande similaridade entre éguas e mulheres têm sido descritas em relação ao intervalo interovulatório e características no desenvolvimento de ondas foliculares, tornando a dinâmica folicular em éguas um assunto de extrema importância, visto que a égua pode ser utilizada como um modelo experimental para o estudo da dinâmica folicular em seres humanos (GINTHER et al., 2004a,b). Neste contexto, como novo método não-invasivo, a ultrassonografia Doppler vem sendo utilizada para avaliar características de vascularização no trato reprodutivo de fêmeas equinas (STOLLA; BOLLWEIN, 1997; BOLLWEIN et al., 1998). Trata-se de uma tecnologia emergente que permite a avaliação das condições de fluxo sanguíneo diretamente no local de interesse, com grande potencial para

aumentar as capacidades diagnósticas e preditivas em diversas finalidades, inclusive as de pesquisa (GINTHER; UTT, 2004).

Assim, estudos indicam que uma maior proporção (51 a 62%) de éguas em programas reprodutivos são éguas no período pós-parto, mas apenas uma pequena parcela (< 20%) das pesquisas em reprodução equina utilizam éguas nesta fase (GINTHER, 1992), o que torna evidente a importância dos eventos reprodutivos no puerpério em programas de reprodução equina. Portanto, informações a respeito dos processos de involução uterina e dinâmica folicular são essenciais para que se possa produzir uma gestação viável no primeiro estro pós-parto (DADARWAL et al., 2004), visto que um atraso entre o parto e a concepção pode resultar em datas de parto tardias, ou eventualmente a perda de produção de um potro em anos subsequentes (BLANCHARD et al., 2012).

Diante do exposto, pode-se salientar que, nos últimos anos, poucas informações têm sido encontradas a respeito dos processos referentes à dinâmica folicular no período pós-parto, assim como os eventos vasculares relacionados aos processos de desenvolvimento folicular e involução uterina durante o puerpério na espécie equina têm sido pouco estudados. Portanto, este trabalho tem como objetivos avaliar as características uterinas durante o processo de involução (diâmetro uterino, acúmulo de fluido intrauterino, tônus e morfoecogenicidade) e aspectos da dinâmica ovariana, assim como, através da ultrassonografia Doppler, avaliar as características de vascularização uterina e ovariana durante o período pós-parto em éguas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NÍVEIS HORMONAIS

A partir de 48 horas antecedendo o momento do parto, uma queda nas concentrações séricas de estrógeno e progesterona já começa a ser observada (NODEN; OXENDER; HAFS, 1978). Após o parto, os níveis de progesterona têm sido descritos como indetectáveis no início do período pós-parto (HILLMAN; LOY, 1975; GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979), porém, em estudo mais recente, foram observados níveis de progesterona próximos de 3 ng/mL no primeiro dia pós-parto, com subsequente queda para níveis inferiores a 1 ng/mL em 4 dias, com decréscimo acentuado nas primeiras 48 horas após o parto (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008). Desta forma, no início do período pós-parto, as concentrações séricas de progesterona permanecem reduzidas até um novo aumento associado à primeira ovulação pós-parto e formação do corpo lúteo (LOVELL et al., 1975; GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979; HILLMAN; GANJAM, 1979; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008). Da mesma forma, os níveis de estradiol apresentam uma queda acentuada durante as primeiras 48 horas pós-parto, permanecendo baixos durante os primeiros dias (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1973; GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008). Adicionalmente, altos níveis de ocitocina e prostaglandina F2 α (PGF2 α) são observados durante os primeiros dias pós-parto (VANDEPLASSCHE et al., 1983; STEWART et al., 1984).

Baixos níveis séricos de LH são notados imediatamente após o parto, possivelmente devido à supressão causada por progestágenos oriundos da unidade fetoplacentária (GINTHER, 1992). Uma elevação nas concentrações de LH foi observada durante os primeiros dias, geralmente dentro das 72 horas após o parto (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1973, 1975; NODEN; OXENDER; HAFS, 1978). Um grande pico de FSH tem sido descrito no dia anterior ou no próprio dia do parto, com um rápido declínio nas concentrações ocorrendo nas primeiras 24 horas pós-parto (TURNER et al., 1979; GINTHER, 1992). Em outro estudo, um aumento significativo nas concentrações de FSH foi observado entre 2 dias antes e o dia do parto, mantendo níveis elevados até o 3º dia e uma subsequente redução entre os dias 3 e 7 pós-parto (GINTHER; BAUCUS; BERGFELT, 1994).

2.2 INVOLUÇÃO UTERINA

Em éguas, baixas concentrações de progesterona e estradiol são descritas nos primeiros dias pós-parto, sugerindo que o período entre o parto e o primeiro estro (cio do potro) é semelhante a um período de anestro, ou seja, neste período o útero estaria em um estado relativamente quiescente (GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979). Assim, estímulos para a involução uterina incluem ocitocina endógena e liberação de $\text{PGF2}\alpha$, contribuindo para a eliminação dos conteúdos intrauterinos durante o puerpério (VANDEPLASSCHE et al., 1983). Adicionalmente, o processo de involução uterina em éguas aparentemente é independente da função ovariana, visto que hormônios ovarianos têm pouca ou nenhuma influência sobre a involução, uma vez que o processo involutivo ocorreu de maneira similar entre éguas ovariectomizadas ou éguas intactas (LOY, 1980; SERTICH; HINRICHS; KENNEY, 1989; GRIFFIN; GINTHER, 1991a).

Os eventos relacionados ao parto, liberação dos anexos fetais e ao processo de involução uterina envolvem uma combinação de fatores, tais como a redução do tamanho uterino, remoção de debris, contração glandular, apoptose e proliferação celular. Tais eventos têm papel fundamental no processo involutivo, pois levam à alteração da superfície endometrial e retorno ao seu estado pré-gestacional, com a finalidade de criar um ambiente favorável ao desenvolvimento de um novo concepto (TAKAMOTO; LEPPERT; YU, 1998; SALAMONSEN, 2003; STANTON, 2011). Dessa forma, a absorção das microcarúnculas e sobreposição do epitélio luminal estão completas entre os dias 4 a 7 pós-parto, com o retorno do endométrio ao seu estado histológico pré-gestacional em torno de 14 dias após o parto (GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979; BAILEY; BRISTOL, 1983), embora alguns autores relatam que as alterações histológicas estejam completas em até 10 dias (STEVEN et al., 1979; GOMEZ-CUETARA et al., 1995).

Em relação à redução no diâmetro uterino, uma rápida diminuição é observada durante os primeiros 10 dias pós-parto, com redução nas taxas a partir do dia 11 até a completa involução (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). Em estudo baseado em palpação transretal, os autores relataram que ambos os cornos uterinos retornaram ao seu tamanho pré-gravídico em torno dos 32 dias pós-parto (GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979). De forma semelhante, outros autores relataram que a involução uterina ocorreu em torno de 27 dias para o corno uterino anteriormente não-gestante e em torno de 31 dias para o corno anteriormente gestante, baseando-se em ausência de redução significativa no diâmetro uterino em exames

ultrassonográficos sequenciais (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). No entanto, em outro estudo ultrassonográfico em éguas, os autores julgaram que a completa involução uterina ocorreu em torno de 23 dias pós-parto (MCKINNON et al., 1988), semelhante ao período de involução (22,5 dias) relatado em jumentas (DADARWAL et al., 2004).

Baixas taxas de concepção têm sido atribuídas à éguas acasaladas em até 10 dias pós-parto (LOY, 1980), possivelmente devido ao incompleto processo de involução uterina (GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979; STEVEN et al., 1979). Com o intuito de melhorar este processo de involução e visando o aumento das taxas de prenhez, vários procedimentos tem sido propostos, tais como: lavagem uterina (BLANCHARD et al., 1989; MCCUE; HUGHES, 1990), aplicação de agentes ecbólicos (LEY; PURKSWELL; BOWEN, 1988; BLANCHARD et al., 1991; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; KAYA, 2008), aplicação de 17β - estradiol em microesferas (ARROTT et al., 1994) ou utilização de esteroides ovarianos (SEXTON; BRISTOL, 1985; BRUEMMER; BRADY; BLANCHARD, 2002). No entanto, nenhum dos procedimentos supracitados foi eficiente em melhorar a involução uterina. Por outro lado, recentemente foi sugerida a suplementação com L-arginina como estratégia para melhorar o processo de involução uterina em éguas no período pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013).

Outros autores sugerem o acasalamento depois dos 10 dias após o parto, com o intuito de aumentar o tempo para o processo de involução uterina e permitir o reparo histológico, garantindo que o embrião esteja presente no útero após este período (14 dias pós-parto), melhorando assim as chances de sucesso reprodutivo (LOY et al., 1982; MCKINNON et al., 1988; BRUEMMER; BRADY; BLANCHARD, 2002). Desta forma, alguns autores propuseram a utilização de PGF2 α 6 dias após a primeira ovulação e acasalamento no segundo estro pós-parto ou a utilização de esteroides ovarianos para retardar o início do primeiro estro e ovulação pós-parto. No entanto, há controvérsias em relação ao sucesso destes protocolos, visto que enquanto alguns autores relatam maiores taxas de prenhez (KREIDER et al., 1978; MCKINNON et al., 1988), outros relatam que os mesmos protocolos não foram eficazes em melhorar as taxas de prenhez (LOY et al., 1982; ALMEIDA et al., 1995). De forma semelhante, em um estudo mais recente, foi observado que não houve influência do tratamento com ocitocina ou PGF2 α sobre o intervalo entre o parto e ovulação, assim como não houve melhora nas taxas de prenhez (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; KAYA, 2008).

Outro aspecto relacionado à involução uterina é o acúmulo de líquido intrauterino durante este processo. Este acúmulo de fluido e a ocorrência de endometrites têm sido associados a um incompleto processo de involução (MCKINNON et al., 1988;

MALSCHITZKY et al., 2002). Da mesma forma, condições patológicas como distocias, retenção de membranas fetais ou metrites podem prejudicar o processo de involução, e consequentemente, a fertilidade no período pós-parto (KIRACOFÉ, 1980). Alguns pesquisadores relatam queda dos índices de fertilidade quando fluido intrauterino está presente durante o estro ou diestro pós-parto, visto que pode ser resultado de endometrite, possuir atividade espermicida no momento do acasalamento, induzir luteólise precoce ou morte embrionária (ADAMS et al., 1987; MCKINNON et al., 1988). No entanto, outros autores sugerem que este acúmulo de fluido é normal e ocorre devido a um influxo fisiológico durante o processo de involução uterina (GRIFFIN; GINTHER, 1991a), assim como não está relacionado a endometrites ou recuperação de patógenos (BLANCHARD et al., 1991). Da mesma forma, a presença de líquido intrauterino durante o cio do potro não foi relacionada à redução das taxas de prenhez (MALSCHITZKY et al., 2002).

Em relação a este aspecto, foi observado acúmulo de fluido intrauterino no terceiro dia pós-parto em todas as éguas (n = 10), sendo que o aumento nas quantidades ocorreu de forma abrupta entre o 1º e 3º dias pós-parto. A partir deste momento, as quantidades de fluido diminuíram gradativamente entre os dias 4 e 7, sendo que após o dia 9 apenas pequenas quantidades foram detectadas, assim como nenhum fluido foi detectado após o 16º dia pós-parto (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). Neste contexto, ausência de fluido tem sido relatada desde 9 (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; KAYA, 2008) a 15 dias pós-parto (MCKINNON et al., 1988). Recentemente, foi demonstrado que éguas suplementadas com L-arginina no período pós-parto apresentaram menor quantidade, assim como um menor período com presença de fluido intrauterino quando comparadas a éguas controle, sugerindo este protocolo como uma potencial ferramenta para a melhoria de resultados reprodutivos no período pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013).

2.3 DINÂMICA FOLICULAR

A técnica ultrassonográfica tem sido fundamental no estudo da dinâmica folicular, visto que tem permitido caracterizar mudanças no perfil folicular, acompanhar folículos individualmente, monitorar efeitos após um determinado tratamento ou manipular folículos específicos em tempos desejados durante seu desenvolvimento (GINTHER, 2000).

Outro aspecto importante tem sido a descoberta de similaridades entre éguas e mulheres em relação às características de desenvolvimento folicular, favorecendo a utilização das éguas como modelo experimental para o estudo da foliculogênese em seres humanos (GINTHER et al., 2004b). Adicionalmente, o diâmetro folicular em éguas é superior ao observado em mulheres (2 vezes maior), facilitando a utilização de técnicas para experimentação *in vivo*, como acompanhamento de alterações vasculares através da ultrassonografia Doppler, amostragem sequencial de fluido folicular ou administração de tratamentos através de injeção intrafolicular (GINTHER et al., 2004a).

2.3.1 Intervalo Interovulatório

O período compreendido entre a ovulação de um ciclo estral e outra ovulação do próximo estro é denominado como intervalo interovulatório (IIO). Em éguas, a duração média deste período está entre 21 e 24 dias (GINTHER, 1992; BOLLWEIN et al., 2002a,b; JACOB et al., 2009a). Em relação às diferentes raças, um IIO mais longo tem sido descrito em éguas pôneis quando comparadas à éguas de raças maiores (GINTHER, 1992; GASTAL et al., 2008), assim como um IIO mais longo foi descrito em éguas mais velhas (≥ 18 anos) quando comparadas a animais mais jovens (GINTHER et al., 2008, 2009).

2.3.2 Seleção Folicular

Durante todo o ciclo estral, um contínuo e dinâmico processo de crescimento e regressão folicular ocorre em éguas (GINTHER et al., 2004a). Durante este processo, em espécies monovulares (p.ex., equinos, bovinos, humanos), há o desenvolvimento de ondas foliculares, onde vários folículos se desenvolvem em conjunto, mas apenas um folículo adquire capacidade de se desenvolver, continuar a crescer e se tornar o único com capacidade ovulatória, sendo este processo denominado seleção folicular (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001; JACOB et al., 2009b).

2.3.3 Ondas Foliculares

O termo onda folicular se refere ao processo em que diversos folículos crescem e se desenvolvem em sincronia durante um determinado período (GINTHER et al., 2004a). Em éguas, as ondas foliculares se desenvolvem durante todo o ciclo estral, sob diferentes condições hormonais, sendo um mecanismo complexo e controlado por diversos fatores (BERGFELT; GINTHER, 1992; GINTHER; BERGFELT, 1992; GINTHER, 1993, 2000). Portanto, durante o intervalo interovulatório em éguas, há o desenvolvimento de vários números e tipos de ondas foliculares (GINTHER, 1995).

As ondas foliculares que se desenvolvem em éguas são denominadas ondas maiores e menores (GINTHER, 2000). Em ondas maiores, o maior folículo atinge um diâmetro igual ou superior a 28 mm, sendo então denominado folículo dominante. Em ondas menores, o maior folículo atinge diâmetro em torno de 21 a 27 mm (GINTHER, 1993; GINTHER; BERGFELT, 1993; GINTHER et al., 2004b), porém nenhum folículo se torna dominante (BERGFELT; GINTHER, 1993a; GINTHER et al., 2004a). Em relação às diversas raças, algumas diferenças em relação ao padrão de desenvolvimento de ondas foliculares têm sido descritas. Em éguas Quarto-de-Milha e pôneis, normalmente uma onda maior se desenvolve ao final do diestro, ocasionando a ovulação no período de estro subsequente, enquanto que em éguas PSI e raças de sangue quente, frequentemente uma segunda onda maior se desenvolve no início do diestro, podendo este outro folículo dominante culminar em uma ovulação ou se tornar anovulatório (GINTHER, 1992).

Além das ondas foliculares que culminam em uma ovulação (ondas ovulatórias), durante o ciclo estral também podem se desenvolver ondas anovulatórias (GINTHER, 1992, 1993), onde a incidência de ondas foliculares maiores de caráter anovulatório tem sido descrita em torno de 25% durante o intervalo interovulatório (GINTHER, 1993; GINTHER et al., 2004b). Portanto, levando-se em consideração as características no desenvolvimento de ondas foliculares em éguas, durante um determinado momento do ciclo estral podemos encontrar uma sobreposição de folículos de diferentes ondas, gerando um entrelaçamento entre folículos. Neste contexto, um folículo dominante proveniente de uma onda folicular anovulatória pode ser encontrado sobrepondo-se a folículos de uma nova onda folicular ovulatória, assim como folículos de ondas anteriores, em um estado aparentemente estático, tem sido descritos durante a próxima onda ovulatória em cerca de 25% das éguas. Adicionalmente, quando comparada a outras espécies, o desenvolvimento de ondas menores, assim como o maior número de folículos

durante uma onda folicular são observados em éguas, caracterizando a grande complexidade do mecanismo de desenvolvimento folicular na espécie equina (GINTHER et al., 2004b).

2.3.4 Emergência Folicular

Em éguas, a onda folicular ovulatória tem sua emergência aproximadamente na metade no período interovulatório. Após a emergência da onda, os folículos se desenvolvem em conjunto por vários dias, em um período denominado fase comum de crescimento (GINTHER et al., 2001, 2003). Durante esta fase, as taxas de crescimento são similares (média 2,7 mm/dia) entre os folículos pertencentes à onda (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2003, 2004b).

A emergência esperada para folículos presentes em uma determinada onda folicular se refere ao exame em que um determinado folículo (geralmente o futuro folículo dominante) é primeiramente detectado ao exame ultrassonográfico, em um diâmetro compatível com um acompanhamento retrospectivo, sendo definido de diferentes maneiras em cada grupo de pesquisa (BERGFELT; GINTHER, 1993a; GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2004a). Em éguas, geralmente a emergência folicular tem sido considerada como 6 mm em animais em que aspiração folicular foi realizada (GASTAL et al., 1997; GINTHER, 2000) ou entre 13 e 15 mm em animais controle (sem aspiração), visto que há dificuldade em identificar e acompanhar folículos individualmente devido ao grande número de folículos presentes nos ovários (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2004b).

Após a emergência e durante a fase comum de crescimento, uma média de 7 a 11 folículos são descritos como parte da onda folicular (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 1997). Em éguas, o futuro folículo dominante tem sua emergência aproximadamente 1 dia antes da emergência dos demais folículos (GASTAL et al., 1997; GINTHER, 2000). Portanto, o futuro folículo dominante atinge o diâmetro de 6 mm antes dos demais folículos, mantendo cerca de 3 mm de diâmetro a mais que os outros folículos durante toda a fase comum de crescimento (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2004a).

2.3.5 Divergência ou Desvio Folicular

A fase comum de crescimento ocorre entre a emergência folicular e o início da divergência. Portanto, o final da fase comum de crescimento e o começo do processo de divergência são sinônimos (GINTHER et al., 2004a). O processo de desvio folicular caracteriza-se pela continuidade no crescimento de apenas um (ocasionalmente dois) folículo membro da onda folicular. O folículo que continua se desenvolvendo denomina-se folículo dominante, atingindo maiores diâmetros (≥ 28 mm) e então entra em atresia (onda folicular maior anovulatória) ou culmina em ovulação (onda ovulatória). Os demais folículos pertencentes à onda cessam seu crescimento e entram em atresia, sendo denominados folículos subordinados (GASTAL et al., 1999b; GINTHER et al., 2004a,b).

O desvio observado é definido pelo dia em que o futuro folículo dominante (F1) continua seu crescimento a uma taxa aparentemente constante, enquanto os folículos subordinados (primeiro folículo subordinado - F2; segundo folículo subordinado - F3, e assim sucessivamente) apresentam uma taxa de crescimento comparativamente menor ou começam a apresentar redução no diâmetro (GINTHER et al., 1997, 2003, 2004a,b). Embora geralmente apenas os dois maiores folículos (F1 e F2) são utilizados para determinar o momento da divergência, os outros folículos subordinados também começam a apresentar redução em seu desenvolvimento, podendo ser considerados para a avaliação do momento do desvio (GINTHER et al., 2004b).

Além do momento observado do desvio, outro momento pode ser utilizado para fins de pesquisa, sendo este baseado em resultados de estudos prévios e então denominado momento esperado do desvio (GINTHER et al., 2001). O diâmetro médio considerado para o maior folículo no momento esperado do desvio geralmente é 22,5 mm (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001, 2003, 2004b). Neste contexto, o diâmetro médio para F1 e F2 ao momento esperado do desvio são 22,5 e 19 mm, respectivamente, com o momento do desvio ocorrendo em média 6,2 dias após a emergência (6 mm) ou em aproximadamente 18 dias do intervalo interovulatório (GASTAL et al., 1997, 1999a,c,d; GINTHER et al., 2004a).

A diferença média apresentada no diâmetro entre F1 e F2 (3 mm; equivalente a um dia de crescimento) no início do processo de divergência (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2004b) tem sido sugerida como crucial, de forma que o F1 seja o primeiro a atingir o diâmetro crítico de aproximadamente 23 mm e assim consiga estabelecer dominância, antes que o F2 possa atingir tal estágio (GINTHER et al., 1997; GASTAL et al., 1999b). Este mecanismo se

torna fundamental, visto que em estudos utilizando aspiração folicular, foi observado que os folículos subordinados, assim como o folículo dominante, têm a capacidade de assumir a dominância (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001).

2.3.6 Dominância Folicular

Como citado anteriormente, os folículos subordinados mantêm a capacidade de assumir a dominância. Em alguns estudos, esta capacidade tem sido descrita como similar entre os 4 maiores folículos no momento da divergência ou até mesmo após este processo, onde a dominância dos menores folículos somente foi bloqueada quando o F1 estava presente (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2004a). Desta maneira, foi demonstrado que o F2 se tornou dominante quando o F1 foi aspirado no momento esperado do desvio (GASTAL; GASTAL; GINTHER, 1999). Em outro experimento utilizando aspiração folicular, quando nenhum folículo, o folículo dominante, os dois ou os três maiores folículos foram aspirados no momento esperado da divergência, o maior folículo remanescente tornou-se dominante em 76% das ondas foliculares. No mesmo estudo, foi demonstrado também que o F2 foi capaz de assumir a dominância em até dois dias após o momento esperado do desvio (GASTAL et al., 2004).

O folículo dominante tem sido definido como aquele folículo que atinge diâmetro igual ou superior a 28 mm (GINTHER, 1993). Contudo, o primeiro folículo que atingiu o diâmetro de 20 mm (GINTHER et al., 2001) ou que foi detectado como o maior folículo no momento do desvio (GASTAL et al., 1997) tem sido descrito como aquele que se tornou dominante em 93% das ondas ou em todas as éguas, respectivamente. Sendo assim, um intervalo de 7 (GINTHER, 1992, 1995; GASTAL et al., 1997) a 10 dias (GINTHER et al., 2004b) tem sido descritos entre o momento do desvio e a ovulação, sendo que o folículo pré-ovulatório atinge diâmetro máximo (entre 40 e 45 mm; GINTHER, 1992; GINTHER et al., 2004b; JACOB et al., 2009b) cerca de 1 a 2 dias antes da ovulação (GINTHER et al., 2004b; GASTAL; GASTAL; GINTHER, 2006).

2.3.7 Múltiplos Folículos Dominantes e Ovulações

Duplos folículos dominantes são definidos como dois folículos que atingem diâmetro ≥ 28 mm (GINTHER et al., 2004b). Quando dois folículos dominantes são observados em uma onda folicular, os destinos observados são a dupla ovulação ou a regressão de um folículo após atingir o diâmetro supracitado, resultando em uma onda folicular com dois desvios observados (GINTHER et al., 2004b; JACOB et al., 2009b). A incidência de múltiplas ovulações (geralmente dupla) varia de acordo com as diferentes raças, com frequências variando desde 2% em éguas pôneis até 25% em éguas PSI, sendo que as duplas ovulações podem ocorrer de forma sincrônica ou assincrônica, assim como em um ovário somente ou de forma bilateral (GINTHER, 1992). Outros estudos também têm descrito baixas taxas de ovulações duplas, estando em torno de 2 a 3% na maioria das vezes (GASTAL et al., 1997; JACOB et al., 2009b).

2.3.8 Ovulações de Diestro

Em éguas, há a existência de ovulações geradas por um folículo dominante em que esperava-se ser uma onda anovulatória, sendo este fenômeno denominado ovulações secundárias ou ovulações de diestro, visto que ocorrem sob altas concentrações de progesterona (GINTHER et al., 2004a). Em relação às espécies monovulares (p.ex., equinos, bovinos, humanos), as fêmeas equinas são as únicas em que este fenômeno foi descrito (HUGHES; STABENFELDT; EVANS, 1972), sendo os oócitos provenientes destas ovulações fertilizáveis (HUGHES; STABENFELDT, 1977). A incidência deste tipo de ovulação difere entre as diversas raças, variando desde 18 a 21% em éguas PSI e raças de sela até próximas de 0% em Pôneis e Quarto de Milha (GINTHER, 1992) ou Bretões (GINTHER et al., 2004b).

2.4 DINÂMICA FOLICULAR - ENDOCRINOLOGIA

2.4.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Em diversas espécies, independente do estado reprodutivo, a emergência de uma onda folicular tem sido atribuída ao aumento dos níveis de FSH (GINTHER; BERGFELT, 1992; BERGFELT; GINTHER, 1993b; GINTHER, 1993, 2000; GINTHER et al., 2003, 2005). Em éguas, após o futuro folículo dominante ter atingido 6 mm, há um aumento nas concentrações de FSH, que atingem o pico após 3 dias e então começam a diminuir. Portanto, o pico nas concentrações de FSH ocorre em média quando o futuro folículo dominante atinge o diâmetro médio de 13 mm (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2004a).

A principal função do FSH após o pico é promover o crescimento e desenvolvimento de todos os folículos até o final da fase comum de crescimento (GINTHER et al., 2004a). Sendo assim, as concentrações começam a diminuir gradativamente após atingirem o pico e se apresentam em baixos níveis poucos dias após a divergência (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2001), em um intervalo de aproximadamente 3 dias entre o início no declínio das concentrações de FSH e o início do desvio (GINTHER et al., 2001). Este declínio nas concentrações durante a fase de crescimento comum é atribuído aos vários folículos em crescimento, visto que as concentrações de FSH diminuíram de forma mais lenta quando um menor número de folículos estava presente (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997), assim como níveis mais elevados de FSH têm sido observados em éguas mais velhas, devido a um menor número de folículos e uma possível redução no efeito inibitório sobre as concentrações de FSH (GINTHER et al., 2009).

Portanto, há uma íntima ligação entre os folículos em crescimento e as concentrações de FSH durante o período de declínio. Neste caso, os folículos contribuem em conjunto para a redução dos níveis de FSH, da mesma forma que, mesmo em baixas concentrações, o FSH ainda permaneça essencial para os folículos em desenvolvimento (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001). Desta forma, ao início do processo de divergência folicular, a relação com o FSH passa de uma associação com diversos folículos para apenas uma íntima relação com o futuro folículo dominante em desenvolvimento (GINTHER et al., 2001, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que no momento do desvio o contínuo declínio nas concentrações de FSH é ocasionado pelo folículo dominante, visto que os níveis de FSH voltaram a subir, assim como

o F2 retomou seu desenvolvimento após a aspiração do F1 no momento esperado da divergência (GASTAL et al., 1997). Portanto, ao atingir o diâmetro necessário, o maior folículo é capaz de continuar estimulando a queda nos níveis de FSH, mantendo-as em concentrações abaixo dos níveis requeridos pelos demais folículos, bloqueando assim o desenvolvimento destes.

Sendo assim, no início do processo de divergência, o F1 é capaz de utilizar o FSH em baixas concentrações, o que não ocorre com os folículos subordinados (GINTHER et al., 2000, 2001). Portanto, este declínio nos níveis de FSH torna-se necessário para o estabelecimento do desvio, visto que foi observado o desenvolvimento de vários folículos dominantes após tratamento com FSH (SQUIRES et al., 1986). Desta forma, o mecanismo de desvio ocorre durante a fase de declínio da onda de FSH, onde as concentrações encontram-se abaixo dos níveis requeridos pelos folículos subordinados, visto que estes ainda não atingiram um estágio de desenvolvimento similar ao F1. Portanto, a fase de declínio nas concentrações de FSH envolve a continuidade no crescimento e desenvolvimento do maior folículo (futuro folículo dominante) durante o processo de divergência folicular (GINTHER et al., 2000, 2004a).

2.4.2 Hormônio Luteinizante (LH)

Durante uma onda folicular, aumento nas concentrações de LH tem sido observado em torno dos 15 dias do intervalo interovulatório, ou seja, próximo do final da fase de crescimento comum (GINTHER et al., 2009). Em éguas, há o desenvolvimento de uma longa onda de LH com duração média de 6 a 7 dias, atingindo níveis máximos 1 dia após a ovulação (WHITMORE; WENTWORTH; GINTHER, 1973; GINTHER et al., 2007b). Neste contexto, durante toda a longa onda de LH, uma elevação transitória nos níveis tem sido observada durante o momento do desvio, permitindo que altos níveis de LH estejam disponíveis neste momento (GASTAL et al., 1997, 1999a; BERGFELT; GASTAL; GINTHER, 2001).

Maiores quantidades de receptores para LH são encontradas em células da granulosa em folículos de 15 a 19 mm em comparação a folículos de 10 a 14 mm, assim como maior quantidade de aromatase em folículos com 20 a 24 mm do que em folículos entre 15 a 19 mm de diâmetro (GOUDET et al., 1999). Portanto, as células da granulosa do futuro folículo dominante adquirem receptores para LH previamente ao desvio, proporcionando o caminho para um efeito funcional da elevação transitória de LH (GINTHER et al., 2001), permitindo que o maior folículo utilize estes maiores níveis do hormônio (GASTAL et al., 1999a).

Embora não tenha sido observada alteração em relação ao início do processo de divergência sob baixos níveis de LH, o desenvolvimento do F1 pós-divergência foi reduzido (GINTHER, 2000). Da mesma forma, houve redução no diâmetro do F1 em 1 ou 2 dias após o início do desvio quando os níveis de LH foram reduzidos (GASTAL et al., 1999a, 2000), assim como um efeito positivo dos altos níveis de LH tem sido observado em relação ao diâmetro do F1 em 2 dias após a divergência (GINTHER et al., 2001). Portanto, os resultados indicam que o LH não está envolvido no início do processo de divergência através da inibição de outros folículos e redução nas concentrações de FSH, porém as concentrações de LH são necessárias para o desenvolvimento do folículo dominante após o início do desvio folicular (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001).

Sendo assim, até o momento de pico nas concentrações de FSH, que ocorre durante o declínio nas concentrações de progesterona, FSH e LH estão intimamente associados. Após este momento, os níveis de FSH começam a cair, assim como os de LH começam a se elevar, ficando tais hormônios dissociados até que ocorra a ovulação (BERGFELT; GINTHER, 1993b; GASTAL et al., 1997, 2000). Portanto, a divergência ocorre durante altas concentrações de LH e baixas concentrações de FSH, sendo tais condições hormonais necessárias para a ocorrência deste processo (GASTAL et al., 1997).

2.4.3 Estradiol (E₂)

Em torno de 1 dia antes do início do processo de divergência, ou seja, quando o maior folículo apresenta em média 18 mm de diâmetro, há um aumento nas concentrações sistêmicas de estradiol, assim como as concentrações de estradiol no fluido folicular começam a apresentar aumento diferencial entre o F1 e os folículos subordinados (GASTAL; GASTAL; GINTHER, 1999; GASTAL et al., 1999c; DONADEU; GINTHER, 2002). Portanto, o aumento inicial nas concentrações de estradiol coincide aproximadamente com o início do processo de desvio folicular (GINTHER et al., 2001). Algumas funções intrafoliculares têm sido descritas em relação ao estradiol, sendo o aumento na atividade enzimática relacionada à esteroidogênese e aromatização nas células da granulosa, aumento na expressão de receptores para LH e aumento da sensibilidade folicular aos níveis de FSH e LH (HILLIER, 1985; BELIN et al., 2000).

Tanto o estradiol como frações proteicas do fluido folicular tem sido descritas como capazes de atuar na supressão dos níveis circulantes de FSH (MILLER; WESSON; GINTHER,

1979, 1981; BERGFELT; GINTHER, 1986; BERGFELT et al., 2000). Neste contexto, um aumento nos níveis de FSH e queda nas concentrações de estradiol foram observados quando o F1 foi aspirado no momento esperado da divergência, assim como as concentrações de FSH não se elevaram quando apenas o F2 foi aspirado (GASTAL; GASTAL; GINTHER, 1999). Adicionalmente, foi observado que o aumento nas concentrações de estradiol, de forma sistêmica ou intrafolicular, não foi um pré-requisito para o início do processo de desvio, mesmo este aumento ocorrendo anteriormente a este processo (GASTAL; GASTAL; GINTHER, 1999; GINTHER et al., 2002).

Levando-se em consideração as características descritas, o aumento nas concentrações de estradiol aparentemente não contribui para a redução nos níveis de FSH até o dia anterior ao início do processo de divergência, porém, este aumento nas concentrações de estradiol é necessário para que os níveis de FSH continuem a diminuir durante e após o desvio. Portanto, os níveis elevados de LH continuam a estimular a produção de estradiol pelo folículo dominante, tornando-se eventos cruciais relacionados ao processo de divergência (GINTHER et al., 2001). Após a divergência, as concentrações de estradiol continuam a aumentar, atingindo níveis máximos 2 dias antes da ovulação, com subsequente queda após este período (GINTHER et al., 2005b, 2006).

2.4.4 Inibina

Quando os folículos atingem cerca de 13 mm de diâmetro, já começam a secretar maiores quantidades de inibina (GINTHER et al., 2001). Da mesma forma, foi observado que as concentrações de inibina começam a aumentar antes da queda nas concentrações de FSH, indicando a participação da inibina neste processo (BERGFELT et al., 1991, 2001; IRVINE; ALEXANDER; MCKINNON, 2000; DONADEU; GINTHER, 2001). Sendo assim, os primeiros 2 dias de redução nas concentrações de FSH tem sido atribuída à inibina, indicando que este aparentemente seria o principal fator, ou talvez o único, causador da redução nos níveis de FSH durante a fase de crescimento comum (GINTHER et al., 2001).

De forma semelhante ao estradiol, as concentrações de inibina começam a apresentar aumento diferencial no folículo dominante antes do início do processo de divergência (DONADEU; GINTHER, 2002), assim como a aspiração do F1 no momento do desvio levou a um aumento diferencial nas concentrações de inibina no F2 remanescente (GINTHER et al.,

2002). Adicionalmente, a aplicação de anticorpos contra inibina resultou em aumento nos níveis de FSH (GLENCROSS et al., 1994), assim como maior número de folículos dominantes e ovulações (MCKINNON et al., 1992; MCCUE; HUGHES; LASLEY, 1993; NAMBO et al., 1998; BRIANT et al., 2000). Portanto, resultados indicam a participação da inibina como um fator necessário ao processo de desvio folicular, através da redução dos níveis de FSH, assim como proporcionando maior capacidade de resposta ao futuro folículo dominante (GINTHER et al., 2004a).

Durante e após o momento do desvio, as concentrações de inibina permanecem elevadas, o que é atribuído à presença do folículo dominante. Desta forma, este mecanismo também participaria na continuidade da redução nas concentrações de FSH (DONADEU; GINTHER, 2001; GINTHER et al., 2001). Dessa forma, o processo de divergência requer a queda nas concentrações de FSH a níveis abaixo dos requeridos pelos menores folículos, assim como a continuidade no declínio destas concentrações após o desvio, onde aparentemente estradiol e inibina participariam em conjunto durante este processo (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001).

2.4.5 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF)

O sistema IGF consiste nas moléculas livres (IGF-1 e IGF-2), nos seus receptores, uma família de proteínas de ligação (IGFBPs) e um conjunto de proteases (WEBB et al., 1999). As IGFBPs atuam através da ligação às moléculas de IGF e formação de complexos, reduzindo assim a biodisponibilidade de moléculas de IGF livres, enquanto as proteases desempenham sua função de forma inversa, ou seja, através da degradação das IGFBPs e consequentemente levando ao aumento das moléculas de IGF livres (GINTHER et al., 2001; SPICER, 2004). Muitas funções têm sido propostas aos fatores de crescimento intrafoliculares, principalmente ao IGF, como aumento da sensibilidade ao FSH, indução da expressão de receptores para LH, aumento da atividade enzimática de esteroidogênese e aromatização, crescimento e proliferação celular (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001), assim como a participação como regulador durante o processo de foliculogênese (BEG; GINTHER, 2006).

Donadeu e Ginther (2002) observaram aumento diferencial nas concentrações de IGF-1 livre no F1 concomitante com o aumento nas concentrações de estradiol, ou seja, antes do início do processo de divergência. Outros autores observaram aumento diferencial nas

concentrações de IGF-1 livre no F2 após a aspiração do F1 no momento do desvio, sendo este aumento observado antes do início do desvio experimental entre os dois maiores folículos remanescentes (GINTHER et al., 2002). Da mesma forma, as concentrações de IGFBP (IGFBP-2) aumentaram nos folículos subordinados no momento da divergência, indicando uma possível participação das IGFBPs neste processo, através da redução na biodisponibilidade de IGF-1 livre e redução no desenvolvimento dos folículos subordinados (GINTHER et al., 2001; DONADEU; GINTHER, 2002). Logo, a participação do sistema IGF tem recebido grande atenção, devido ao seu importante papel como fator intrafolicular, possibilitando que este seja um fator crucial no início e desenvolvimento da dominância entre os folículos (GINTHER et al., 2004c,d,e). Recentemente, altas concentrações de IGF-1 (40 vezes maiores) foram observadas no folículo dominante ($34,1 \pm 0,5$ mm), quando comparadas às concentrações no folículo subordinado ($25,3 \pm 0,7$ mm) ou folículos anovulatórios ($32,7 \pm 1,8$ mm) (SCHAUER et al., 2013).

2.4.6 Outros Fatores

Além dos fatores anteriormente citados, outros fatores têm sido descritos trabalhando em conjunto durante o processo de seleção folicular. Neste contexto, os andrógenos e progestágenos têm sido considerados como elementos participantes do processo, visto que estes elementos são produzidos nas células da teca e então aromatizados nas células da granulosa (FORTUNE; QUIRK, 1988). Da mesma forma, estes compostos têm sido observados em maiores concentrações nos folículos subordinados, tal característica atribuída a uma possível diminuição da atividade enzimática de aromatização (DONADEU; GINTHER, 2002).

Outros fatores têm sido observados em quantidades diferencialmente aumentadas no F1 antes do momento da divergência, juntamente com os outros anteriormente citados, sendo estes fatores a ativina e folistatina (DONADEU; GINTHER, 2002), assim como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente fator angiogênico (GINTHER et al., 2004d). A ativina e folistatina atuam no processo através da estimulação de enzimas esteroidogênicas, aromatase e aumento de receptores para gonadotrofinas no futuro folículo dominante (GINTHER et al., 2001, 2004a), assim como o VEGF atua no aumento na vascularização do folículo dominante, contribuindo para uma maior disponibilidade de substratos para a cadeia esteroidogênica, fatores de crescimento, gonadotrofinas e demais

nutrientes necessários para o desenvolvimento preferencial do folículo em questão (GINTHER et al., 2004a).

Recentemente, outros autores estudaram a influência de microRNAs (miRNAs) sobre o processo de seleção folicular em éguas. Alguns miRNAs envolvidos nos processos de sobrevivência de células foliculares (miR-21 e miR-23a), proliferação celular (miR-145, miR-503 e miR-224), produção de estradiol (miR-224, miR-383 e miR-378) e diferenciação celular (miR-132 e miR-212) foram estudados, sendo que foi observado aumento diferencial nos níveis de miR-145, miR-378 e miR-132 no fluido folicular dos folículos subordinados, assim como aumento nos níveis intrafoliculares de miR-21, miR-132, miR-212 e miR-224 no folículo dominante. Adicionalmente, foi observada a participação de alguns miRNAs na regulação de genes responsáveis por processos de sobrevivência e diferenciação celular (PTEN, RASA1 e SMAD4), sugerindo portanto uma participação dos miRNAs durante o processo de seleção, maturação e ovulação (SCHAUER et al., 2013).

2.5 DINÂMICA FOLICULAR - PERÍODO PÓS-PARTO

Atualmente, há poucas informações a respeito dos processos de desenvolvimento e seleção foliculares durante o primeiro ciclo no período pós-parto de éguas (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013). Durante o puerpério, um período de estro (comumente chamado de cio do potro) é observado, sendo este primeiro estro pós-parto reconhecidamente fértil (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1975; GINTHER, 1992). Neste contexto, este primeiro estro se inicia em 5 a 12 dias pós-parto, com as ovulações ocorrendo em até 20 dias na maioria das éguas (LOY, 1980; GINTHER, 1992), onde uma maior frequência de ovulações é observada entre 12 a 15 dias pós-parto (KATILA; KOSKINEN; OIJALA, 1988; BLANCHARD et al., 1991; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008; KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), sendo estes resultados semelhantes aos observados em jumentas (DADARWAL et al., 2004; TOSI et al., 2013).

Durante o pós-parto imediato, o diâmetro do maior folículo foi observado em torno de 13 a 16 mm (GINTHER; BAUCUS; BERGFELT, 1994; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008), atingindo o diâmetro médio de $36,4 \pm 1,09$ mm em torno do 8º dia pós-parto (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008). Durante este período, o número de folículos < 20 mm apresentou correlação negativa ao número de folículos > 20 mm de diâmetro no terceiro e quarto dia pós-

parto. Adicionalmente, o número médio de folículos < 20 mm estava em torno $3,3 \pm 0,1$ ao início do estro, enquanto o número de folículos ≥ 20 mm estava em torno de $0,23 \pm 0,1$ e $1,03 \pm 0,1$ ao primeiro e quarto dia pós-parto, respectivamente (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKİZ, 2008).

Em outro experimento, realizado com jumentas no período pós-parto, cerca de 3 a 7 folículos entre 10 e 15 mm de diâmetro foram observados em até 24 horas após o parto, sendo que pelo menos um folículo atingiu diâmetro igual ou superior a 25 mm entre os dias 5 e 12 (média de $8,0 \pm 1,2$ dias). Da mesma forma, foram observadas taxas de crescimento do folículo dominante ($2,7 \pm 0,1$ mm/dia) e diâmetro ($41,3 \pm 0,8$ mm) do folículo pré-ovulatório (DADARWAL et al., 2004), sendo estas características reportadas como semelhantes às características observadas em éguas (PIERSON; GINTHER, 1985a). Em outro trabalho mais recente, realizado no período pós-parto de jumentas, o diâmetro médio observado para o folículo dominante foi $2,8 \pm 0,2$ cm no primeiro dia do estro (média de $7,6 \pm 2,1$ dias pós-parto), assim como um diâmetro de $4,4 \pm 0,3$ cm foi observado no dia anterior à ovulação (TOSI et al., 2013).

Durante o primeiro estro pós-parto em éguas foram observados em torno de 2 a 6 folículos entre 6 e 10 mm de diâmetro, assim como cerca de 2 a 4 folículos entre 11 a 15 mm (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013). Tais números foram relatados como menores quando comparados aos resultados de éguas não lactantes, onde estas apresentaram cerca de 6 a 10 ou 4 a 7 folículos entre 6 a 10 mm ou 11 a 15 mm, respectivamente (PIERSON; GINTHER, 1987). Além disso, o diâmetro dos dois maiores folículos no momento do desvio foram $22,9 \pm 1,2$ e $20,4 \pm 1,4$ mm no primeiro estro pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), sendo estes diâmetros semelhantes aos observados em estudos com éguas (22,7 e 21,7 mm) fora do período pós-parto (JACOB et al., 2009b).

2.6 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

A ultrassonografia Doppler baseia-se em frequências *shift*-Doppler, sendo estas frequências provenientes dos ecos gerados a partir das células sanguíneas em movimento, de forma que as frequências se alteram conforme estas células se movimentam em direção ao transdutor ou se afastam deste. Desta forma, a ultrassonografia Doppler se tornou uma ferramenta emergente, com grande potencial preditivo e de monitoramento, contribuindo assim para o aumento da capacidade diagnóstica entre profissionais e cientistas. Desta forma, uma

maior capacidade investigativa tem sido atribuída ao uso desta ferramenta, visto que informações sobre características de vascularização são acrescentadas em relação à ultrassonografia em modo bidimensional (GINTHER; UTT, 2004).

Em relação à sua utilização, duas técnicas são apresentadas, sendo elas o modo espectral e o modo Doppler colorido (*color-flow*). No modo espectral, um cursor é posicionado no lúmen de um vaso sanguíneo específico, onde as mensurações das características de vascularização serão obtidas. O ângulo em que os feixes ultrassonográficos interceptam o lúmen do vaso sanguíneo é denominado ângulo Doppler ou ângulo de insonação, sendo este ângulo utilizado para a obtenção das mensurações. Durante o exame em modo espectral, as frequências obtidas de determinado vaso sanguíneo são processadas e dispostas em um gráfico denominado espectro de frequências Doppler ou simplesmente gráfico espectral, representando os ciclos cardíacos. Dentro do gráfico espectral, ao selecionar um ciclo cardíaco, alguns pontos podem ser observados e utilizados para o cálculo das velocidades de fluxo sanguíneo. O ponto máximo do gráfico representa a velocidade do pico sistólico (PSV), o qual significa o ponto máximo de obtenção de frequências Doppler. O menor ponto dentro do gráfico, anterior ao próximo pico sistólico representa a velocidade diastólica final (EDV). A média destes valores ao longo do ciclo cardíaco é representada pela TAMV, denominada média das velocidades máximas (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007).

Durante os exames em modo Doppler colorido, as frequências obtidas são processadas e apresentadas como áreas coloridas, representando as características de vascularização daquele local. Geralmente, os aparelhos de ultrassonografia Doppler utilizam imagens em tons de azul e vermelho para representar o movimento das células sanguíneas para longe ou em direção ao transdutor, respectivamente, não sendo representações de fluxo sanguíneo venoso ou arterial. Uma nova tecnologia em relação aos exames em modo colorido é o exame em modo Power Doppler. Este exame traz um aumento na sensibilidade em torno de 3 a 5 vezes em relação ao exame convencional, proporcionando assim a avaliação de vasos sanguíneos com diâmetro menor ou fluxo sanguíneo mais fraco, sendo as características de vascularização representadas em imagens coloridas de uma única coloração, independente da direção do fluxo sanguíneo (GINTHER; UTT, 2004).

Para a avaliação das características de vascularização em modo espectral, uma alternativa pode ser a utilização dos índices Doppler, que são razões das mensurações de velocidade, sendo independentes do ângulo de insonação. Sua utilização se torna útil visto que muitas vezes, em experimentação animal, os movimentos das vísceras ou do próprio animal, assim com a avaliação de locais com vasos menores ou tortuosos dificultam a determinação do

ângulo Doppler. O índice de resistência (RI) é resultado do PSV menos o EDV, dividido pelo PSV. Este índice apresenta relação negativa com a quantidade de perfusão vascular, ou seja, quanto maior o valor de RI, menor será a perfusão. O índice de pulsatilidade (PI) é resultado do PSV menos o EDV, dividido pelo TAMV. Este índice também apresenta relação negativa, ou seja, quanto maior o valor de PI, menor será a vascularização nos tecidos distais ao ponto de avaliação. Contudo, PI e RI apresentam alta correlação ($r > 0,9$), sugerindo apenas a utilização de um dos índices para a avaliação das características de fluxo sanguíneo (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007).

Em relação aos exames utilizando modo Doppler colorido, a quantidade de vascularização pode ser avaliada através da quantificação no número e tamanho dos pontos ou áreas coloridas (avaliação objetiva), assim como pode ser realizada a avaliação por escores (p.ex., 1 a 4, indicando vascularização mínima a máxima; avaliação subjetiva). A maior vantagem deste tipo de avaliação é a estimativa das características vasculares diretamente em uma estrutura, ou seja, a avaliação pode ser direcionada especificamente a uma área, possibilitando uma avaliação sistemática do local desejado, ao invés da avaliação de apenas um foco (p. ex. apenas um vaso sanguíneo durante o exame espectral). Além disso, muitas vezes devido aos movimentos de vísceras e/ou do próprio animal, a manutenção do cursor nos exames em modo espectral é prejudicada, tornando a realização deste tipo de exame mais difícil e demorada. As principais desvantagens deste tipo de avaliação seriam a utilização de imagens selecionadas e não o exame em tempo real (no caso de análise objetiva), ou a subjetividade na atribuição de escores entre avaliadores (análises subjetivas) (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007).

2.7 VASCULARIZAÇÃO UTERINA

Desde que a ultrassonografia Doppler se tornou disponível, sua utilização ganhou grande importância na reprodução de equinos, por se tratar de uma técnica não invasiva que permite a observação das características de vascularização do trato reprodutivo, possibilitando assim a avaliação de condições fisiológicas e/ou patológicas relacionadas a este sistema (STOLLA; BOLLWEIN, 1997; BOLLWEIN et al., 1998).

Em avaliações realizadas nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 do ciclo estral (dia 0 = ovulação), não foram observadas diferenças entre os valores de RI das artérias uterinas (esquerda e direita),

assim como uma boa correlação ($r > 0,94$; $P < 0,05$) entre os valores de ambas foi observada. Os maiores valores de RI foram observados nos dias 0 e 10, quando comparados aos valores dos dias 5, 15 e 20 (BOLLWEIN et al., 1998). De forma semelhante, ao longo do ciclo estral, não foram observadas diferenças entre os valores de PI das artérias uterinas ipsilateral ou contralateral ao folículo dominante ou corpo lúteo, assim como uma boa correlação ($r = 0,79$; $P < 0,0001$) entre estas foi observada. Além disso, um padrão ao longo do ciclo foi descrito, onde altos valores de PI foram observados nos dias 0 e 1 (dia 0 = ovulação), com subsequente queda até o dia 5, e novo aumento a partir do dia 5 até o dia 11. Entre o dia 11 e dois dias antes da próxima ovulação, uma nova redução nos valores foi observada. Adicionalmente, um pequeno aumento foi descrito entre os dias 2 e 1 antes da ovulação. Em relação aos níveis hormonais, apenas uma fraca correlação negativa ($r = -0,21$; $P < 0,05$) foi observada entre os níveis de estradiol e os valores de PI das artérias uterinas durante o estro, no entanto, durante o diestro não foi observada relação entre os níveis plasmáticos de progesterona e os valores de PI das mesmas artérias (BOLLWEIN et al., 2002a).

Durante a gestação, Bollwein, Mayer e Stolla (2003) observaram um aumento de vascularização (altos valores de TAMV e baixos valores de PI) nas artérias uterinas de éguas gestantes quando comparadas a éguas não prenhes, sendo este aumento observado 11 dias após a ovulação. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre o corno uterino onde o embrião estava presente e o corno uterino contralateral até o 15º dia. A partir dos 15 até os 29 dias de gestação, os valores se apresentaram altos para TAMV e baixos para PI na artéria uterina ipsilateral ao corno uterino em que o embrião estava presente, quando comparados à artéria uterina contralateral.

De forma semelhante, outros autores observaram que até o 11º dia pós-ovulação não houve diferenças na vascularização endometrial entre éguas prenhes e não prenhes, assim como entre os cornos uterinos ipsi ou contralateral ao corpo lúteo. No entanto, durante o período de 11 a 16 dias, houve aumento na vascularização endometrial em ambos os cornos uterinos nas éguas gestantes, enquanto nenhuma alteração foi observada em relação às éguas não gestantes. Adicionalmente, no mesmo período, foi observado aumento de vascularização no corno em que o embrião estava presente em relação ao corno contralateral, assim como a presença do embrião no corno uterino por um período de aproximadamente 7 minutos foi capaz de estimular o aumento na vascularização endometrial na porção média do corno uterino. Desta forma, os resultados demonstraram que mudanças vasculares ocorrem localmente no endométrio de éguas gestantes, em associação com mudanças na localização da vesícula embrionária durante a fase de mobilidade intrauterina. Nos exames em modo espectral realizados nas artérias presentes no

mesométrio, foi observado aumento nos valores de TAMV, assim como redução nos valores de PI dos 10 aos 16 dias nas éguas gestantes, sem ser observada diferença entre os cornos uterinos com ou sem a presença do embrião (SILVA et al., 2005).

Silva et al. (2005) observaram que, no período após a fixação ($15,8 \pm 0,2$ dias), um aumento nos valores de TAMV e diminuição nos valores de PI ocorreu no corno uterino em que houve a fixação, em relação ao corno uterino oposto. Da mesma forma, após a fixação, a vascularização endometrial foi observada na área ao redor da vesícula embrionária, na porção média do corno ipsilateral à fixação e na porção média do corno contralateral, sendo que as três áreas descritas apresentaram vascularização decrescente na ordem apresentada, ou seja, da maior para a menor vascularização observada, respectivamente.

Em outro estudo, avaliando características relacionadas ao momento da fixação embrionária ($15,9 \pm 0,1$ dias pós-ovulação), foi observado aumento na vascularização endometrial na porção caudal dos cornos uterinos entre 4 e 2 dias anteriores a este evento, não havendo efeito de corno uterino (ipsilateral ou contralateral à fixação). Adicionalmente, levando-se em consideração apenas o corno uterino em que ocorreu a fixação, este aumento foi observado entre 4 dias antes e 3 dias após a fixação. No mesmo trabalho, foi relatada a descoberta de um indicador vascular precoce, que indicaria a posição do embrião futuramente. Este indicador foi definido como áreas ou pontos coloridos ao exame com ultrassonografia Doppler, localizados na superfície ventral do endométrio justaposta à parede da vesícula embrionária, ou seja, oposto à região mesometrial. Esta característica foi observada em todas as éguas, em média 0,5 dias após a fixação e cerca de 2,5 dias antes da detecção ultrassonográfica do embrião com presença de batimentos cardíacos (SILVA; GINTHER, 2006).

2.7.1 Vascularização Uterina - Período Pós-Parto

Apesar da grande quantidade de trabalhos realizados em reprodução equina nos últimos anos, uma pequena parcela se destinou ao estudo dos eventos reprodutivos durante o período pós-parto e uma parcela ainda menor tem sido realizada com as ferramentas mais atuais, dentre elas a ultrassonografia Doppler. Portanto, até onde foi observado, pouco tem sido encontrado na literatura a respeito dos eventos vasculares envolvidos com os processos reprodutivos durante o puerpério na espécie equina.

Durante a gestação, tem sido descrito um aumento de 10 a 100 vezes no fluxo sanguíneo destinado ao útero gestante em relação ao fluxo observado em fêmeas não prenhes (OSOL; MANDALA, 2009). Em estudos realizados em outras espécies, uma queda acentuada no fluxo sanguíneo uterino foi observada no primeiro dia após o parto em porcas (FORD; REYNOLDS; FERRELL, 1984), assim como redução de 80,5% no fluxo sanguíneo uterino foi observada em vacas entre o primeiro e segundo dia pós-parto, com uma redução menos acentuada entre o segundo e terceiro dia, atingindo declínios menores nos próximos dois dias (GUILBAULT et al., 1984), sendo tais características atribuídas à grande redução no tamanho uterino devido ao parto, liberação da placenta e involução uterina.

Em estudo mais recente em vacas, o volume de fluxo sanguíneo diminuiu exponencialmente a partir do primeiro dia pós-parto até o 28º dia, não sendo mais observadas alterações após este período. Durante este mesmo período, foi observado aumento gradual nos valores de PI (1,54 até 5,56), atingindo o pico no dia 28, com subsequente diminuição de maneira linear até 86 dias pós-parto. Além disso, não foi observada influência da atividade ovariana em relação ao volume de fluxo sanguíneo, visto que não houve diferenças entre animais apresentando atividade ovariana e animais que não ciclaram durante este período (KRUEGER et al., 2009).

Avaliando-se os aspectos da vascularização antes do parto e nos primeiros dias após o parto em éguas, Mortensen, Kelley e Warren (2011) observaram maior fluxo sanguíneo anteriormente ao parto na artéria uterina do corno gravídico em relação ao corno não gravídico. De forma semelhante aos experimentos realizados em outras espécies, o fluxo sanguíneo uterino diminuiu nos primeiros dias pós-parto, sendo que os valores de PI e RI aumentaram drasticamente no primeiro dia pós-parto em ambas as artérias uterinas, mantendo-se elevados durante a primeira semana pós-parto (final do experimento), assim como houve redução significativa no diâmetro das artérias uterinas do primeiro ao sétimo dia pós-parto. Adicionalmente, foi observado maior fluxo sanguíneo em éguas suplementadas com L-arginina antes e durante os primeiros dias pós-parto. No entanto, em outro estudo (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), não foram observadas diferenças nos valores de RI das artérias uterinas durante os primeiros 30 dias pós-parto, assim como não foram observadas diferenças entre as artérias (corno gravídico e não gravídico) ou entre éguas suplementadas com L-arginina e animais controle.

2.8 VASCULARIZAÇÃO OVARIANA

Em éguas, durante o período de estro, foi observada uma diminuição na resistência vascular em ambas as artérias ovarianas (ipsi e contralateral ao folículo dominante) entre os dias 6 e 1 anteriores à ovulação, assim como uma boa correlação ($r = 0,63$; $P < 0,0001$) foi observada entre os valores de PI de ambas as artérias. Além disso, correlações negativas foram observadas entre o crescimento do folículo dominante e os valores de PI da artéria ovariana ipsilateral ($r = 0,41$; $P < 0,05$) e entre os valores de PI da mesma artéria e os níveis plasmáticos de estrógeno ($r = -0,35$; $P < 0,05$) durante este período (BOLLWEIN et al., 2002a).

Durante o diestro, os valores de PI da artéria ovariana ipsilateral ao corpo lúteo foram menores do que os valores da artéria ovariana contralateral. Em relação aos valores de PI da artéria ipsilateral, altos valores foram observados entre os dias 0 e 2 (dia 0 = ovulação), com subsequente queda até o dia 6, com os valores voltando a aumentar até o dia 15. Já a artéria contralateral apresentou os maiores valores nos dias 2 e 11, assim como o menor valor de PI observado ocorreu no dia 5, assemelhando-se ao padrão observado nas artérias uterinas durante o mesmo período ($r = 0,68$; $P < 0,0001$). Durante este período, não houve associação entre o diâmetro do corpo lúteo com os valores de PI da artéria ipsilateral, porém, foi observada correlação negativa ($r = -0,38$; $P < 0,0001$) entre os valores de PI da mesma artéria e as concentrações plasmáticas de progesterona (BOLLWEIN et al., 2002a).

Avaliando-se somente as características relacionadas ao corpo lúteo (CL), Bollwein et al. (2002b) observaram aumento progressivo no número de pixels (indicando vascularização do CL) até o dia 5 após a ovulação. Após este período, manteve-se até o dia 7, apresentando subsequente queda até o 15º dia aproximadamente. Em relação às concentrações de progesterona, estas se elevaram paralelamente ao número de pixels, atingindo níveis máximos no 7º dia. Já em relação à área do CL, os valores atingiram seu máximo 2 dias após a ovulação, apresentando lento declínio a partir deste momento até os 15 dias aproximadamente. Neste contexto, uma boa correlação foi observada entre a vascularização do CL e as concentrações de progesterona ($r = 0,58$; $P < 0,0001$), porém, em relação à área do CL, uma grande variação entre animais ou entre ciclos foi observada, assim como esta característica apresentou fraca relação com as concentrações de progesterona. Além disso, levando-se em consideração as três características, foram observadas diferenças individuais ou entre ciclos estrais, impossibilitando desta forma a dedução dos níveis plasmáticos de progesterona através das técnicas utilizadas.

Em outro estudo, a porcentagem de vascularização do corpo lúteo aumentou progressivamente entre os dias 1 a 6 pós-ovulação, acompanhada por um aumento progressivo nas concentrações de progesterona. Níveis máximos de progesterona foram observados no dia 8 (completa formação do CL), com o pico de vascularização do CL ocorrendo no dia 10. A área do CL atingiu valores máximos 4 dias pós-ovulação, com declínio gradual a partir deste momento até o término do período pré-luteolítico (14 dias), sendo que as concentrações de progesterona diminuíram paralelamente do seu pico (8 dias), até o início da luteólise. Durante o período pré-luteolítico (10 a 14 dias), a redução na vascularização do CL foi superior à redução nos níveis de progesterona e área do CL. Contudo, durante o período luteolítico (dias 15 a 17; caracterizado pelo declínio de 2 dias nas concentrações de progesterona), o declínio no fluxo sanguíneo do corpo lúteo foi duas vezes maior quando comparado ao período pré-luteolítico, sendo que o mesmo ocorreu em relação à área do CL. No entanto, em relação às concentrações de progesterona, estas apresentaram declínio 6 vezes maior em relação ao período pré-luteolítico (GINTHER et al., 2007a). Portanto, durante o período luteolítico, a redução nas concentrações de progesterona (luteólise funcional) e a redução na área do CL (luteólise morfológica) ocorrem de forma assíncrona, sendo que as concentrações de progesterona atingem níveis mínimos ($< 2,0$ ng/mL) antes do que a área do CL (GINTHER et al., 2005b).

Outros autores avaliaram as características de vascularização dos folículos em relação ao momento do desvio folicular e observaram que um aumento nas velocidades de fluxo (PSV e TAMV) ocorreu no futuro folículo dominante em torno de 2 dias (média de 6 mm de diâmetro) antes que o desvio nos diâmetros foliculares fosse observado. Adicionalmente, um aumento diferencial em relação à área de vascularização foi observado no maior folículo em relação ao folículo subordinado cerca de 1 dia antes que o desvio nos diâmetros ocorresse. Portanto, um aumento diferencial nas características de vascularização ocorre no folículo dominante em relação aos folículos subordinados antes mesmo do processo de divergência nos diâmetros ocorrer (ACOSTA et al., 2004). Neste contexto, um possível fator participante neste processo seria o VEGF, por ser um potente fator angiogênico. Isto porque um aumento nas concentrações deste fator foi observado no folículo dominante em torno de 1 dia após o desvio esperado nos diâmetros foliculares, assim como as concentrações de VEGF aumentaram no folículo subordinado após injeções intrafoliculares de IGF-1 no momento do desvio, ou diminuíram no folículo dominante após injeção de IGFBP (GINTHER et al., 2004c,d).

Em pesquisas iniciais utilizando a ultrassonografia em modo bidimensional (modo-B), um aumento da espessura na região das células da granulosa foi descrito conforme a ovulação

se aproximava (PIERSON; GINTHER, 1985b). Posteriormente, Carnevale (1998) observou que a ecogenicidade e espessura desta região aumentou em torno de 24 horas antes da ovulação. Adicionalmente, foi descrito o aumento na proeminência de uma banda anecóica na periferia do folículo, no período de 3 a 1 dia antes da ovulação (GASTAL; GASTAL; GINTHER, 1998). Em outro experimento foi observado que, tanto a espessura e ecogenicidade da granulosa como os sinais de vascularização na parede do folículo aumentaram durante o período pré-ovulatório (36 a 12 horas antes da ovulação). No entanto, durante o período de ovulação iminente (4 a 1 hora antes da ovulação) foi observado aumento nas características de espessura e ecogenicidade da granulosa, porém, houve redução em relação à porcentagem e proeminência da banda anecóica na circunferência do folículo, assim como redução dos sinais de vascularização foi observada (GASTAL; GASTAL; GINTHER, 2006).

Avaliando as características relacionadas ao fluxo sanguíneo ovariano entre animais que se tornaram prenhes ou não, Silva et al. (2006) observaram diferenças em relação aos grupos entre 0 (tratamento com 2500 UI de hCG IV; folículo dominante entre 34 e 37 mm) e 30 horas (acasalamento), sendo que um aumento na porcentagem da parede folicular com sinais de fluxo sanguíneo, assim como uma redução nos valores de RI e PI foi observada nos animais que se tornaram prenhes em relação ao animais não gestantes. No mesmo estudo, avaliando-se as características do corpo lúteo 7 dias após a ovulação, não foram observadas diferenças significativas entre éguas prenhes e não prenhes em relação à área do CL, porcentagem de vascularização, valores de PI, RI, TAMV e PSV e concentrações plasmáticas de progesterona. Outros pesquisadores também observaram relação entre a maior vascularização do folículo pré-ovulatório e maiores taxas de prenhez, assim como aumento da taxa de recuperação embrionária em éguas que apresentaram maior vascularização do folículo pré-ovulatório (MORTENSEN et al., 2012).

2.8.1 Vascularização Ovariana - Período Pós-Parto

Como exposto anteriormente, pouco foi encontrado na literatura a respeito dos eventos vasculares ocorridos no período pós-parto. Em relação à vascularização ovariana, Kelley, Warren e Mortensen (2013) observaram que a suplementação com L-arginina aumentou a porcentagem ($37,3 \pm 2,6\%$) na circunferência folicular com sinais de vascularização em comparação com animais controle ($25,4 \pm 2,7\%$), contudo, não foi realizado teste de fertilidade.

Tais resultados foram relatados como inferiores aos resultados encontrados em outros experimentos com éguas fora do período pós-parto (aproximadamente 50% de área com vascularização em éguas não prenhes e 75% em éguas prenhes; SILVA et al., 2006). Adicionalmente, não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação, em relação aos valores de PI das artérias ovarianas (ipsi ou contralateral ao folículo dominante), durante os 9 dias precedendo a primeira ovulação pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013).

3 CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VASCULARIZAÇÃO UTERINA DURANTE O PERÍODO PÓS-PARTO EM ÉGUAS

3.1 INTRODUÇÃO

Considerando um período gestacional de 335-340 dias na espécie equina, é necessário que a concepção ocorra em até 25-30 dias pós-parto, para que se consiga a produção de um potro/ano/égua, aumentando assim o retorno econômico dos animais em programas reprodutivos. Adicionalmente, grande parte das éguas presentes em programas de reprodução são éguas no período pós-parto (GINTHER, 1992; CAMILLO et al., 1997), evidenciando a importância dos eventos reprodutivos durante este período na espécie equina.

Após o parto, inicia-se um rápido processo de involução uterina e o restabelecimento do ambiente uterino favorável ao desenvolvimento de um novo conceito (GRIFFIN; GINTHER, 1991a), assim como um período de estro (cio do potro) frequentemente é observado. Durante este período, baixos níveis de estradiol e progesterona são observados, bem como a cérvix encontra-se aberta, sugerindo que este período entre o parto e o início do primeiro estro seja semelhante a um estado de anestro (GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979).

Na tentativa de alterar ou melhorar o processo de involução uterina e taxas de prenhez, alguns procedimentos têm sido descritos. Neste contexto, tem sido proposta a administração de agentes ecbólicos (BLANCHARD et al., 1991; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; KAYA, 2008), utilização de lavagem uterina (BLANCHARD et al., 1989; MCCUE; HUGHES, 1990), aplicação de estradiol em microesferas (ARROTT et al., 1994) e promover um atraso na primeira ovulação através da utilização de esteroides ovarianos (LOY et al., 1975, 1982; MCKINNON et al., 1988; BRUEMMER; BRADY; BLANCHARD, 2002). No entanto, nenhum dos protocolos anteriormente descritos foi capaz de alterar o processo de involução uterina ou melhorar os índices reprodutivos durante o primeiro estro pós-parto. Recentemente, alguns autores sugeriram a suplementação com L-arginina como estratégia eficiente na redução no diâmetro uterino e acúmulo de fluido intrauterino, porém, as taxas de prenhez não foram avaliadas (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013).

Embora os mecanismos e alterações biológicas que ocorrem durante a gestação e o puerpério têm sido relatados, as características de vascularização relacionadas a estes eventos têm sido pouco estudadas (MORTENSEN; KELLEY; WARREN, 2011). Até onde foi

observado, limitadas informações são encontradas a respeito dos eventos vasculares relacionados aos processos reprodutivos durante o puerpério nas espécies domésticas, principalmente durante o período pós-parto em éguas. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar as seguintes características do período pós-parto em éguas: 1) características de tônus uterino e cervical e padrões de morfoecogenicidade (ecotextura) uterina; 2) aspectos do processo de involução uterina e acúmulo de fluido intrauterino; e 3) características de vascularização endometrial e mesometrial.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais

O protocolo experimental e utilização dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas 10 éguas de variadas raças, com peso aproximado de 450 - 550 kg e idades entre 5-15 anos. Os partos ocorreram entre Dezembro de 2011 e Março de 2012 (Hemisfério Sul), onde todos os partos se desenvolveram normalmente com expulsão dos anexos fetais em até 3 horas. Os animais utilizados eram de comportamento dócil, com boa conformação perineal e condição corporal. Durante o experimento, os animais foram mantidos em piquetes de gramínea Coast Cross, sob luz natural, recebendo suplementação de 2 kg de concentrado diariamente, assim como acesso a água e sal mineralizado. Durante todo o período experimental, as éguas foram mantidas com os potros, assim como permaneceram saudáveis e com bom escore de condição corporal. A letra “d” será utilizada durante o texto para representar os dias relativos ao parto (p. ex. d1 = primeiro dia pós-parto), assim como a letra “D” será utilizada para representar os dias relativos à ovulação (p. ex. D0 = dia da ovulação).

3.2.2 Ultrassonografia

Os animais foram examinados por palpação transretal com auxílio de ultrassonografia. Um aparelho de ultrassonografia com modo bidimensional (modo-B) e Doppler-colorido (M5 VET; Mindray Medical International Limited, China) com transdutor linear (52 mm) de 5-8MHz (Modelo 6LE5Vs) foi utilizado. Todos os exames em modo-B foram realizados em frequência de 8MHz. Para os exames em modo Doppler-colorido, o mesmo transdutor foi utilizado, sendo que todos os exames foram realizados com as seguintes configurações: velocidade de detecção de fluxo 4,1 cm/s, ganho 62, IP7, filtro 100Hz, frequência 4,2MHz. Os exames foram realizados diariamente, iniciando no primeiro dia pós-parto (d1) até 16 dias pós-ovulação (D16), sendo realizados entre 15:00 e 18:00 horas. Após a detecção de um folículo > 35 mm, todos os animais foram inseminados em dias alternados (dose mínima de 500 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva) até a ovulação. Para as inseminações, foi utilizado sêmen *in natura* de um único garanhão conhecidamente fértil.

Para a avaliação da involução uterina, foram mensurados os diâmetros (mm) dos dois cornos uterinos, sendo denominados como corno anteriormente gravídico (CG) e corno anteriormente não-gravídico (CNG). O diâmetro de cada corno uterino foi calculado através da média entre largura e altura obtidos no exame ultrassonográfico em modo-B, sendo que as mensurações foram realizadas aproximadamente na porção média de cada corno uterino. De forma semelhante, a quantidade de fluido intrauterino (mm) foi determinada através da média entre largura e altura do local onde o maior acúmulo foi observado em todo o útero. As mensurações foram realizadas com a ferramenta do próprio aparelho de ultrassonografia.

As características de tônus uterino e cervical foram avaliadas diariamente durante todo o período experimental. As avaliações foram realizadas por meio da compressão digital do útero e cérvix (HAYES; GINTHER, 1986) e escores de avaliação foram atribuídos. Os escores variaram de 1 a 4, sendo o escore 1 referente ao útero com tônus máximo (túrgido ou firme) e escore 4 referente ao útero com tônus mínimo (flácido). Quando necessário, escores intermediários (fracionados) foram atribuídos. Para avaliação da morfoecogenicidade (ecotextura) uterina, escores foram atribuídos durante a avaliação ultrassonográfica em tempo real. Os escores de morfoecogenicidade variaram de 1 a 4, sendo atribuídos à quantidade de edema endometrial, ou seja, de mínima a máxima, respectivamente (GINTHER; PIERSON, 1984). Da mesma forma, escores intermediários (fracionados) foram atribuídos quando necessário.

As características de vascularização endometrial foram avaliadas em modo Doppler-colorido, de acordo com os procedimentos descritos por Silva et al. (2005). Durante o exame, o transdutor foi posicionado sobre a porção média de cada corno uterino, gerando a imagem de um corte transversal. A vascularização foi determinada subjetivamente através da atribuição de um escore, de acordo com as áreas coloridas presentes na região endometrial durante um exame de 1 minuto. Devido a movimentos do animal e de vísceras, várias avaliações foram realizadas até que 1 minuto de exames ininterruptos fosse obtido. Os escores atribuídos variaram de 1 a 4, representando nenhuma vascularização, vascularização mínima, intermediária e máxima, respectivamente. Os exames realizados foram gravados no próprio aparelho para posterior análise. Para avaliação das características de vascularização mesometrial, também foram utilizados escores, de acordo com os mesmos procedimentos descritos anteriormente (FERREIRA; GASTAL; GINTHER, 2008). Para fins de análise, tanto para o endométrio como para o mesométrio, estes foram definidos de acordo com a localização, ou seja, pertencente ao corno uterino anteriormente gravídico (CG), assim como pertencente ao corno anteriormente não gravídico (CNG).

3.2.3 Análise Estatística

Os dados foram examinados para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados em logaritmos naturais. Comparações entre os grupos foram analisadas para efeitos principais de grupo (CG e CNG) e dia, assim como para efeito de interação grupo x dia. O procedimento misto (PROC MIXED) do SAS¹ foi utilizado com a função *repeated* para a autocorrelação entre mensurações sequenciais. Quando o efeito de grupo ou interação grupo x dia foi significativo, as diferenças entre grupos foram localizadas através do Teste T de Student. Quando o efeito de dia foi observado, as diferenças entre dias selecionados também foram localizadas através do Teste T de Student. Dados com fator único foram avaliados por ANOVA. A probabilidade de $P \leq 0,05$ indica que houve diferença significativa e probabilidade entre $P > 0,05$ e $\leq 0,1$ indica que a diferença aproximou-se de ser significativa (tendência). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

¹ Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.

3.3 RESULTADOS

A primeira ovulação pós-parto ocorreu em média $12,7 \pm 1,31$ (variando de 8 a 20 dias) e a taxa de prenhez no primeiro estro pós-parto foi de 80% (8/10).

Os dados referentes ao diâmetro dos cornos uterinos, quantidade de fluido intrauterino, morfoecogenicidade e tônus (uterino e cervical) para os dias 1 a 13 pós-parto e para os Dias 0 a 16 após a primeira ovulação pós-parto são apresentados na figura 1. Para todas as características anteriormente citadas, os dados foram analisados separadamente, ou seja, entre os dias 1 e 13 pós-parto e entre 0 e 16 dias pós-ovulação.

3.3.1 Involução Uterina

Os resultados referentes ao diâmetro dos cornos uterinos estão apresentados na figura 1A. Durante o primeiro período analisado (d1-d13), não foi observado efeito de corno uterino (CG e CNG) ou efeito de interação, sendo observado apenas efeito de dia ($P < 0,0001$). Durante os primeiros 7 dias pós-parto, houve drástica redução no diâmetro dos cornos uterinos, sendo que a primeira redução significativa foi observada entre os dias 1 e 3. Após o d7, a taxa de redução no diâmetro uterino apresentou-se menos evidente, quando comparada ao período anterior. Em relação ao período pós-ovulação (D0-D16), foi observado efeito de corno uterino ($P = 0,0018$) e efeito de dia ($P < 0,0001$), não sendo observado efeito de interação. Durante este período, maior diâmetro foi observado para o corno anteriormente gravídico em relação ao corno anteriormente não gravídico, sendo esta diferença significativa do D3 até o final do período experimental (D16). Em relação ao tempo de involução uterina, foi observado que este processo se completou em torno de 21 dias para o CNG e cerca de 24 dias após o parto para o CG, visto que após estes períodos não foram mais observadas reduções significativas no diâmetro dos cornos uterinos.

Figura 1 - Médias ($\pm$ E.P.M.) para o diâmetro uterino (CG e CNG), quantidades de fluido intrauterino, escores de morfoecogenicidade (ecotextura) e tônus (uterino e cervical) durante o período pós-parto em éguas (n = 10).

Notas: Painel A: diâmetro dos cornos uterinos (CG e CNG). Painel B: Quantidade de fluido intrauterino e escores de morfoecogenicidade (ecotextura). Painel C: Escores de tônus uterino e cervical. Probabilidades para efeito de grupo (G), dia (D) ou interação grupo x dia (GD) que foram estatisticamente significativos estão apresentadas. Um asterisco (*) indica diferença estatística ($P < 0,05$) e uma cerquilha (#) indica tendência ($P < 0,1$) entre dias indicados ou entre grupos dentro do dia especificado.

FONTE: (LEMES, 2013).

3.3.2 Fluido Intrauterino e Morfoecogenicidade (Ecotextura)

Durante o primeiro dia pós-parto, não foi observado acúmulo de fluido intrauterino em nenhum animal. No entanto, no d2 foi observado fluido em 9 dos 10 animais, sendo que no terceiro dia todos os animais apresentaram acúmulo de fluido intrauterino. Até o quarto dia pós-parto, as quantidades de fluido permaneceram elevadas, apresentando redução significativa ($P < 0,05$) do d4 ao d7 (Figura 1B). A presença de fluido intrauterino foi observada até o d6 (1/10), d9 (1/10), d10 (3/10), d12 (1/10), d13 (2/10), d14 (1/10) e d16 (1/10), sendo que não foi observada presença de fluido em nenhum animal após o D3. Em relação à morfoecogenicidade, houve aumento nos escores a partir o d6, mantendo-se elevados até o d13. Após a ovulação, uma redução (D0-D2) seguida de aumento (D2-D4) nos escores foram observados. Após o D4, os escores de morfoecogenicidade diminuíram progressivamente até o D12.

3.3.3 Tônus Uterino e Cervical

Durante os primeiros 13 dias pós-parto, apenas uma tendência na diminuição da tonicidade uterina (aumento dos escores) foi observada ($P = 0,0684$), assim como não houve diferença significativa em relação aos escores de tônus cervical ($P = 0,1338$). No entanto, após a ovulação, uma redução ($P < 0,05$) nos escores de tônus uterino foi observada entre o D0 e D3, mantendo baixos valores até o D16. De forma semelhante, os escores de tônus cervical apresentaram diminuição, sendo que a primeira redução significativa ocorreu entre o D0 e D1 ($P < 0,05$) e continuaram a cair até o D5, mantendo a partir deste momento valores reduzidos até o final do experimento (Figura 1C).

3.3.4 Vascularização Uterina

Durante todo o período de avaliação (d1-d13 e D0-D16), não foram observados efeito de corno uterino (CG e CNG) ou efeito de interação para nenhuma das características de vascularização avaliadas, sendo observado apenas efeito de dia ($P < 0,0001$) para as características de vascularização endometrial em ambos os períodos analisados, assim como somente efeito de dia foi observado para as características de vascularização mesometrial do d1-d13 ($P = 0,0033$) ou do D0-D16 ($P = 0,0147$). Os resultados obtidos são apresentados na figura 2. Durante os 13 primeiros dias pós-parto, foi observado aumento na vascularização endometrial do d1 ao d4, sendo o primeiro aumento significativo entre d1 e d2. Após o d4, os escores de vascularização permaneceram semelhantes até o d13. Em relação à vascularização mesometrial, houve aumento de vascularização entre o d1 e d2, com subsequente redução nos escores até o d10. Durante o segundo período avaliado (D0-D16), um aumento na vascularização endometrial foi observado entre os Dias 0 e 5, com redução dos escores do D5 ao D11 e novamente aumento de vascularização do D11 ao D14, permanecendo elevados até o fim do experimento. Em relação aos escores de vascularização mesometrial, foi observada redução do D4 ao D10, com subsequente aumento de vascularização do D10 ao D14, permanecendo em padrão semelhante até o D16.

Figura 2 - Médias ($\pm$ E.P.M.) dos escores de vascularização endometrial e mesometrial do corno anteriormente gravídico (CG) e anteriormente não gravídico (CNG), avaliados em modo Doppler-colorido durante o período pós-parto em éguas (n = 10).

Notas: Probabilidades para efeito de grupo (G), dia (D) ou interação grupo x dia (GD) que foram estatisticamente significativos estão apresentados. Um asterisco (*) indica diferença estatística ($P<0,05$) entre os dias indicados.

FONTE: (LEMES, 2013).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Involução Uterina

O processo de involução uterina se completou em aproximadamente 21 dias para o CNG e 24 dias para o CG, visto que nenhuma redução significativa no diâmetro dos cornos uterinos foi observada após estes períodos. Tais resultados se assemelham aos obtidos por outros autores, onde o processo de involução uterina foi considerado completo em torno de 23 dias

após o parto em éguas (MCKINNON et al., 1988), assim como foi considerado completo em média 22,5 dias pós-parto (variando de 18 a 27 dias) em jumentas (DADARWAL et al., 2004). Uma drástica redução no diâmetro dos cornos uterinos foi observada durante os primeiros 7 dias após o parto, assim como esta redução tornou-se menos acentuada do d8 até o processo completo de involução. Da mesma forma, outros autores observaram uma rápida diminuição no diâmetro uterino durante os primeiros 10 dias pós-parto, com redução nas taxas de involução do d11 até a completa involução (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). No mesmo estudo, foi observado que o corno anteriormente gravídico apresentou diâmetro superior ao corno anteriormente não gravídico em todos os dias do período experimental (d1-d35), porém, no presente estudo estas características foram observadas somente no segundo período avaliado (D3-D16). No entanto, no trabalho de Griffin e Ginther (1991a), os cornos uterinos foram divididos em três partes (cranial, média e caudal) e a média das mensurações foi utilizada para a avaliação dos resultados. No presente estudo, apenas a porção média de cada corno uterino foi mensurada e utilizada para avaliação do processo de involução uterina.

3.4.2 Fluido Intrauterino

A presença de fluido intrauterino foi observada em 90% (9/10) dos animais no d2 e em todos os animais no d3, assim como uma redução significativa nas quantidades de fluido foi observada entre os dias 4 e 7 e apenas uma pequena quantidade (< 10 mm) foi observada após o d9 em todos os animais, sendo estes os mesmos resultados encontrados em outro estudo (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). Este aumento abrupto nas concentrações de fluido intrauterino entre d1 e d2 também foi observado pelos mesmos autores, os quais sugeriram que este fenômeno ocorre devido a um influxo fisiológico associado ao processo de involução uterina, não se tratando de fluido residual da placenta. A presença de fluido intrauterino tem sido descrita em até 9 (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; KAYA, 2008), 10 (BRUEMMER; BRADY; BLANCHARD, 2002), 15 (MCKINNON et al., 1988) ou 16 dias (GRIFFIN; GINTHER, 1991a) pós-parto em éguas ou em até 18 dias pós-parto em jumentas (DADARWAL et al., 2004). De forma semelhante, no presente estudo 50% (5/10) dos animais não apresentou acúmulo de fluido após 10 dias, assim como não foi observado acúmulo de fluido após os 16 dias pós-parto em nenhum animal. Neste mesmo contexto, também não foi observada a

presença de fluido intrauterino em nenhum animal após o D3, o mesmo observado por outros autores (GRIFFIN; GINTHER, 1991a).

Apesar de alguns autores sugerirem a presença de fluido no momento da cobertura como causa de redução nas taxas de prenhez, devido a uma potencial associação com endometrites, atividade espermicida, indução de luteólise precoce ou morte embrionária (ADAMS et al., 1987; MCKINNON et al., 1988), outros autores sugerem a presença de fluido intrauterino como evento fisiológico durante o período pós-parto em éguas, ao invés de estar associado a uma resposta inflamatória ou condição patológica proveniente do parto (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). Adicionalmente, não foi observada relação entre a presença de líquido intrauterino com as dimensões uterinas ou a presença de inflamação (BLANCHARD et al., 1991), assim como a presença de fluido durante o primeiro estro pós-parto não influenciou as taxas de prenhez (MALSCHITZKY et al., 2002).

3.4.3 Morfoecogenicidade (Ecotextura)

Durante o período pós-parto, o início do período de estro tem sido observado em média 6 a 9 dias na maioria dos animais (CALDAS; OLIVEIRA; SILVA, 1994; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKİZ, 2008). Da mesma forma, aproximadamente neste período (7 a 9 dias) tem sido descrito um aumento nos escores de morfoecogenicidade uterina, correspondente ao início do comportamento de estro na maioria dos animais durante o período pós-parto (GINTHER, 1992). Portanto, os resultados observados no presente experimento se assemelham aos encontrados pelos autores anteriormente citados, visto que o aumento nos escores de morfoecogenicidade foi observado a partir do d6. Após a ovulação, uma redução foi observada entre os Dias 0 e 2, seguida por um aumento nos escores até o dia 4. Resultados similares foram observados em outro experimento utilizando éguas no período pós-parto, no qual foi observada redução entre o D0 e D2 e uma estabilização nos escores do D2 ao D5. Adicionalmente, os autores também observaram que neste período inicial pós-ovulação os escores de morfoecogenicidade permaneceram maiores nas éguas pós-parto em relação às éguas cíclicas, sugerindo que este aumento é resultado de um edema residual pós-parto (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). No final do período experimental (D12-D15), uma tendência ($P = 0,057$) de aumento nos escores de morfoecogenicidade foi observado. Esta característica também foi descrita aproximadamente ao D15 em éguas que se tornaram gestantes no primeiro ciclo pós-parto ou

ciclos regulares (GRIFFIN; GINTHER, 1991a,b; GINTHER, 1992) ou em éguas cíclicas não gestantes (GRIFFIN; GINTHER, 1991b; GASTAL et al., 2008). Tal característica é atribuída à exposição ao estrógeno e outros fatores (p.ex. prostaglandina) de origem embrionária ou devido ao desenvolvimento folicular precedendo a próxima ovulação em animais não prenhes.

3.4.4 Tônus Uterino e Cervical

Griffin e Ginther (1991a) observaram uma diminuição gradativa na tonicidade uterina em éguas ao longo do período pós-parto, atingindo níveis mínimos de tonicidade nos dias precedendo a primeira ovulação. No entanto, isto não foi observado no presente experimento, visto que apenas uma tendência ($P = 0,0684$) de aumento nos escores de tônus uterino durante os primeiros 13 dias pós-parto foi observada. Esta discrepância entre os resultados pode ser atribuída à subjetividade na avaliação em relação ao tônus uterino, visto que pode haver diferenças entre avaliadores. Adicionalmente, diferenças em relação à consistência e aspectos de tonicidade uterina foram descritas entre o útero de éguas após o parto e éguas não gestantes, provavelmente devido à grande dilatação e edema encontrados no útero (GRIFFIN; GINTHER, 1991a). No experimento anteriormente citado, foram utilizadas éguas pôneis, no qual ambos os cornos uterinos foram delimitados e palpados completamente já no primeiro dia após o parto. No entanto, alguns autores descreveram que os cornos uterinos não foram completamente palpados até 3 dias após o parto (VANDEPLASSCHE et al., 1983), assim como um aumento na tonicidade e retorno do aspecto tubular uterino foi descrito em éguas PSI durante os primeiros 5 dias pós-parto (SALTIEL et al., 1987). Neste caso, visto que foram utilizadas éguas de raças maiores no presente estudo, as diferenças de avaliação em relação ao tônus uterino também podem ser atribuídas a este aspecto. Após a ovulação, o aumento observado na tonicidade uterina (D0-D3) e manutenção dos escores se assemelham aos padrões descritos durante o início e manutenção da gestação na espécie equina (HAYES; GINTHER, 1986; GRIFFIN; GINTHER, 1991a; CARNEVALE; GINTHER, 1992).

Em relação ao tônus cervical, não foram observadas diferenças significativas ($P = 0,1338$) nos escores durante os 13 dias após o parto. Portanto, a cérvix permaneceu sem tonicidade (escore médio $3,87 \pm 0,02$) durante todo este período, assemelhando-se às características descritas na literatura, ou seja, cérvix aberta associada a baixos níveis hormonais (progesterona e estradiol) até o início do primeiro estro pós-parto (GYGAX; GANJAM;

KENNEY, 1979). Após a ovulação, foi observado aumento na tonicidade da cérvix, sendo o primeiro aumento significativo entre o D1 e D2, continuando até o D5 e manutenção dos escores até o final do período experimental (D16), assemelhando-se aos padrões observados nos escores de tonicidade uterina.

3.4.5 Vascularização Uterina

Não foram observados efeito de corno uterino ou efeito de interação em relação às características de vascularização endometrial e mesometrial durante todo o período experimental. De forma semelhante, em um estudo realizado com éguas, não foram observadas diferenças entre os valores de RI das artérias uterinas (CG ou CNG), assim como não houve diferenças significativas entre os valores de RI durante os primeiros 30 dias pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013). No entanto, em outro experimento utilizando éguas no período pós-parto, foram observadas diferenças em relação às características de fluxo sanguíneo entre as artérias uterinas (CG e CNG), assim como uma redução no fluxo sanguíneo uterino (aumento nos valores de PI e RI) foi observada durante os 7 primeiros dias pós-parto (MORTENSEN; KELLEY; WARREN, 2011). Apesar de ambos os trabalhos utilizarem os índices Doppler (RI e/ou PI) para a avaliação das características de vascularização, as possíveis explicações para a discrepância entre os resultados não foram encontradas. Trabalhando com vacas no período pós-parto, Krueger et al. (2009) também observaram diminuição na vascularização uterina (diminuição do volume de fluxo sanguíneo e aumento nos valores de PI), sendo que isto foi observado até os 28 dias após o parto. Neste contexto, no presente estudo, o aumento de vascularização endometrial (d1 ao d4) e mesometrial (d1 a d2) difere dos resultados obtidos pelos trabalhos anteriormente citados. No entanto, neste estudo as avaliações foram realizadas utilizando o exame em modo Doppler colorido, o qual avalia as características de fluxo sanguíneo diretamente no local de escolha e não somente em um ponto ou vaso específico (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007).

Em vacas, a redução na quantidade de fluxo sanguíneo uterino tem sido atribuída à grande redução no tamanho uterino devido ao parto e liberação dos anexos fetais, sendo esta redução observada de forma mais pronunciada durante os primeiros 7 dias após o parto (FORD; REYNOLDS; FERRELL, 1984; GUILBAULT et al., 1984; KRUEGER et al., 2009). De forma semelhante, redução no fluxo sanguíneo (aumento nos valores de PI e RI) foi observada em

éguas imediatamente após o parto (d1) em relação ao dia anterior ao parto, assim como durante a primeira semana pós-parto (MORTENSEN; KELLEY; WARREN, 2011). No entanto, durante o processo de involução uterina, uma série de fatores (redução do tamanho uterino, remoção de debris, contração glandular, apoptose e proliferação celular) são fundamentais, pois levam à alteração da superfície endometrial e retorno ao seu estado pré-gestacional, gerando um ambiente favorável ao desenvolvimento e estabelecimento de uma nova gestação (TAKAMOTO; LEPPERT; YU, 1998; SALAMONSEN, 2003; STANTON, 2011). Portanto, a absorção das microcarúnculas e sobreposição do epitélio luminal estão completas entre os dias 4 a 7 pós-parto, com o retorno do endométrio ao seu estado histológico pré-gestacional em até 10 (STEVEN et al., 1979; GOMEZ-CUETARA et al., 1995) ou 14 dias após o parto (GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979; BAILEY; BRISTOL, 1983), sendo tais características uma possível explicação para o aumento e manutenção nos escores de vascularização endometrial observados durante os primeiros 13 dias após o parto. Contudo, mais estudos a respeito dos eventos vasculares durante o puerpério na espécie equina são necessários.

Em relação à vascularização mesometrial, uma diminuição nos escores foi observada durante os primeiros dias pós-parto (d2-d10). Como mencionado, a avaliação das características de vascularização foi realizada estimando-se a quantidade e tamanho dos pontos ou áreas coloridas em uma determinada área, atribuindo um escore a esta avaliação (GINTHER; UTT, 2004). Para isso, a vascularização mesometrial foi avaliada na área localizada acima da superfície dos cornos uterinos, representada pela imagem de um plexo vascular adjacente ao corno uterino na imagem ultrassonográfica (SILVA; GINTHER, 2006). Em outro experimento, Mortensen, Kelley e Warren (2011) observaram diminuição no diâmetro de ambas as artérias uterinas (CG e CNG) imediatamente após o parto, assim como durante os primeiros 7 dias pós-parto. Portanto, visto que o mesométrio é composto por uma rede vascular, esta diminuição no diâmetro vascular durante o início do período pós-parto pode justificar a redução nos escores de vascularização mesometrial observada.

Durante o segundo período avaliado (D0-D16), um aumento na vascularização endometrial foi observado do D0 ao D5, seguido por uma diminuição do D5 ao D11. Estes resultados correspondem ao resultados encontrados em outros trabalhos realizados durante o diestro em éguas cíclicas, visto que uma diminuição nos valores de RI ou PI das artérias uterinas foi observada até 5 dias pós-ovulação, assim como aumento nestes valores foi observado do D5 até o D10 ou D11 (BOLLWEIN et al., 1998; BOLLWEIN et al., 2002a). Após o D11, novo aumento de vascularização endometrial foi observado (D15). Levando-se em consideração que 80% (8/10) dos animais tornaram-se gestantes no presente experimento, estes resultados

também se assemelham aos encontrados por outros autores, visto que um aumento de vascularização (altos valores de TAMV e baixos valores de RI) foi observado em animais gestantes após o D11 (BOLLWEIN; MAYER; STOLLA, 2003). Da mesma forma, em animais que tornaram-se gestantes, Silva et al. (2005) observaram aumento nos escores de vascularização endometrial a partir dos 12 dias após a ovulação, assim como aumento na vascularização uterina (aumento nos valores de TAMV e redução nos valores de PI) a partir do D10. As características de vascularização mesometrial observadas no presente experimento se assemelham aos padrões de vascularização endometrial, visto que somente o aumento de vascularização até o Dia 5 não foi observado no mesométrio. No entanto, redução nos escores foram observados do D4 ao D10, com subsequente aumento do D10 ao D14 e manutenção dos escores até o fim do experimento (D16), semelhantes aos padrões de vascularização endometrial descritos anteriormente.

3.5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de involução uterina se completou em torno de 21 dias para o CNG e 24 dias para o CG, assim como nenhum animal apresentou acúmulo de fluido intrauterino depois de 16 dias pós-parto ou 3 dias após a primeira ovulação pós-parto. Durante os primeiros 13 dias pós-parto, os resultados observados neste experimento em relação às características de vascularização se diferenciam dos resultados encontrados na literatura. No entanto, poucas informações ainda são encontradas a respeito dos eventos vasculares durante o puerpério nas espécies domésticas, principalmente em equinos, sugerindo a necessidade de mais pesquisas a respeito dos eventos ocorridos durante este período. Após a primeira ovulação pós-parto, o padrão de vascularização observado neste experimento assemelha-se ao padrão descrito durante o ciclo estral e início da gestação na espécie equina, possivelmente refletindo um retorno do útero às suas características pré-gestacionais.

4 CAPÍTULO 2 - DINÂMICA E VASCULARIZAÇÃO OVARIANA DURANTE O PRIMEIRO CICLO ESTRAL PÓS-PARTO EM ÉGUAS

4.1 INTRODUÇÃO

As éguas são as únicas fêmeas entre os grandes animais domésticos que, dentro de um curto período entre o parto e a ovulação (em média 9 dias), são capazes de conceber e manter uma nova gestação neste período (GINTHER, 1992). No entanto, levando-se em consideração uma gestação entre 335-340 dias, é necessário que a concepção ocorra no início do período pós-parto, visto que um maior intervalo (parto-concepção) pode resultar em atraso gradual nas datas de parto dos anos subsequentes, ou eventualmente um ano sem a produção de um potro (BLANCHARD et al., 2012). Portanto, para se melhorar o retorno econômico em sistemas de criação, os eventos do puerpério na espécie equina são essenciais para que se mantenha um intervalo entre partos de 12 meses.

O período pós-parto é caracterizado pelo rápido processo de involução uterina, acompanhado de um período de estro (cio do potro), normalmente fértil na maioria das éguas (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1975; GYGAX; GANJAM; KENNEY, 1979). Este período de estro se inicia em 5 a 12 dias, com a primeira ovulação ocorrendo em até 20 dias após o parto (LOY, 1980; GINTHER, 1992). Apesar deste primeiro estro ser reconhecidamente fértil (NETT; HOLTAN; ESTERGREEN, 1975; GINTHER, 1992), controvérsias existem em relação à fertilidade neste período. Geralmente, menores taxas de prenhez são descritas em éguas acasaladas no cio do potro em relação aos ciclos subsequentes (LOY, 1980; GINTHER, 1992), porém taxas de prenhez similares têm sido observadas em relação aos diferentes ciclos pós-parto (MALSCHITZKY et al., 2002) ou entre o primeiro estro pós-parto e éguas não gestantes (GRIFFIN; GINTHER, 1991a; CAMILLO et al., 1997). Adicionalmente, maior risco de perdas embrionárias (MERKT; GÜNZEL, 1979; GINTHER, 1992) ou menores taxas de recuperação embrionária (HUHTINEN; REILAS; KATILA, 1996) têm sido atribuídas ao primeiro estro pós-parto. Neste contexto, a redução nos índices reprodutivos durante o período pós-parto tem sido atribuída a um incompleto processo de involução uterina, principalmente em relação ao endométrio (GINTHER, 1992). Dessa forma, alguns autores relatam menores taxas de prenhez em éguas que ovulam antes dos 10 dias (LOY, 1980), assim como menores

taxas de prenhez ou maiores chances de perdas gestacionais têm sido atribuídas a éguas acasaladas antes dos 22 ou 13 dias pós-parto, respectivamente (BLANCHARD et al., 2012).

Durante o início do puerpério, o diâmetro do maior folículo foi observado em torno de 13 a 16 mm no primeiro dia pós-parto (GINTHER; BAUCUS; BERGFELT, 1994; GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008), atingindo o diâmetro médio de $36,4 \pm 1,09$ mm em torno do 8º dia (GÜNDÜZ; KAŞIKCI; EKIZ, 2008). Recentemente, foram descritos cerca de 2 a 6 folículos entre 6-10 mm, assim como 2 a 4 folículos entre 11-15 mm durante o primeiro estro pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013). No entanto, limitadas informações a respeito dos processos de seleção e desenvolvimento folicular têm sido encontradas em relação ao primeiro ciclo pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), assim como poucas informações a respeito dos eventos vasculares relacionados a este período têm sido descritos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características de dinâmica folicular e aspectos de vascularização ovariana em éguas no período pós-parto, buscando avaliar as diferenças entre animais que apresentam estro e ovulação precoce (< 10 dias) em relação aos animais que apresentam ovulação tardia (> 10 dias). Adicionalmente, foram avaliadas também as características de fluxo sanguíneo e área do corpo lúteo (CL), assim como os níveis séricos de progesterona durante os 16 dias após a primeira ovulação pós-parto.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Animais

O protocolo experimental e utilização dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas 10 éguas de variadas raças, com peso aproximado de 450 – 550 kg e idades entre 5-15 anos. Os partos ocorreram entre Dezembro de 2011 e Março de 2012 (Hemisfério Sul), transcorreram normalmente com expulsão dos anexos fetais em até 3 horas. Os animais utilizados eram de comportamento dócil, com boa conformação perineal e condição corporal. Durante o experimento, os animais foram mantidos em piquetes de gramínea Coast Cross, sob luz natural, recebendo suplementação de 2 kg de concentrado diariamente, assim como acesso a água e sal mineralizado. Durante todo o período experimental, as éguas foram

mantidas com os potros, assim como permaneceram saudáveis e com bom escore de condição corporal. A letra “d” será utilizada durante o texto para representar os dias relativos ao parto (p. ex. d1 = primeiro dia pós-parto), assim como a letra “D” será utilizada para representar os dias relativos à ovulação (p. ex. D0 = dia da ovulação).

4.2.2 Ultrassonografia

Os exames foram realizados diariamente por palpação transretal com auxílio de ultrassonografia. Um aparelho de ultrassonografia com modo bidimensional (modo-B) e Doppler-colorido (M5 VET; Mindray Medical International Limited, China) com transdutor linear (52 mm) multifrequencial (5 a 8 MHz; Modelo 6LE5Vs) foi utilizado. As avaliações iniciaram no primeiro dia pós-parto (d1) e se estenderam até 16 dias após a primeira ovulação (D16), sendo os exames realizados entre 15:00 e 18:00 horas. Todos os exames em modo-B foram realizados em frequência de 8MHz. Para os exames em modo Doppler-colorido, o mesmo transdutor foi utilizado, sendo que todos os exames foram realizados com as seguintes configurações: velocidade de detecção de fluxo 4,1 cm/s, ganho 62, IP7, filtro 100Hz, frequência 4,2MHz. Após a detecção de um folículo > 35 mm, todos os animais foram inseminados em dias alternados (dose mínima de 500 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva), até a ovulação. Para as inseminações, foi utilizado sêmen *in natura* de um único garanhão conhecidamente fértil.

Para avaliação da dinâmica folicular, foram utilizados procedimentos semelhantes aos descritos por Ginther et al. (2008). O diâmetro dos seis maiores folículos foi avaliado mantendo-se a identidade folicular ao longo dos dias e foram identificados como F1 (maior folículo) a F6. Para isso, o diâmetro (mm) foi determinado através da média entre altura e largura, em uma única imagem, da maior área observada ao exame ultrassonográfico em modo-B. Adicionalmente, o número de folículos foi agrupado em classes de acordo com o diâmetro observado, resultando nas classes de < 6; 6,1-10; 10,1-15; 15,1-20; 20,1-25 e > 25 mm. O diâmetro de cada folículo individual e o número de folículos em cada classe foram avaliados durante todo o período pós-parto até a primeira ovulação. A taxa de crescimento do maior folículo (F1) foi avaliada entre 7 e 2 dias antecedendo a ovulação, devido à redução nas taxas de crescimento a partir de 2 dias antecedendo a ovulação (JACOB et al., 2009a). Além disso, também foram avaliados o diâmetro do maior folículo ao seu máximo e 1 dia antes da ovulação,

o intervalo entre o máximo diâmetro e a ovulação e a taxa de crescimento no período pré-ovulatório.

Para a utilização do método de identidade folicular, cada folículo selecionado foi observado diariamente. Para isto, as estruturas ovarianas (p.ex., folículos, corpo lúteo), superfície e polos do ovário, assim como a localização dentro do estroma ovariano foram utilizadas como guias para localização e identificação dos folículos individualmente (GINTHER et al., 2004b). O dia do desvio folicular foi definido como o dia anterior ao exame em que a maior diferença de diâmetro entre os dois maiores folículos foi observada (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013). Para ciclos com 1 folículo dominante, o desvio foi determinado através da comparação entre o perfil de crescimento entre F1 e F2. Em ciclos com 2 folículos dominantes, o desvio foi avaliado através da comparação entre a média do perfil de crescimento entre F1 e F2 com o perfil do F3 (JACOB et al., 2009b). Ciclos com dois folículos dominantes foram admitidos quando 2 folículos atingiram diâmetro superior a 28 mm (GINTHER et al., 2004b).

As características de vascularização folicular foram determinadas de acordo com a área de vascularização presente na parede folicular, através do exame com ultrassonografia Doppler em modo Doppler-colorido (GINTHER; UTT, 2004). O fluxo sanguíneo foi avaliado no maior folículo (F1), identificado retrospectivamente, durante os 7 dias antecedendo a ovulação. As características de vascularização foram avaliadas na parede folicular, através da estimativa da porcentagem da parede folicular com sinais de fluxo. Durante os exames, o transdutor foi colocado sob vários ângulos, levando-se em consideração a parede do folículo como um todo. Portanto, o termo circunferência refere-se ao folículo como um todo, ou seja, a parede folicular de forma tridimensional.

Durante o mesmo período, a avaliação da vascularização do pedículo ovariano ipsilateral também foi realizada, utilizando o modo Doppler-colorido. Durante o exame, o transdutor foi posicionado sobre o plexo vascular adjacente ao ovário. A vascularização foi determinada subjetivamente através da atribuição de um escore, de acordo com as áreas coloridas presentes na região do pedículo ovariano durante um exame de 1 minuto. Os escores atribuídos variaram de 1 a 4, representando vascularização mínima a máxima, respectivamente.

Os exames para avaliação do corpo lúteo (CL) iniciaram no dia da ovulação (D0) e se estenderam até o D16. Para determinação da área do CL, uma imagem de um corte transversal com a maior área aparente foi selecionada para obtenção da altura (mm) e largura (mm). Posteriormente, a área do CL foi estimada através da fórmula: $A \text{ (cm}^2\text{)} = ((0,5 \times \text{Altura}) \times (0,5 \times \text{Largura}) \times \pi) / 100$, de acordo com Bollwein et al. (2002b). Para as características de

vascularização, os exames foram realizados em modo Doppler-colorido, de acordo com os procedimentos descritos por Ginther et al. (2007), sendo todos os exames realizados com o mesmo *setup* descrito anteriormente. A porcentagem de vascularização do CL foi estimada de acordo com as áreas apresentando sinais de fluxo durante o escaneamento do corpo lúteo como um todo. Os exames foram gravados no próprio aparelho para posterior análise. Após cada exame, amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular para análise das concentrações séricas de progesterona (P4). Após a coleta, as amostras foram mantidas refrigeradas (5°C) até a centrifugação (382xg por 10 minutos). As amostras de soro foram então separadas e armazenadas (-20°C) até o momento da análise.

4.2.3 Análise Estatística

Os dados foram examinados para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados em logaritmos naturais. Comparações entre os grupos foram analisadas para efeitos principais de grupo (precoce e tardia) e dia, assim como para efeito de interação grupo x dia. O procedimento misto (PROC MIXED) do SAS² foi utilizado com a função *repeated* para a autocorrelação entre mensurações sequenciais. Quando o efeito de grupo ou interação grupo x dia foi significativo, as diferenças entre grupos foram localizadas através do Teste T de Student. Quando o efeito de dia foi observado, as diferenças entre dias selecionados também foram localizadas através do Teste T de Student. Dados com fator único foram avaliados por ANOVA. A probabilidade de $P \leq 0,05$ indica que houve diferença significativa, e probabilidade entre $P > 0,05$ e $\leq 0,1$ indica que a diferença aproximou-se de ser significativa (tendência). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

² Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Dinâmica Folicular

Como citado anteriormente, a dinâmica folicular foi avaliada buscando diferenças entre os grupos de ovulação precoce (< 10 dias) e tardia (> 10 dias). Neste caso, o intervalo entre o parto e a primeira ovulação foi de $8,0 \pm 0,00$ dias para o grupo precoce (3 animais) e $14,71 \pm 1,19$ (variando de 11 a 20 dias) para o grupo tardia (7 animais). Dentro do total de animais, somente 1 égua (1/10; 10%) apresentou dupla ovulação. Considerando os tempos de ovulação de cada grupo, os dados foram analisados entre os 7 primeiros dias pós-parto (d1-d7) ou entre os 7 dias anteriores à primeira ovulação pós-parto (D-1 ao D-7), visto que estes dois períodos são comuns aos dois grupos avaliados. Não houve diferença ($P = 0,4667$) em relação às taxas de prenhez entre os grupos precoce (3/3; 100%) e tardia (5/7; 71,43%). Portanto, a taxa de prenhez geral no primeiro estro pós-parto foi de 80% (8/10).

O perfil de desenvolvimento folicular dos seis maiores folículos (F1-F6), determinados diariamente através de identidade folicular, está apresentado na figura 3. Considerando o perfil de desenvolvimento folicular normalizado para o dia da primeira ovulação pós-parto, nota-se um padrão semelhante para ambos os grupos. No entanto, utilizando os dados normalizados para o período pós-parto inicial (d1-d7), o padrão de desenvolvimento torna-se diferente entre os grupos. Neste sentido, a avaliação do perfil de desenvolvimento entre os dois maiores folículos (F1 e F2) foi realizada durante os dois períodos supracitados (Figura 4). Em relação aos dados normalizados para os dias relativos à primeira ovulação pós-parto, não foi observado efeito de grupo ou efeito de interação para diâmetro do F1 ou F2, sendo observado somente efeito de dia ($P < 0,0001$) para ambas as características (Figura 4B). No entanto, quando os dados foram normalizados para o início do período pós-parto, um efeito de grupo ($P < 0,0008$), interação ($P < 0,0001$) e dia ($P < 0,0001$) foram observados em relação ao perfil de desenvolvimento do F1. Neste contexto, o diâmetro do F1 no grupo precoce foi significativamente maior em todos os dias durante o período pós-parto inicial (d1-d7; Figura 4A). Em relação as características do F2 no mesmo período, não foi observado efeito de grupo ou efeito de dia, sendo somente observado um efeito de interação ($P < 0,0001$), devido ao maior diâmetro do F2 do grupo precoce no primeiro dia pós-parto ($P = 0,05$).

Figura 3 - Médias ($\pm$ E.P.M.) dos diâmetros dos seis maiores folículos, determinados diariamente através de identidade folicular, durante os 7 primeiros dias pós-parto ou durante os 7 dias precedendo a primeira ovulação pós-parto, caracterizando o perfil de desenvolvimento folicular para as éguas do grupo precoce e tardia.

Considerando o diâmetro dos dois maiores folículos (F1 e F2) normalizados para o dia da primeira ovulação pós-parto, foi observado diâmetro médio do F1 de $28,28 \pm 1,78$ mm no Dia -7 e $44,69 \pm 0,63$ mm no dia anterior à ovulação (D -1), assim como diâmetro médio do F2 de $22,48 \pm 0,63$ mm e $17,09 \pm 1,53$ mm nos Dias -7 e -1, respectivamente.

Em relação ao grupo tardia, o intervalo médio observado entre o parto e o momento do desvio folicular foi de $6,29 \pm 1,27$ (variando entre 3 e 13 dias), assim como o intervalo médio entre o desvio e a ovulação foi de $7,43 \pm 0,65$ dias. Adicionalmente, o diâmetro médio do F1 no momento do desvio foi de $23,48 \pm 0,73$ mm. No entanto, observando-se o perfil de desenvolvimento folicular no grupo precoce, nota-se que o desvio folicular aconteceu antes do início do período experimental, ou seja, o momento da divergência ocorreu anteriormente ao parto, não sendo observado durante o período de avaliação.

Os resultados de dinâmica folicular, levando-se em consideração o número de folículos agrupados por classes, assim como as características do folículo pré-ovulatório, estão

apresentados na tabela 1. Da mesma forma, como citado anteriormente, o número de folículos foi avaliado durante os dois períodos comuns aos dois grupos, ou seja, durante os 7 primeiros dias pós-parto ou em relação aos 7 dias precedendo a primeira ovulação pós-parto. Não foram observados efeitos de grupo ou interação em quase todas as classes ou períodos avaliados. Apenas um efeito de grupo foi observado na classe de folículos de 20-25 mm durante o período pós-parto inicial ($P = 0,0208$), assim como um efeito de grupo foi observado na classe > 25 mm durante o mesmo período ($P = 0,0445$; Figura 5). Tais diferenças ocorreram devido ao maior número de folículos de 20-25 mm no grupo tardia a partir do d4 (Figura 5A), assim como um maior número de folículos > 25 mm no grupo precoce durante os 3 primeiros dias pós-parto (Figura 5B).

Em relação às características do folículo pré-ovulatório, não foram observadas diferenças entre os grupos para nenhuma das características observadas, ou seja, diâmetro máximo, diâmetro no dia anterior à ovulação, máximo diâmetro até a ovulação, taxa de crescimento do D -7 ao D -2 e taxa de crescimento do D -2 até a ovulação (Tabela 1). Apenas foi observada diferença entre a taxa de crescimento do D -7 ao D -2 em relação à taxa de crescimento do D -2 até a ovulação, visto que a primeira taxa ($2,69 \pm 0,23$ mm/dia) foi superior à segunda ($0,28 \pm 0,53$ mm/dia; $P = 0,0005$).

Figura 4 - Médias ($\pm$ E.P.M.) dos diâmetros para os dois maiores folículos (F1 e F2), avaliados durante os primeiros dias pós-parto ou em relação aos 7 dias antecedendo a primeira ovulação pós-parto.

Notas: Paineis A e B: Comparações entre F1 e F2 realizadas durante os 7 primeiros dias pós-parto (d1 ao d7). Um asterisco (*) indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos para o diâmetro do F1 nos dias especificados. A cerquilha (#) indica um maior diâmetro ($P = 0,05$) do F2 no grupo precoce (d1). Paineis C e D: Comparações entre F1 e F2 realizadas durante os 7 dias antecedendo a primeira ovulação pós-parto (D -1 ao D -7). Probabilidades para efeito de grupo (G), dia (D) ou interação grupo x dia (GD) que foram estatisticamente significativos estão apresentadas.

FONTE: (LEMES, 2013)

Figura 5 - Médias ($\pm$ E.P.M.) do número de folículos agrupados por classes, referentes às comparações realizadas entre os grupos durante o primeiro período avaliado (d1 ao d7).

Notas: Paineis A e B: Dados relativos ao número de folículos na classe de 20-25 mm. Paineis C e D: Dados relativos ao número de folículos na classe > 25 mm. Probabilidades para efeito de grupo (G), dia (D) ou interação grupo x dia (GD) que foram estatisticamente significativos estão apresentadas. Um asterisco (*) indica diferença estatística ($P < 0,05$) e uma cerquilha (#) indica tendência ($P < 0,1$) entre os grupos nos dias indicados.

FONTE: (LEMES, 2013).

Tabela 1 - Médias ($\pm$ E.P.M.) para o número de folículos agrupados por classes e características de desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, relativos às comparações entre os grupos (precoce e tardia).

Parâmetro	Grupo		Geral
	Precoce	Tardia	
Nº Animais	3	7	10
Intervalo Parto-Ovulação	8,0 $\pm$ 0,0	14,71 $\pm$ 1,19	12,7 $\pm$ 1,31
Nº Folículos por dia ¹			
< 6 mm	21,43 $\pm$ 2,38	24,86 $\pm$ 1,34	23,83 $\pm$ 1,19
6,1 - 10 mm	6,52 $\pm$ 0,58	5,35 $\pm$ 0,63	5,7 $\pm$ 0,47
10,1 - 15 mm	6,57 $\pm$ 0,96	5,43 $\pm$ 0,66	5,77 $\pm$ 0,54
15,1 - 20 mm	5,19 $\pm$ 0,74	3,08 $\pm$ 0,34	3,71 $\pm$ 0,34
20,1 - 25 mm	0,95 $\pm$ 0,16 ^b	1,71 $\pm$ 0,18 ^a	1,48 $\pm$ 0,14
> 25 mm	1,09 $\pm$ 0,06 ^c	0,43 $\pm$ 0,1 ^d	0,63 $\pm$ 0,08
Nº Folículos por dia ²			
< 6 mm	21,43 $\pm$ 2,38	26,67 $\pm$ 1,52	25,07 $\pm$ 1,31
6,1 - 10 mm	6,52 $\pm$ 0,57	6,62 $\pm$ 0,59	6,59 $\pm$ 0,44
10,1 - 15 mm	6,57 $\pm$ 0,96	5,54 $\pm$ 0,56	5,85 $\pm$ 0,49
15,1 - 20 mm	5,19 $\pm$ 0,74	2,87 $\pm$ 0,32	3,58 $\pm$ 0,34
20,1 - 25 mm	0,95 $\pm$ 0,16	0,77 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,10
> 25 mm	1,09 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,05
Folículo Pré-Ovulatório			
Diâmetro Máximo (mm)	44,25 $\pm$ 1,80	45,56 $\pm$ 0,86	45,2 $\pm$ 0,77
Diâmetro no Dia -1	44,22 $\pm$ 1,83	44,87 $\pm$ 0,64	44,69 $\pm$ 0,63
Máximo diâmetro até ovulação (dias)	1,33 $\pm$ 0,33	1,37 $\pm$ 0,18	1,36 $\pm$ 0,15
Taxa de crescimento (mm/dia)			
Dias -7 a -2	2,44 $\pm$ 0,49	2,78 $\pm$ 0,27	2,69 $\pm$ 0,23 ^A
Dias -2 a -1	0,82 $\pm$ 0,47	0,08 $\pm$ 0,72	0,28 $\pm$ 0,53 ^B

Notas: ¹ Número de folículos (classes) referente ao primeiro período avaliado (d1 ao d7).² Número de folículos (classes) referente ao segundo período avaliado (D-7 ao D-1).^{a,b,c,d} Linhas com letras sobresscritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).^{A,B} Colunas com letras sobresscritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

FONTE: (LEMES,2013)

4.3.2 Vascularização Folicular e Ovariana

Na figura 6 estão apresentados os dados de diâmetro (mm) e vascularização (F1 e pedículo ovariano ipsilateral), relativos às comparações entre os dois grupos. Não foram observados efeito de grupo ou efeito de interação para nenhuma das características supracitadas, sendo apenas observado efeito de dia para o diâmetro do F1 ($P < 0,0001$), vascularização (%) folicular ($P = 0,0003$) e uma tendência no efeito de dia para os escores de vascularização do pedículo ovariano ipsilateral ($P = 0,0631$). Em geral, a vascularização média do F1 foi de $34,53 \pm 1,39\%$.

4.3.3 Área e Vascularização do Corpo Lúteo (CL) e Produção de Progesterona (P4)

Não foram observados efeitos de grupo ou efeito de interação para as características de área (cm²) ou vascularização (%) do CL ou para os níveis séricos de progesterona (ng/mL), sendo observado somente efeito de dia ($P < 0,0001$) para todas as características. Neste caso, as médias de todos os animais foram utilizadas em conjunto e os dados estão apresentados na figura 7.

Em relação à área do CL, foi observado aumento entre o D0 e D1, atingindo níveis máximos no D2. A partir do D2, esta característica apresentou decréscimo gradativo até o final do período experimental, sendo o primeiro decréscimo significativo entre o D2 e D6. A porcentagem de vascularização do CL apresentou aumento gradativo a partir do D1 e atingiu altos níveis no D8, mantendo tais características até o final do período experimental. De forma semelhante, as concentrações de progesterona apresentaram aumento gradual a partir do D0, atingindo altas concentrações no D6. As concentrações permaneceram elevadas até o D12, sendo que houve redução nas concentrações deste hormônio no D16 em relação ao D12.

Figura 6 - Médias ($\pm$ E.P.M.) para as características de diâmetro e vascularização do folículo pré-ovulatório (F1) e vascularização do pedículo ovariano ipsilateral, relativos às comparações entre os dois grupos durante os 7 dias antecedendo a primeira ovulação pós-parto.

Notas: Painel A: Diâmetro do folículo dominante (F1). Painel B: Vascularização do folículo dominante (F1). Painel C: Escores de vascularização do pedículo ovariano ipsilateral. Probabilidades para efeito de grupo (G), dia (D) ou interação grupo x dia (GD) que foram estatisticamente significativos ou que houve tendência estatística estão apresentados.

FONTE: (LEMES, 2013)

Figura 7 - Médias ($\pm$ E.P.M.) para as características de área e vascularização do corpo lúteo (CL) e concentrações séricas de progesterona (P4), durante os 16 dias após a primeira ovulação pós-parto.

Notas: Um asterisco (*) indica o primeiro aumento ou diminuição significativo ($P < 0,05$) nas características avaliadas. Uma caixa (□) em um ponto específico indica o dia em que máximos valores foram observados. Para todas as características apresentadas, um efeito de dia ($P < 0,0001$) foi observado.

FONTE: (LEMES, 2013).

4.4 DISCUSSÃO

Embora haja controvérsias a respeito da utilização do primeiro estro pós-parto em programas reprodutivos, visto que uma redução nas taxas de prenhez é descrita por alguns autores (LOY, 1980; KOSKINEN; KATILA 1987; KATILA; KOSKINEN; OIJALA, 1988; GINTHER, 1992), no presente experimento a taxa de prenhez foi relativamente alta (80%) no primeiro ciclo pós-parto. De forma semelhante, altas taxas de prenhez (81 a 89%) foram obtidas por outros pesquisadores utilizando o primeiro estro pós-parto (BRUEMMER; BRADY; BLANCHARD, 2002). Portanto, apesar do pequeno número de animais utilizados, os resultados de fertilidade obtidos no presente experimento demonstram que bons índices de prenhez podem ser obtidos quando o primeiro estro pós parto é utilizado.

4.4.1 Dinâmica Folicular

Não foram observadas diferenças entre o perfil de desenvolvimento folicular do F1 e F2 entre os grupos estudados, quando considerados os dados normalizados para a primeira ovulação pós-parto. Neste contexto, os resultados observados em relação ao diâmetro médio do F1 foi de $28,28 \pm 1,78$ mm e $44,69 \pm 0,63$ mm e para o F2 foram de $22,48 \pm 0,63$ mm e $17,09 \pm 1,53$ mm para os Dias -7 e -1, respectivamente. Tais resultados se assemelham aos observados durante o ciclo estral em animais não prenhes, onde foram observados diâmetros médios de $28,5 \pm 0,8$ mm e $45,2 \pm 0,8$ mm para o F1 ou $23,7 \pm 0,6$ mm e $19,6 \pm 0,5$ mm para o F2, sendo tais valores referentes aos Dias -7 e -1, respectivamente (PIERSON; GINTHER, 1987). Da mesma forma, considerando apenas o grupo de ovulação tardia, o intervalo médio entre o desvio e a ovulação foi de $7,43 \pm 0,65$ dias, assim como o diâmetro médio do F1 no momento do desvio foi de $23,48 \pm 0,73$ mm. Tais resultados se assemelham aos observados em animais fora do período pós-parto, visto que o intervalo médio observado entre desvio e ovulação foi de $7,0 \pm 0,2$ dias (GASTAL et al., 1997) ou $7,3 \pm 0,2$ dias (JACOB et al., 2009a), assim como o diâmetro médio do F1 foi de $22,4 \pm 0,7$ mm (GASTAL et al., 1997) ou $22,7 \pm 0,4$ mm (JACOB et al., 2009b) no início da divergência folicular. Em estudo realizado com éguas no período pós-parto, resultados similares também foram observados, sendo relatado um diâmetro médio de $23,0 \pm 1,2$ mm para o F1 no momento do desvio e um intervalo entre o desvio e a ovulação de $6,6 \pm 0,6$ dias (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013).

No entanto, quando considerados os dados em relação ao início do período pós-parto, a ocorrência do desvio folicular foi observada em média $6,29 \pm 1,27$ dias após o parto no grupo de ovulação tardia, assim como não foi possível determinar este evento no grupo precoce, visto que no primeiro dia pós-parto (início do experimento) o momento do desvio já havia acontecido. Como já mencionado, limitadas informações são encontradas a respeito dos mecanismos de desenvolvimento folicular em éguas no período pós-parto. Além disso, até onde foi observado, não há relatos deste fenômeno ocorrendo na espécie equina. Portanto, apesar do pequeno número de animais observados (3), as características observadas indicam que animais que apresentam estro e ovulação precoce (< 10 dias) durante o período pós-parto, são animais que já apresentam maior desenvolvimento folicular no momento do parto, assim como o desvio folicular ocorreu antes deste evento.

Em relação ao desenvolvimento folicular, foi observado que não há diferenças entre os dois grupos avaliados quando observamos os dados normalizados para a primeira ovulação pós-

parto, indicando que as características de desenvolvimento folicular são similares entre todos os animais. No entanto, quando avaliamos as características no início do período pós-parto, uma nítida diferença é observada no padrão de desenvolvimento folicular entre os grupos, principalmente em relação ao diâmetro do folículo ovulatório (F1), que permaneceu significativamente maior em todos os dias avaliados (d1-d7). Adicionalmente, de acordo com o perfil observado no grupo precoce, o momento do desvio já havia ocorrido no primeiro dia pós-parto. Portanto, levando-se em consideração as características acima descritas, há indícios de que eventos cruciais ocorrem antes do momento do parto, levando a uma maior atividade folicular em alguns animais, o que foi observado nos animais do grupo precoce. No entanto, neste estudo os eventos foram avaliados no primeiro dia pós-parto, sugerindo a necessidade de estudos adicionais sobre eventos no período pré-parto, assim como a confirmação deste fenômeno em um número maior de animais.

Em estudo anterior, pesquisadores realizaram algumas avaliações entre animais que desenvolveram um folículo > 20 mm em até 7 dias pós-parto (com resposta) e animais que não apresentaram estas características (sem resposta). O diâmetro do maior folículo (F1) no grupo com resposta foi de $15,7 \pm 1,2$; $21,3 \pm 1,6$ e $22,3 \pm 1,3$ mm para os dias 0, 3 e 7 pós-parto, respectivamente, enquanto os diâmetros para o F1 no grupo sem resposta foram de $12,3 \pm 1,0$; $11,9 \pm 1,7$ e $15,0 \pm 1,7$ mm para os mesmos dias, sendo os diâmetros significativamente maiores no grupo com resposta em todos os dias avaliados. No grupo com resposta, uma tendência de maiores níveis de FSH foi observada no quarto dia anterior ao parto (d-4; $P < 0,08$), maiores níveis no dia -2 e uma queda nas concentrações de FSH entre o dia do parto e o terceiro dia pós-parto, sendo esta redução atribuída aos efeitos inibitórios dos folículos em desenvolvimento (GINTHER; BAUCUS; BERGFELT, 1994).

Em relação aos resultados descritos anteriormente, as médias de diâmetro para o F1 do grupo precoce no presente experimento foram $28,73 \pm 4,27$; $34,68 \pm 2,89$ e $44,22 \pm 1,83$ mm para o d1, d3 e d7, respectivamente, sendo os diâmetros muito superiores aos observados no estudo de Ginther, Baucus e Bergfelt (1994). No entanto, o intervalo parto-ovulação no grupo precoce deste estudo (8 dias) assemelha-se ao observado no estudo anterior, visto que 2 animais foram observados com grandes folículos (29 e 34 mm) no dia do parto, sendo estes animais os que apresentaram os menores intervalos parto-ovulação (8 e 9 dias). Embora não foram realizadas avaliações pré-parto, assim como não foram mensurados hormônios durante o período pós-parto inicial no presente estudo, os resultados observados no estudo previamente citado indicam que alterações hormonais ocorrem de maneira diferencial antes e após o

momento do parto em éguas. Portanto, um maior número de pesquisas a respeito dos eventos pré e pós-parto são fundamentais para a elucidação destes fenômenos na espécie equina.

No presente trabalho, quando considerado o número de folículos agrupados por classes, nenhuma diferença foi observada entre os grupos quando avaliado o período de 7 dias anteriores à ovulação, assemelhando-se ao perfil de desenvolvimento dos folículos individualmente (F1-F6). Da mesma forma, quando considerado o período pós-parto inicial (d1-d7), diferenças entre os grupos foram observadas, sendo tais diferenças presentes no grupo de folículos de 20-25 mm e > 25 mm. Em relação aos folículos de 20-25 mm, um aumento no grupo tardia foi observado do d4 ao d7. Por outro lado, um aumento no número de folículos > 25 mm foi observado no grupo precoce durante os primeiros dias pós-parto (d1-d3). Levando-se em consideração que o desvio folicular já havia ocorrido no grupo precoce após o parto, assim como este processo só aconteceu no grupo tardia após o parto (média de $6,29 \pm 1,27$ dias), pode-se justificar a diferença observada entre os grupos.

Portanto, semelhante ao que foi observado no perfil de desenvolvimento dos folículos individualmente, não houve diferenças entre os grupos em relação ao número de folículos por classes durante o período antecedendo a ovulação, porém, diferenças foram observadas quando avaliado o período pós-parto inicial. Dessa forma, há indícios de que o desenvolvimento folicular entre os grupos avaliados é semelhante, sendo os eventos ocorridos anteriormente ao parto os fatores cruciais para as diferenças apresentadas entre os animais no início do período pós-parto. Estes fatores sugerem, portanto, um maior número de estudos em relação ao desenvolvimento folicular na espécie equina durante o período pós-parto, assim como a pesquisa dos eventos pré-parto (p.ex. dinâmica hormonal) que confirmem tais características. Adicionalmente, há a necessidade de confirmação destes eventos em um número maior de animais.

Kelley, Warren e Mortensen (2013), trabalhando com éguas no período pós-parto, observaram que o número de folículos agrupados por classes durante 9 dias precedendo a primeira ovulação foi de 2 a 6, 2 a 4, 1 a 2 e 1 a 3 folículos nas classes de 6-10, 11-15, 16-20 e > 20 mm, respectivamente. No entanto, no presente experimento, um número superior de folículos foi observado, visto que 5 a 7, 4 a 7 e 2 a 6 folículos foram observados nas classes de 6-10, 10-15 e 15-20 mm. Adicionalmente, um número de 15 a 25 e 1 a 2 folículos foram observados nas classes de < 6 e > 20 mm, respectivamente.

Em relação aos resultados observados em ciclos regulares (animais não prenhes), resultados similares ao presente experimento foram observados, visto que um número de 15 a 21, 7 a 10, 4 a 6, 2 a 4 e 1 a 3 folículos foram observados durante o ciclo estral nas classes de

2-5, 6-10, 11-15, 16-20 e > 20 mm, respectivamente (PIERSON; GINTHER, 1987). Em um estudo mais recente, o número médio de folículos observados foi $27,1 \pm 0,6$ (2-5 mm), $9,7 \pm 0,2$ (5-10 mm), $3,9 \pm 0,2$ (10-15mm), $2,3 \pm 0,1$ (15-20 mm) e $0,8 \pm 0,1$ (20-25 mm; GINTHER et al., 2008), sendo tais valores referentes aos observados em éguas de idade intermediária (10-14 anos), que foram semelhantes aos observados em éguas jovens (5-6 anos). Neste contexto, no presente experimento, considerando os 7 dias anteriores à primeira ovulação pós-parto, o número médio de folículos observado foi de $25,07 \pm 1,31$ (< 6 mm), $6,59 \pm 0,44$ (6-10 mm), $5,85 \pm 0,49$ (10-15 mm), $3,58 \pm 0,34$ (15-20 mm), $0,83 \pm 0,10$ (20-25 mm) e $1,07 \pm 0,05$ (> 25 mm), assemelhando-se aos números observados em ciclos de éguas não prenhes.

Não foram observadas diferenças entre os grupos (precoce e tardia) em relação às características de desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Em relação ao diâmetro máximo e diâmetro no dia anterior à ovulação (D -1), foram observados uma média de $45,2 \pm 0,77$ mm e $44,69 \pm 0,63$ mm, respectivamente. Resultados similares foram observados em éguas de grandes raças (Bretão), visto que o diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório foi $44,5 \pm 1,4$ mm, assim como o diâmetro no dia anterior à ovulação foi $44,0 \pm 1,3$ mm (GASTAL et al., 2008). Em jumentas, resultados similares também foram observados, visto que um diâmetro médio de $4,4 \pm 0,2$ cm para o F1 foi observado no dia anterior à ovulação (TOSI et al., 2013). Da mesma forma, o intervalo entre o diâmetro máximo observado e a ovulação foi de $1,6 \pm 0,1$ dias (GINTHER et al., 2008), semelhante ao observado neste experimento ($1,36 \pm 0,15$ dias). Uma redução na taxa de crescimento foi observada entre os Dias -2 e a ovulação ($0,28 \pm 0,53$ mm), quando comparada à taxa de crescimento entre os Dias -7 e -2 ($2,69 \pm 0,23$ mm). De maneira semelhante, esta redução nas taxas de crescimento entre o D -2 e a ovulação foi descrita durante o desenvolvimento folicular em éguas não prenhes (JACOB et al., 2009a). Resultados similares também foram observados em jumentas durante o período pós-parto, visto que uma taxa de crescimento média de $2,7 \pm 0,1$ mm/dia foi observada em relação ao F1 (DADARWAL et al., 2004).

4.4.2 Vascularização Folicular e Ovariana

Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à vascularização do folículo ovulatório (F1) ou nos escores de vascularização do pedículo ovariano ipsilateral ao F1. Em outro trabalho, considerando a circunferência da parede folicular, uma média de $37,3 \pm$

2,6% de vascularização foi observada no F1 de éguas suplementadas com L-arginina e $25,4 \pm 2,7\%$ em éguas controle, sendo a vascularização do grupo tratado significativamente maior (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013). Neste contexto, uma média de $34,53 \pm 1,39\%$ foi observada no presente experimento, assemelhando-se ao observado nas éguas suplementadas com L-arginina do estudo anterior. No entanto, tais valores são menores aos descritos em outros trabalhos realizados em éguas fora do período pós-parto. Em estudo avaliando a diferença de vascularização entre animais que tornaram-se gestantes ou não, a porcentagem de vascularização na parede do F1 foi observada em torno de 50% em animais não-prenhes e cerca de 75% em animais prenhes (SILVA et al., 2006). Da mesma forma, Mortensen et al., 2012 também observaram um aumento de vascularização no folículo pré-ovulatório em animais que tornaram-se prenhes em relação aos animais não-prenhes, assim como uma maior vascularização do F1 foi observada em animais que apresentaram recuperação embrionária comparados aos animais em que não houve a recuperação de embriões. Desta forma, os ciclos que resultaram em prenhez ou recuperação embrionária tiveram em média $53,8 \pm 2,4\%$ de vascularização comparados a $43,6 \pm 2,4\%$ observados nos ciclos em que não foram detectadas gestações ou não houve recuperação embrionária.

Apesar da diferença entre os valores de vascularização observada nos estudos anteriormente descritos, uma média superior nas características de vascularização foi observada em ciclos férteis, ou seja, em animais que tornaram-se prenhes ou ciclos em que houve a recuperação de embriões. No presente estudo, a média de vascularização observada foi semelhante ao observado por outros autores em éguas no período pós-parto, sendo os valores semelhantes aos observados em éguas suplementadas com L-arginina. No entanto, no estudo utilizando éguas no período pós-parto (KELLEY; WARREN; MORTENSEN, 2013), os valores observados nos animais suplementados com L-arginina foram superiores aos animais controle, porém as taxas de prenhez não foram avaliadas no experimento. Portanto, os resultados observados no presente experimento ($34,53 \pm 1,39\%$) se assemelham aos resultados de vascularização das éguas suplementadas com L-arginina ($37,3 \pm 2,6\%$), talvez refletindo o maior número de animais que tornaram-se prenhes neste experimento (8/10), resultando em maiores porcentagens de vascularização observadas em relação às éguas controle do experimento anterior.

Em relação aos escores de vascularização do pedículo ovariano ipsilateral, apenas uma tendência ao efeito de dia ($P = 0,0631$) foi observada, não havendo diferenças entre os grupos avaliados (precoce e tardia). Neste contexto, esta tendência de aumento na vascularização do pedículo ovariano ipsilateral seguiu o aumento de vascularização do folículo ovulatório ao

longo dos dias, ou seja, conforme se aproximava o momento da ovulação. Desta forma, este aumento nos escores de vascularização do pedículo ovariano ipsilateral se assemelham aos obtidos em éguas cíclicas, visto que uma redução nos valores de PI das artérias ovarianas foram observadas entre os Dias -6 e -1, assim como uma correlação negativa ($r = -0,41$; $P < 0,05$) foi observada entre o crescimento do folículo pré-ovulatório e os valores de PI da artéria ovariana ipsilateral (BOLLWEIN et al., 2002a).

4.4.3 Área e Vascularização do Corpo Lúteo (CL) e Produção de Progesterona (P4)

Com relação às características de área e vascularização do CL e produção de P4, não foram observadas diferenças entre os grupos (precoce e tardia) para nenhuma das características avaliadas. A área do corpo lúteo apresentou valores máximos no D2 com subsequente decréscimo gradativo até o final do período experimental (D16), sendo tais resultados os mesmos observados durante o ciclo estral em éguas não prenhes (BOLLWEIN et al., 2002b). Em relação à porcentagem de vascularização do CL, foi observado um aumento gradativo a partir do D1, atingindo altos valores no D8, mantendo tais características até o final do período experimental. Da mesma forma, as concentrações de progesterona aumentaram paralelamente ao aumento na vascularização do CL, atingindo altas concentrações no D6. Resultados semelhantes também foram observados durante o diestro em éguas cíclicas, visto que as concentrações de P4 aumentaram gradativamente após a ovulação (D0), atingindo concentrações máximas no D8. De forma semelhante, a porcentagem de vascularização do CL aumentou paralelamente aos níveis de progesterona, atingindo níveis máximos de vascularização do D10, ou seja, 2 dias após as concentrações de P4 atingirem o seu máximo (GINTHER et al., 2007a).

No entanto, no presente estudo, as características de vascularização e produção de progesterona se mantiveram em altos níveis até o final do período experimental, visto que a maior parte dos animais tornaram-se gestantes (8/10; 80%). Portanto, as características observadas nos experimentos anteriores, tais como a redução nos níveis de progesterona e nas características de vascularização do CL, devido à luteólise, não puderam ser observadas. Neste contexto, apenas redução nas concentrações de P4 foi observada no presente experimento (D12-D16), tal característica atribuída à queda nas concentrações nos dois animais que não tornaram-se gestantes, que ocorreram nos dias 13 (1 animal) e 14 (1 animal) pós-ovulação.

Até onde foi observado, este é o primeiro estudo detalhado a respeito das características de área e vascularização do corpo lúteo, associados à produção de progesterona durante o primeiro diestro pós-parto. Contudo, levando-se em consideração os resultados observados neste experimento, há indícios de que os eventos após a primeira ovulação pós-parto assemelham-se aos ocorridos durante o diestro em éguas não gestantes.

4.5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o padrão de desenvolvimento folicular durante os dias antecedendo a primeira ovulação pós-parto, não foram observadas diferenças entre os animais de ovulação precoce ou tardia, assim como as características observadas se assemelham ao desenvolvimento folicular em éguas fora do período pós-parto. Entretanto, diferenças foram observadas entre os grupos (precoce e tardia) durante o início do período pós-parto (d1-d7). Neste caso, foi observado o maior desenvolvimento folicular durante o pós-parto imediato, assim como o desvio folicular já havia ocorrido antes deste evento no grupo precoce, sugerindo que eventos cruciais ocorrem anteriormente ao parto, determinando as diferenças no perfil folicular entre os grupos no período pós-parto imediato. Desta forma, um maior número de estudos a respeito das características pré e pós-parto são necessários, assim como a necessidade de confirmação dos resultados observados neste experimento em um número maior de animais.

Em relação às características do primeiro diestro pós-parto, os resultados observados indicam que há similaridade em relação às características observadas durante o diestro em éguas não prenhes. No entanto, poucas informações ainda são encontradas a respeito do processo de seleção e desenvolvimento folicular durante o puerpério na espécie equina, assim como pouco se tem observado a respeito dos eventos vasculares neste período, indicando a importância e a necessidade de estudos sobre estes processos em éguas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 502–507, 2004.
- ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 445–454, 1987. Supplement.
- ALMEIDA, F. Q.; FONSECA, F. A.; ESPECHIT, C. J. B.; MOTTA, V. A. F. Effects of PGF2alpha and progesterone on the reproductive efficiency of crossbred mares during the postpartum period. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 4, p. 652–659, 1995.
- ARROTT, C.; MACPHERSON, M.; BLANCHARD, T.; VARNER, D.; THOMPSON, J.; SIMPSON, B.; BRUEMMER, J.; VOGELSANG, S.; FERNANDEZ, M.; FLEET, T.; BURNS, P. Biodegradable estradiol microspheres do not affect uterine involution or characteristics of postpartum estrus in mares. **Theriogenology**, v. 42, p. 371–384, 1994.
- BAILEY, J. V.; BRISTOL, F. M. Uterine involution in the mare after induced parturition. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 5, p. 793–797, 1983.
- BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p. 365–377, 2006.
- BELIN, F.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 1343, p. 1335–1343, 2000.
- BERGFELT, D. R.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, p. 426–432, 2001.
- BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mare. **Theriogenology**, v. 26, n. 6, p. 733–747, 1986.
- BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationships between circulating concentrations of FSH and follicular waves during early pregnancy in mares. **Equine Veterinary Science**, v. 12, p. 274–279, 1992.
- BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 781–796, 1993a.

BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Synchronous fluctuations of LH and FSH in plasma samples collected daily during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 40, p. 1137–1146, 1993b.

BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1191–1206, 2000.

BERGFELT, D. R.; MANN, B. G.; SCHWARTZ, N. B.; GINTHER, O. J. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 6, p. 319–322, 1991.

BLANCHARD, T. L.; THOMPSON, J. A.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RAMSEY, J.; O'MEARA, A.; VARNER, D. D. Influence of day of postpartum breeding on pregnancy rate, pregnancy loss rate, and foaling rate in Thoroughbred mares. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1290–1296, 2012.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; MEYERS, S. A.; JOHNSON, L. Effects of postparturient uterine lavage on uterine involution in the mare. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 527–535, 1989.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; QUIRK, K.; RUGILA, J. N.; BOEHNKE, L. Effects of ecboic agents on measurements of uterine involution in the mare. **Theriogenology**, v. 36, n. 4, p. 559–571, 1991.

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

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 597–605, 2003.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2043–2051, 2002b.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2129–2138, 2002a.

BRIANT, C.; BLANC, M.; DAELS, P.; GUILLAUME, D. Effect of passive and specific immunization against inhibin in pony mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 493, 2000.

BRUEMMER, J. E.; BRADY, H. A.; BLANCHARD, T. L. Uterine involution, day and variance of first postpartum ovulation in mares treated with progesterone and estradiol-17beta for 1 or 2 days postpartum. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 989–995, 2002.

CALDAS, M. C. S.; OLIVEIRA, F. R. A. P.; SILVA, A. A. M. R. Chronobiological characterization of the first estrous cycle in Brasileiro de Hipismo mares during the postpartum period. **Theriogenology**, v. 42, p. 803–813, 1994.

CAMILLO, F.; MARMORINI, P.; ROMAGNOLI, S.; VANNOZZI, I.; BAGLIACCA, M. Fertility at the first post partum estrous compared with fertility at the following estrous cycles

in foaling mares and with fertility in nonfoaling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 17, n. 11, p. 612–616, 1997.

CARNEVALE, E. M. Folliculogenesis and ovulation. In: N. W. Rantanen; A. O. McKinnon (Eds.); **Equine Diagnostic Ultrasound**. p.201–211, 1998. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, p. 1101–1115, 1992.

DADARWAL, D.; TANDON, S. N.; PUROHIT, G. N.; PAREEK, P. K. Ultrasonographic evaluation of uterine involution and postpartum follicular dynamics in French jennies (*Equus asinus*). **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 257–264, 2004.

DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1111–1118, 2002.

DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. **Reproduction**, v. 121, n. 6, p. 897–903, 2001.

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

FORD, S. P.; REYNOLDS, L. P.; FERRELL, C. L. Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid uterus during the periparturient period in sows. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1085–1091, 1984.

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

GASTAL, E. L.; BERGFELT, D. R.; NOGUEIRA, G. P.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1492–1498, 1999a.

GASTAL, E. L.; DONADEU, F. X.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 52, p. 803–814, 1999b.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 417–422, 2004.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1320–1327, 1997.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 3, p. 724–730, 1999.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 699–709, 2006.

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

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; NOGUEIRA, G. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 925–940, 2000.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 31–39, 1999c.

GASTAL, E. L.; NEVES, A. P.; MATTOS, R. C.; PETRUCCI, B. P. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Miniature ponies: 1. Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 376–385, 2008.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1066–1073, 1997.

GINTHER, O. J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 18–25, 1993.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices, 1992.

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

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction**: Book 2, horses. Cross Plaines, WI: Equiservices, 1995.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction**: Color-Doppler ultrasonography - book 4. Cross Plaines, WI: Equiservices, 2007.

GINTHER, O. J.; BAUCUS, K. L.; BERGFELT, D. R. Follicular and FSH responses to parturition during the anovulatory season in mares. **Theriogenology**, v. 41, p. 613–627, 1994.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638–647, 2001.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239–257, 2003.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 379–388, 2005a.

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 807–821, 1992.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 1, p. 105–111, 1993.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; MEIRA, C.; KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 99–105, 2004e.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 920–927, 2000.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1374–1379, 2004c.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 2, p. 315–323, 2005b.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1195–1201, 2004b.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CHECURA, C. M.; BEG, M. A. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1063–1069, 2004d.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; UTT, M. D.; BEG, M. A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 213–220, 2007a.

GINTHER, O. J.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; JACOB, J. C.; BEG, M. A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 780–788, 2009.

GINTHER, O. J.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; JACOB, J. C.; SIDDIQUI, M. A. R.; BEG, M. A. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 8, p. 955–963, 2008.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75–87, 1997.

GINTHER, O. J.; MEIRA, C.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 862–867, 2002.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 505–516, 1984.

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

GINTHER, O. J.; UTT, M. D.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 3, p. 543–550, 2007b.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 1-2, p. 144–150, 2006.

GLENCROSS, R. G.; BLEACH, E. C.; WOOD, S. C.; KNIGHT, P. G. Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, n. 2, p. 599–605, 1994.

GOMEZ-CUETARA, C.; FLORES, J. M.; SANCHEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; SANCHEZ, M. A. Histological changes in the uterus during postpartum in the mare. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 24, n. 1, p. 19–23, 1995.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BÉZARD, J.; GÉRARD, N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, alpha-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1120–1127, 1999.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Dynamics of uterine diameter and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 25, n. 2, p. 133–142, 1991b.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Uterine morphology and function in postpartum mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 6, p. 330–339, 1991a.

GUILBAULT, L. A.; THATCHER, W. W.; FOSTER, D. B.; CATON, D. Relationship of 15-Keto-13,14-Dihydro-Prostaglandin F2a concentrations in peripheral plasma with local uterine

production of F series prostaglandins and changes in uterine blood flow during the early postpartum period of cattle. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 870–878, 1984.

GÜNDÜZ, M. C.; KAŞIKCI, G.; EKİZ, B. Follicular and steroid hormone changes in Arabian mares in the postpartum period. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1-4, p. 200–205, 2008.

GÜNDÜZ, M. C.; KAŞIKCI, G.; KAYA, H. H. The effect of oxytocin and PGF2alpha on the uterine involution and pregnancy rates in postpartum Arabian mares. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 257–263, 2008.

GYGAX, A. P.; GANJAM, V. K.; KENNEY, R. M. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 571–578, 1979. Supplement.

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 581–590, 1986.

HILLIER, S. G. Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v. 7, p. 168–222, 1985.

HILLMAN, R. B.; GANJAM, V. K. Hormonal changes in the mare and foal associated with oxytocin induction of parturition. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 27, p. 541–546, 1979.

HILLMAN, R. B.; LOY, R. G. Oestrogen excretion in mares in relation to various reproductive states. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 23, p. 223–230, 1975.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H. Conception in a mare with an active corpus luteum. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 120, p. 733–734, 1977.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 18, p. 119–151, 1972.

HUHTINEN, M.; REILAS, T.; KATILA, T. Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated at the first post-partum oestrus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 37, n. 3, p. 343–350, 1996.

IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. L.; MCKINNON, A. O. Reproductive hormone profiles in mares during the autumn transition as determined by collection of jugular blood at 6 h intervals throughout ovulatory and anovulatory cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 101–109, 2000.

JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CARVALHO, G. R.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 248–254, 2009b.

JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CARVALHO, G. R.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p. 92–99, 2009a.

KATILA, T.; KOSKINEN, E.; OJALA, M. Evaluation of the post partum mare in relation to foal heat breeding. I. Rectal palpation, vaginoscopy and ultrasound scanning. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 35, n. 2, p. 92–100, 1988.

KELLEY, D. E.; WARREN, L. K.; MORTENSEN, C. J. Oral l-arginine supplementation impacts several reproductive parameters during the postpartum period in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 233–240, 2013.

KIRACOFÉ, G. H. Uterine involution: its role in regulating postpartum intervals. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 16–28, 1980.

KOSKINEN, E.; KATILA, T. Uterine involution, ovarian activity, and fertility in the post-partum mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 733–734, 1987. Supplement.

KREIDER, J. L.; MURRELL, V. C.; LONGWELL, L. C.; GODKE, R. A. Control of estrus in the lactating postpartum mare with fluprostenol (ICI-81,008). **Theriogenology**, v. 10, n. 5, p. 371–380, 1978.

KRUEGER, L.; KOERTE, J.; TSOUSIS, G.; HERZOG, K.; FLACHOWSKY, G.; BOLLWEIN, H. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1-3, p. 23–31, 2009.

LEY, W. B.; PURKSWELL, B. J.; BOWEN, J. M. Effect of a PGF₂-alpha-analogue administered during the postpartum period upon pregnancy rate. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 141–143, 1988.

LOVELL, J. D.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; EVANS, J. W. Endocrine patterns of the mare at term. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 449–456, 1975. Supplement.

LOY, R. G. Characteristics of postpartum reproduction in mares. **The Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice**, v. 2, n. 2, p. 345–349, 1980.

LOY, R. G.; EVANS, M. J.; PEMSTEIN, R.; TAYLOR, T. B. Effects of injected ovarian steroids on reproductive patterns and performance in post-partum mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 199–204, 1982. Supplement.

LOY, R. G.; HUGHES, J. P.; RICHARDS, W. P.; SWAN, S. M. Effects of progesterone on reproductive function in mares after parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 291–295, 1975. Supplement.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A. L. G.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and

of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 495–498, 2002.

MCCUE, P. M.; HUGHES, J. P. The effect of postpartum uterine lavage on foal heat pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 33, n. 5, p. 1121–1129, 1990.

MCCUE, P. M.; HUGHES, J. P.; LASLEY, B. L. Effect on ovulation rate of passive immunisation of mares against inhibin. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 103–106, 1993.

MCKINNON, A. O.; BROWN, R. W.; PASHEN, R. L.; GREENWOOD, P. E.; VASEY, J. R. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 2, p. 144–146, 1992.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; HARRISON, L. A.; BLACH, E. L.; SHIDELER, R. K. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 3, p. 350–353, 1988.

MERKT, H.; GÜNZEL, A. R. A survey of early pregnancy losses in West German thoroughbred mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 11, n. 4, p. 256–258, 1979.

MEYERS, P. J.; BONNETT, B. N.; MCKEE, S. L. Quantifying the occurrence of early embryonic mortality on three equine breeding farms. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 32, n. 11, p. 665–672, 1991.

MILLER, K. F.; WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Changes in concentrations of circulating gonadotropins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 867–872, 1979.

MILLER, K. F.; WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Interaction of estradiol and a nonsteroidal follicular fluid substance in the regulation of gonadotropin secretion in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 354–358, 1981.

MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 51–60, 2002.

MORTENSEN, C. J.; KELLEY, D. E.; SMITH, R. L.; ADKIN, A. Predicting a fertile cycle: studies examining vascular perfusion of the preovulatory follicle via Doppler ultrasonography. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 7, p. 406, 2012.

MORTENSEN, C. J.; KELLEY, D. E.; WARREN, L. K. Supplemental l-arginine shortens gestation length and increases mare uterine blood flow before and after parturition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 514–520, 2011.

NAMBO, Y.; KANEKO, H.; NAGATA, S.; OIKAWA, M.; YOSHIHARA, T.; NAGAMINE, N.; WATANABE, G.; TAYA, K. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 545–557, 1998.

NETT, T. M.; HOLTAN, D. W.; ESTERGREEN, V. L. Levels of LH, prolactin and oestrogens in the serum of post-partum mares. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 23, p. 201–206, 1975.

NETT, T. M.; HOLTAN, D. W.; ESTERGREEN, V. L. Plasma estrogens in pregnant and postpartum mares. **Journal of Animal Science**, v. 37, p. 962–970, 1973.

NODEN, P. A.; OXENDER, W. D.; HAFS, H. D. Plasma luteinizing hormone, progestogens, and estrogens in mares during gestation, parturition, and first postpartum estrus (foal estrus). **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 12, p. 1964–1967, 1978.

OSOL, G.; MANDALA, M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Physiology**, v. 24, p. 58–71, 2009.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 14, p. 219–231, 1987.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, v. 23, n. 5, p. 795–806, 1985a.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v. 24, n. 3, p. 359–368, 1985b.

SALAMONSEN, L. A. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. **Reproduction**, v. 125, p. 301–311, 2003.

SALTIEL, A.; GUTIERREZ, A.; DE BUEN-LLADO, N.; SOSA, C. Cervico-endometrial cytology and physiological aspects of the post-partum mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 35, p. 305–309, 1987.

SCHAUER, S. N.; SONTAKKE, S. D.; WATSON, E. D.; ESTEVES, C. L.; DONADEU, F. X. Involvement of miRNAs in equine follicle development. **Reproduction**, v. 146, n. 3, p. 273–282, 2013.

SERTICH, P. L.; HINRICHS, K.; KENNEY, R. M. Histological aspects of uterine involution in the post parturient, ovariectomised, embryo-recipient mare: a model for the study of involution. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 56–58, 1989.

SEXTON, P. E.; BRISTOL, F. M. Uterine involution in mares treated with progesterone and estradiol-17 beta. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 3, p. 252–256, 1985.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 755–761, 2005.

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

- SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 2, p. 337–343, 2006.
- SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1223–1230, 2004.
- SQUIRES, E. L.; GARCIA, R. H.; GINTHER, O. J.; VOSS, J. L.; SEIDEL JR., G. E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 661–670, 1986.
- STANTON, M. E. Uterine Involution. In: A. O. McKinnon; E. L. Squires; W. E. Vaala; D. D. Varner (Eds.); **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley-BlackWell, 2011. p. 2291–2293.
- STEVEN, D. H.; JEFFCOTT, L. B.; MALLON, K. A.; RICKETTS, S. W.; ROSSDALE, P. D.; SAMUEL, C. A. Ultrastructural studies of the equine uterus and placenta following parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 579–586, 1979. Supplement.
- STEWART, D. R.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P. Concentrations of 15-keto-13, 14-dihydro-prostaglandin F2 alpha in the mare during spontaneous and oxytocin induced foaling. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 270–274, 1984.
- STOLLA, R.; BOLLWEIN, H. Color doppler sonography of the uterine artery in subfertile mares. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 547, 1997.
- TAKAMOTO, N.; LEPPERT, P. C.; YU, S. Y. Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. **Connective Tissue Research**, v. 37, n. 3-4, p. 163–75, 1998.
- TOSI, U.; BERNABÒ, N.; VERNI, F.; VALBONETTI, L.; MUTTINI, A.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Postpartum reproductive activities and gestation length in Martina Franca jennies, an endangered Italian donkey breed. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 120–124, 2013.
- TURNER, D. D.; GARCIA, M. C.; MILLER, K. F.; HOLTAN, D. W.; GINTHER, O. J. FSH and LH concentrations in periparturient mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 547–553, 1979. Supplement.
- VANDEPLASSCHE, M.; BOUTERS, R.; SPINCEMAIUE, J.; BONTE, P.; CORYN, M. Observations on involution and puerperal endometritis in mares. **Irish Veterinary Journal**, v. 37, p. 126–132, 1983.
- WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 33–48, 1999. Supplement.
- WHITMORE, H. L.; WENTWORTH, B. C.; GINTHER, O. J. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 631–636, 1973.