

**INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA,
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS.**

DISSERTAÇÃO

**Utilização da Ultrassonografia Doppler na Avaliação do Fluxo Sanguíneo
dos Corpos Lúteos Suplementares em Éguas Cíclicas**

Diego Guedes Campos

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA,
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**Utilização da Ultrassonografia Doppler na Avaliação do Fluxo Sanguíneo
dos Corpos Lúteos Suplementares em Éguas Cíclicas**

DIEGO GUEDES CAMPOS

Sob orientação do Professor:

Júlio Cesar Ferraz Jacob

E co-orientação da Professora

Aline Emerim Pinna

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas, Área de Concentração em Patologia Clínica.

Seropédica/RJ
Maio/2015

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C 186u Campos, Diego Guedes, 27091988-
Utilização da Ultrassonografia Doppler na Avaliação
do Fluxo Sanguíneo dos Corpos Lúteos Suplementares em
Éguas Cíclicas / Diego Guedes Campos. - Seropédica ,
2015.
68 f.: il.

Orientadora: Júlio Cesar Ferraz Jacob

Coorientadora: Aline Emerim Pinna.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação:
Patologia e Ciências Clínicas, 2015.

1. Ultrassonografia Doppler,. 2. Corpos Lúteos
Suplementares. 3. Vascularização. I. Jacob
, Júlio Cesar Ferraz , 16/02/1961-, orient.
II. Pinna, Aline Emerim, -, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação: Patologia e Ciências
Clínicas. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

DIEGO GUEDES CAMPOS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/06/2015

Júlio Cesar Ferraz Jacob. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ

Felipe Zandonadi Brandão. Dr. UFF



Emitido em 19/06/2023

ATA N° 1703/2023 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 20/06/2023 08:19)

JULIO CESAR FERRAZ JACOB
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.00.64)
Matrícula: ###023#9

(Assinado digitalmente em 19/06/2023 16:33)

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.00.64)
Matrícula: ###480#3

(Assinado digitalmente em 19/06/2023 14:26)

FELIPE ZANDONADI BRANDÃO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.617-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **1703**, ano: **2023**, tipo:
ATA, data de emissão: **19/06/2023** e o código de verificação: **c9c3e949fa**

Dedico este trabalho
à minha mãe, Wilma Pereira Campos.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas, e de forma especial:

A Deus, que plantou em mim um sonho que hoje se materializa, que traçou todos os meus caminhos, dando-me forças pra superar os desafios do dia a dia.

Ao professor, orientador e amigo Júlio César Ferraz Jacob, pela confiança sempre serei grato.

À co-orientadora Aline Emerim Pinna, pela confiança no meu trabalho, pelos ensinamentos transmitidos ao longo desse período que contribuíram de maneira inexplicável à minha formação científica e profissional.

Ao professor Felipe Zandonadi Brandão, por disponibilizar o espaço, o seu tempo, pela oportunidade mesmo eu não sendo da instituição. Pode ter certeza vou sempre serei grato a você.

Aos meus Amados pais, Wilma Pereira Campos e Madson Batista Guedes, que nos ensinamentos de vida, foram mestres. Doaram-se por inteiro e, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Eles me ensinaram a persistir à busca dos ideais. Fizeram-me ver que os obstáculos eram provas impostas pela vida cujo fim era nos fortalecer e, assim, superá-los. Com seus exemplos, aprendi a ser perseverante e justo. Com carinho, dedicação e amor, cresci. Hoje sou fruto dessa confiança e realizo meu sonho maior, o de me tornar um Mestre em reprodução animal.

Aos meus irmãos Leonardo Guedes Campos e Leandro Guedes Campos, por torcerem pelas minhas conquistas.

Ao Mário Balara, pela paciência nas análises estatísticas e colaboração nos resultados do projeto.

A Sabina Gaia, colega de equipe.

Aos professores a pós-graduação, em especial prof. Marco Mello e o João Telhado.

Aos amigos:

Aline Emerim Pinna, amiga e irmã, sabem que palavras não expressa a tamanha gratidão, carinho que sinto por você. OBRIGADO!!!

Fabio Lucio, sempre esteve comigo me dando apoio, foi bom poder ter contado contigo nessa jornada.

Priscila Vidal, pessoa companheira esteve comigo todo tempo, testemunha dos momentos difíceis e dos momentos de maior felicidade.

Tiago Souza, amigo que me acompanhou em varias etapas do meu trabalho.

Aos amigos que formei na UFRRJ ao longo do curso de Mestrado: Marcela, Dani Melo, Jonathan, Uiara, Carol.

A toda equipe da Fazenda Vital Brasil:

Leonardo Galileu, Luiz Eduardo, Sr. Wilson, Aline Souza, Lucia Helena, Amauri, Costa, Guilherme Jones, José Luiz (Sr. Zé), Rafael Silva, Adriano Pereira, Alexandre Cunha e todos não mencionados, uma verdadeira família Vital Brasil, obrigado pela confiança, carinho, preocupação e dentre outras adjetivos que só são conquistados através de muita humildade, seriedade e respeito ao próximo.

À CAPES pela concessão da bolsa acadêmica que foi fundamental para a minha dedicação integral ao projeto.

Meu muito obrigado a todos que torceram por mais uma conquista, mesmo aqueles que estão distantes, mas que sempre acreditaram ser possível alcançar o meu objetivo.

Que Deus ilumine o caminho de cada um!

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

RESUMO

CAMPOS, Diego Guedes. **Utilização da ultrassonografia Doppler na avaliação do fluxo sanguíneo dos corpos lúteos suplementares em éguas cíclicas.** 2015. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O presente estudo objetivou descrever as alterações ultrassonográficas dos suplementares em éguas gestantes, utilizando a técnica de ultrassonografia Doppler. Para isso, o estudo monitorou 20 éguas mestiças gestantes (n=20) para acompanhar o início e o desenvolvimento dos CLS, estes então analisados quanto à sua hemodinâmica através da US Doppler. Os resultados desta pesquisa demonstram que 75% das éguas avaliadas formaram CLS, não havendo diferenças significativas entre o número de CLS em função das avaliações objetivas e subjetivas ($p>0.05$), mas havendo diferenças em relação ao tempo de formação dos CLS com relação às avaliações subjetivas, pixel e intensidade de pixel ($p>0,05$). Também se observou que a perfusão vascular (PV) luteal a partir dos 70 dias de gestação não diferiu entre os graus das variáveis, obtendo o máximo da vascularização até os 119 dias, indicando o maior número de CLS maduros e, a partir desse período, pode-se perceber uma diminuição da PV das estruturas. O estudo demonstrou que a avaliação subjetiva é fidedigna e eficiente para o veterinário de campo, porém, cinco éguas (n=5) do estudo não desenvolveram CLS e ainda assim mantiveram sua prenhez, contradizendo a hipótese que o estudo defendia. Para acrescentar mais dados sobre o tema, recomenda-se ampliar esta pesquisa com a avaliação conjunta da formação de CLS com a dosagem sanguínea de progesterona e da gonadotrofina coriônica equina.

Palavras-chave: Ultrassonografia Doppler, Corpos Lúteos Suplementares, Vascularização.

ABSTRACT

CAMPOS, Diego Guedes. **Use of Doppler ultrasound in evaluating the blood flow of luteal accessories bodies in cyclical pregnant mares.** 2015. XXf. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia Clínica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The theme of this study is the use of Doppler ultrasound in evaluating the blood flow of corpus luteum accessories (CLA) in cyclical pregnant mares because this technique associated with conventional ultrasound, has shown great value in assessing the hemodynamic aspects of the reproductive organs mares, aiding in assisted reproduction programs. It is known that the maintenance of pregnancy requires constant synthesis of progesterone and, given the close relationship between the vascular perfusion of the corpus luteum (CL) and CLA and the serum concentration of progesterone, Doppler ultrasound can be used at the time of involution of the embryo to evaluate the functionality of corpus luteum. Thus, this study aimed to describe the ultrasound changes of CLA in pregnant mares using the Doppler ultrasound technique. The study brought two problem issues: the first is the formation of CLA by mares is really needed to keep their pregnancy; and the second is whether it is possible to estimate a good vascularization of the CLA without the need to use the programs to evaluate pixel, that is, the subjective evaluation is reliable and efficient for field veterinarian? The hypothesis defended in this research are that the formation of CLA is essential for maintaining pregnancy in mares, and that the subjective assessment can be rather reliable for field veterinarian. For this, the study monitored 20 crossbreed mares pregnant ($n = 20$) to follow the onset and development of CLA, these then analyzed for their haemodynamic through Doppler ultrasound. The results of this research show that 75% of the evaluated mares formed CLS, with no significant differences between the number of CLS in terms of objective and subjective evaluations ($P > 0.05$), but with differences in time of formation of CLA in relation to subjective evaluations, pixel and pixel intensity ($p > 0.05$). It was also observed that vascular perfusion (VP) luteal from 70 days of gestation did not differ between the degrees of variables, getting the most out of the vasculature to the 119 days, indicating the most mature CLA and, from that period, can realize a decrease of VP structures. The study demonstrated that the subjective evaluation is reliable and efficient for field veterinarian, however, five mares ($n = 5$) of the study did not develop CLA and still maintained their pregnancy, contradicting the hypothesis that the study advocated. To add more data on the subject, it is recommended to extend this research to the joint assessment of formation CLA with blood dosage of progesterone and chorionic gonadotropin equine.

Keywords: Doppler Ultrasound, Supplementary Corpora Lutea, Vascularization.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

	Pág.
Figura 01 Ultrassonografia de ovário de égua prenhe (com 65 dias de gestação) que demonstra corpo lúteo primário (CL) de gravidez no ovário direito e corpo lúteo suplementar (cl) no ovário esquerdo.....	06
Figura 02 Representação ultrassonográfica de modo-B, de foliculos pré-ovulatórios um dia (A,B) antes de ovular.....	09
Figura 03 Exame ultrassonográfico Doppler modo colorido.....	10
Figura 04 Imagem ultrassonográfica no modo Doppler espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino.....	12
Figura 05 Imagens ultrassonográficas Doppler, função Power-flow, de folículos pré-ovulatórios e os respectivos corpos lúteos oito dias pós-ovulação, em éguas.....	20
Figura 06 Média (\pm e.p.m) para área luteal, área de fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas.....	21
Figura 07 Exame ultrassonográfico modo color Doppler de corpos lúteos de éguas....	22
Figura 08 Imagens da perfusão vascular luteal durante oito dias pós-ovulação (D0 a D8), obtidas por meio da ultrassonografia Doppler colorida, função <i>Power-flow</i>	23
Figura 09 Imagem ultrassonográfica de um CL acessório equino.....	25
Figura 10 Imagens ultrassonográficas Doppler, função <i>Power-flow</i> , de um corpo lúteo equino.....	26
Figura 11 A- Imagem formato TIFF extraída do programa Adobe PhotoShop CC 2014. B- Análise de histograma obtida pelo programa imaj j. C- visualização dos valores de pixel e intensidade pelo Excel 2010.....	27
Figura 12 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 5% da perfusão luteal.....	30
Figura 13 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 10% da perfusão luteal.....	30
Figura 14 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 20% da perfusão luteal.....	30
Figura 15 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 30% da perfusão luteal.....	30

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS (Cont.)

	Pág.
Figura 16 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 40% da perfusão luteal.....	31
Figura 17 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 50% da perfusão luteal.....	31
Figura 18 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 60% da perfusão luteal.....	31
Figura 19 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 70% da perfusão luteal.....	31
Figura 20 Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função <i>power</i> , CLa 80% da perfusão luteal.....	31
Gráfico 01 Avaliação subjetiva das éguas (n=15) com formação de corpos lúteos acessórios durante a estação reprodutiva, Novembro de 2013.....	32
Gráfico 02 Avaliação objetiva (Pixel e Int. Pixel) das éguas (n=15) com formação de corpos lúteos acessórios durante a estação reprodutiva, Novembro de 2013.....	33
Gráfico 03 Imagem representativa das avaliações subjetivas em relação ao tempo de formação.....	35
Gráfico 04 Análise de regressão linear simples, avaliação subjetiva em relação ao número de pixel.....	36

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 01 Fase reprodutiva encontrada no início do primeiro trimestre após confirmado o diagnóstico gestacional, primeira detecção dos CLS por meio da ultrassonografia modo B e modo Doppler função <i>power</i> , total de CLS formados até os 105° dias.....	29
Tabela 02 Efeito do macho na formação ou não de corpos lúteos suplementares em éguas.....	32
Tabela 03 Avaliação qualitativa do corpo lúteo subjetivo, número de pixel e intensidade de pixel pelos números de corpos lúteos acessórios.....	33
Tabela 04 Avaliação subjetiva dos corpos lúteos acessórios, número de pixel e intensidade de pixel pelo tempo de avaliação.....	34
Tabela 05 ICP para as variáveis (Cl subj., pixel, int. pixel) oriundas de corpos lúteos acessórios de éguas de 35 a 140 dias gestação.....	36

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Ciclo Estral da Égua	3
2.2 Formação Do Corpo Lúteo Primário	4
2.3 Corpos Lúteos Secundários	5
2.4 Ultrassonografia na Reprodução Equina	7
2.5 Princípios da Ultrassonografia Doppler	8
2.6 Perfusão Vascular Ovariana	13
2.7 Avaliação da Ultrassonografia Doppler Pré-Cobertura.....	13
2.8 Avaliação da Ultrassonografia Doppler Pós-Cobertura	15
2.9 Avaliação Uterina Pós-Cobertura.....	16
2.10 Diagnóstico e Monitoramento Gestacional	16
2.11 Perfusão Vascular Luteal.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Localização e Período Experimental	24
3.2. Delineamento Experimental	24
3.3 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÕES.....	45
7 RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

O tema do presente estudo é a utilização da ultrassonografia (US) Doppler na avaliação do fluxo sanguíneo dos corpos lúteos acessórios em éguas gestantes cíclicas. Justifica-se a escolha do tema, pois, no cenário atual, muitas inovações tecnológicas vêm sendo criadas para aprimorar cada vez mais o diagnóstico e a terapêutica na Medicina Veterinária. Neste contexto, a técnica de US Doppler, associada à US convencional, vem demonstrando grande valor na avaliação dos órgãos reprodutivos em éguas, auxiliando nos programas de reprodução assistida, fornecendo informações imediatas sobre a fisiologia do fluxo sanguíneo de vasos, tecidos e órgãos do sistema reprodutivo, inclusive os corpos lúteos e corpos lúteos acessórios, e, por meio desse novo conhecimento, conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução equina estão sendo reavaliados.

Constata-se que a US Doppler pode ser empregada com sucesso no diagnóstico auxiliar de distúrbios na ovulação, além de avaliar o status funcional do corpo lúteo (CL). Levando-se em consideração que o desenvolvimento da funcionalidade luteal está estritamente relacionado com o rápido desenvolvimento e regressão de um sistema vascular local, esta ferramenta pode ser usada para determinar o status funcional desta estrutura.

Conforme explicam os autores Allen e Stewart (2001) e Ferreira e Meira (2011), sabe-se que a manutenção da gestação em éguas, assim como nas demais espécies domésticas, requer constante síntese de progesterona (P4) e, considerando a íntima relação entre a perfusão vascular do corpo lúteo (CL) e a concentração sérica de P4, a US Doppler pode ser empregada no momento da inovulação do embrião para avaliar a funcionalidade do CL e, dessa forma, selecionar a receptora com perfil progesterônico mais adequado e/ou para determinar se a suplementação com P4 exógena se faz necessária.

Segundo explicam Silva, Puoli Filho e Meira (2012), além do corpo lúteo primário (CL) há também os corpos lúteos suplementares (CLS), compostos pelos corpos lúteos acessórios, resultantes da luteinização dos folículos anovulatórios, e pelos corpos lúteos secundários, formados a partir da ovulação de alguns folículos (ou seja, ovulações de folículos dominantes de ondas secundárias durante o diestro ou durante a gestação, quando prevalece a progesterona), que também constituem uma fonte de progesterona que contribui para a manutenção da gestação nos equinos. Ou seja, acredita-se que, para manter a gestação, a égua precisa desenvolver CLS. Assim, estudos envolvendo os corpos lúteos suplementares permitem o esclarecimento da real contribuição destes à manutenção da gestação e possibilita

a redução do tempo de tratamento de protocolos hormonais utilizados em receptoras acíclicas, amplamente utilizados em programas de transferência de embriões (TE).

Em função do exposto, o presente estudo objetivou descrever as alterações ultrassonográficas da vascularidade dos corpos lúteos acessórios em éguas gestantes, utilizando a técnica de US Doppler.

Os objetivos específicos deste estudo envolvem: Avaliar a formação ou não e a quantidade de corpos lúteos acessórios em éguas gestantes; Avaliar a formação, vascularização e regressão dos corpos lúteos acessórios em éguas até 140 dias de gestação; Comparar as avaliações subjetivas e objetivas para determinar o grau vascular dos corpos lúteos acessórios; Nas avaliações objetivas comparar o número de pixel e intensidade dos corpos lúteos com os dias após a sua formação.

O estudo trouxe duas questões problema: A primeira é se a formação de corpos lúteos suplementares pelas éguas é realmente necessária para manter sua gestação; e a segunda é se é possível estimar uma boa vascularização dos CLS sem a necessidade de usar os programas pra avaliar pixel, ou seja, a avaliação subjetiva é fidedigna e eficiente para o veterinário de campo? A pesquisa defendeu as hipóteses de que a formação de corpos lúteos acessórios é fundamental para a manutenção da gestação em éguas; e que a avaliação subjetiva pode ser sim fidedigna para o veterinário de campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL DA ÉGUA

Conforme explica Ley (2006), o êxito de um programa reprodutivo depende essencialmente do conhecimento das bases do ciclo estral, da indução, sincronização e modulação transicional do estro. Também é importante compreender os mecanismos e as teorias dos programas de iluminação artificial para o aumento da estação reprodutiva fisiológica, visto que o ciclo estral das éguas é influenciado pelo fotoperíodo (duração de horas luz por dia). Assim, a conduta clínica se torna facilitada pela familiarização com os eventos fisiológicos e endócrinos do estro na égua.

O ciclo estral da égua apresenta duração entre 21 a 23 dias, podendo ser dividido em fases de predominância estrogênica ou estro (de 5 a 7 dias) e progesterônica ou diestro (de 14 a 16 dias). Normalmente, o ciclo estral das éguas é constituído por uma onda folicular e a ovulação ocorre 48 horas antes do término do cio. As éguas são animais poliestrais estacionais que apresentam ovulações em períodos do ano correspondentes à maior oferta de luminosidade ambiental, porém alguns fatores adicionais também influenciam a ciclicidade sexual das éguas, como por exemplo, nutrição, idade e temperatura ambiental (MCKINNON et al, 2011).

De acordo com a oferta de luz (fotoperíodo) ao longo do ano nota-se que a atividade sexual fica diminuída ou ausente durante o inverno (estação anovulatória), transicional crescente durante a primavera (estação transicional de primavera), máxima durante o verão (estação de monta), e transicional decrescente no outono (estação transicional de outono). Esta variação na atividade sexual está intimamente relacionada com a concentração circulante de melatonina, sendo sua síntese e secreção relacionadas com o fotoperíodo, estando aumentadas e diminuídas em dias curtos e longos, respectivamente. Em altas concentrações, ou seja, em dias curtos, a melatonina inibe os pulsos de GnRH e gonadotrofinas e, posteriormente, a atividade gonadotrófica (GINTHER, 1992; GINTHER et al., 2004).

Assim, éguas mantidas sob dias longos (16 h de luz/dia) apresentam atividade ovariana cíclica e éguas mantidas em dias curtos (8,5 h de luz/dia) apresentam ovário sem ciclicidade (animal em anestro). Esta variação ocorre em função de dias curtos, quando se associa o decréscimo na secreção de gonadotrofinas hipofisárias acarretando uma redução da atividade ovariana (NAGY; GUILLAUME; DAELS, 2000; DAELS, 2004).

2.2 FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO PRIMÁRIO

A luteogênese consiste em todas as mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem no folículo ovulatório até que se transforme em corpo lúteo funcional capaz de secretar grandes quantidades de progesterona. O processo de luteinização pode ser dividido em três estágios: desenvolvimento (luteogênese), maturação e regressão (luteólise). A luteogênese começa antes da ovulação, com mudanças na população de receptores de gonadotrofinas, os quais estão localizados na membrana citoplasmática e que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína de ligação ao nucleotídeo guanina, a proteína G, que é a gonadotrofina que mais atua nestes receptores, levando à ruptura do folículo e sua posterior transformação em estrutura lútea que é concluída três dias após a ovulação (D0 = dia da ovulação). Este crescimento das células luteais pode ser observado até o D9 (RICHARDS; HEDIN, 1988; NISWENDER; NETT, 1993; WUTTKE et al., 1997; KOHEK; LATRONICO, 2001; MOURA, 2003).

Após o processo ovulatório a região ocupada pelo folículo é invadida por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune, células endoteliais, células da teca interna (CTI) e células da granulosa (CG), que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia. Esse conjunto de células promove, inicialmente, a formação de uma estrutura denominada de corpo hemorrágico, que se reorganiza para a formação do corpo lúteo (DIAZ et al., 2002; SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002; WEBB; WOAD; ARMSTRONG, 2002; BERTAN, 2004).

De acordo com La Paz et al. (2007), a regulação da função luteínica é feita por um complexo grupo de agentes que interagem na busca da homeostasia da glândula, portanto as células que vão originar o corpo lúteo sofrem influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos.

O processo de ativação e liberação do fator plaquetário de crescimento, juntamente com a ação do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), do fator de crescimento semelhante à heparina, do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e, sobretudo, das gonadotrofinas, mais particularmente do LH (que transitoriamente está em concentração mais elevada no plasma), atuam para transformar as células da granulosa e as células da teca em células luteínicas. Assim, as organelas, os substratos e as enzimas contidas nas células luteais esteroidogênicas presentes no corpo lúteo irão determinar sua capacidade em sintetizar progesterona (SCHAMS; BERISHA, 2004; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

O processo de formação de capilares sanguíneos, denominado angiogênese, é de extrema importância na formação e manutenção do corpo lúteo, assegurando a sua nutrição e trocas respiratórias, indispensáveis para a sua viabilidade, permitindo o desempenho de suas funções, sendo a angiogênese dependente do complexo balanço entre fatores estimuladores e inibidores. As mudanças na rede vascular do CI estão presentes em toda fase luteal, que envolve numerosos fatores angiogênicos. A densidade microvascular aumenta durante as fases de desenvolvimento e manutenção do CL, enquanto que uma diminuição da mesma pode ser observada no período próximo à luteólise (BERISHA; SCHAMS, 2005; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007; FERREIRA-DIAS et al., 2006).

2.3 CORPOS LÚTEOS SECUNDÁRIOS

É importante saber que as mudanças endocrinológicas que ocorrem em éguas durante a gestação são diferentes das observadas para os demais animais domésticos, devido à formação de estruturas temporárias produtoras de hormônio, os cálices endometriais. Após a ovulação, o corpo lúteo primário passa a produzir progesterona, e esta produção atinge níveis plasmáticos de 6 a 10ng/ml no quinto dia e continuam a crescer, na égua prenhe, até os dias 35° a 40° de gestação, quando a gonadotrofina sérica de égua prenhe (eCG) começa a ser produzida pelos cálices endometriais. No início do segundo mês de gestação, os cálices endometriais são formados, e correspondem a formações discretas de tecido altamente compactado presentes no corno gravídico, resultante da invasão de células trofoblásticas para dentro do endométrio (GINTHER, 1992; SAMPER, 2009; BRINSKO et al., 2011; MATTA, 2013).

A eCG parece ter efeito luteotrófico em equinos e outras espécies, sendo possível verificar aumento na concentração sanguínea de progesterona após o aumento natural ou por aplicação de eCG exógena. A quantidade de atividade biológica do tipo LH da molécula de eCG parece estar ligada com a quantidade de ácido siálico presente na sua estrutura molecular, pois foi demonstrado que com a utilização de enzimas que digerem o ácido siálico, ocorre um aumento da ação de LH na molécula da eCG (MURPHY; MARTINUK, 1991).

Sabe-se ser necessária a constante síntese de progesterona, para promover a manutenção da gestação, e que a progesterona tem inicialmente origem ovariana, sendo secretada pelo corpo lúteo primário (CLP). A partir dos 36° a 40° dias de gestação, esta produção é feita pelo conjunto do CLP com os corpos lúteos suplementares (CLS). Com,

aproximadamente, 180 dias de gestação não há mais produção de progesterona pelos corpos lúteos da égua, sendo esta feita pela unidade feto-placentária, que embora já venha contribuindo com a produção de progestágenos no período anterior à regressão dos CLS, enfim assume a produção até a fase final da gestação (GINTHER, 1992; GRECO et al. 2008; SAMPER, 2009; BRINSKO et al., 2011; SILVA; PUOLI FILHO; MEIRA, 2012, MATTA, 2013).

Afinal, durante o período de expansão do alantocório, entre os dias 40 e 120 de gestação, as células trofoblásticas adquirem capacidade de sintetizar diversos hormônios, dentre eles a progesterona. Desta forma, entre os dias 70 e 150 de gestação, as concentrações de progesterona e progestágenos encontrados no plasma representam uma mistura de P4 secretada pelos corpos lúteos primário e suplementares em processo de declínio e pelos progestágenos da placenta secretados pelo alantocório em crescimento. Nas últimas 4 a 6 semanas de gestação, as glândulas adrenais em crescimento e em processo de maturação do feto secretam quantidades crescentes de pregnenolona, a qual é convertida à progestágeno pelo alantocório (SILVA, 2012).

Hafez e Hafez (2004) cita no seu estudo que a eCG possui atividade biológica semelhante tanto ao FSH quanto ao LH, no entanto, predominantemente ao FSH. A secreção da eCG estimula o desenvolvimento de folículos ovarianos e alguns chegam a ovular, mas a maioria transforma-se em folículos luteinizados, devido à ação de LH. Esses folículos luteinizados resultam em corpos lúteos acessórios, produzindo progesterona e contribuindo para a manutenção da gestação.

Conforme explicam Silva, Puoli Filho e Meira (2012) e Brinsko et al. (2011) , os corpos lúteos suplementares (CLS) são estruturas ovarianas que se desenvolvem a partir dos 36° a 40° dias de gestação, através do estímulo hormonal da gonadotrofina coriônica equina (eCG), secretada pelos cálices endometriais. Estes CLS são compostos pelos corpos lúteos acessórios, resultantes da luteinização dos folículos anovulatórios, e pelos corpos lúteos secundários, que são formados a partir da ovulação de alguns folículos (Figura 01). A suplementação de progesterona por estes corpos lúteos possui tempo limitado, e a regressão dessas estruturas está ligada ao mecanismo de regressão dos cálices endometriais, embora esta última ocorra antes da regressão dos CLS.

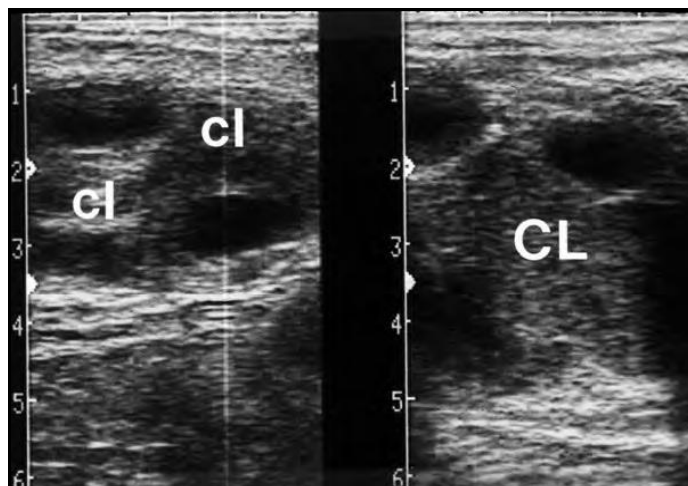


Figura 01: Ultrassonografia de ovário de égua prenhe (com 65 dias de gestação) que demonstra corpo lúteo primário (CL) de gravidez no ovário direito e corpo lúteo suplementar (cl) no ovário esquerdo.
Fonte: BRINSKO et al., 2011.

2.4 ULTRASSONOGRÁFIA NA REPRODUÇÃO EQUINA

A US por imagem em tempo real foi utilizada pela primeira vez na reprodução equina em 1980. A partir daí, o desenvolvimento da técnica permitiu melhorar a compreensão dos eventos fisiopatológicos, formando uma nova base de conhecimentos necessária para outras biotecnologias, as quais desempenham papéis importantes para acelerar a multiplicação de animais superiores (BRINSKO et al., 2011).

Na transferência de embriões, o manejo consiste basicamente em monitorar o comportamento reprodutivo, com emprego da palpação transretal e US, para monitorar a atividade folicular e ovulação, e o uso de hormônios exógenos para sincronizar o estro e ovulação. Quando em cio, a égua doadora é examinada diariamente para monitorar o crescimento folicular, permitindo o ótimo momento para inseminação, seja com sêmen fresco, refrigerado ou congelado. Atualmente, a sincronização entre doadora e receptora é uma técnica comumente realizada para TE e, em todos os protocolos de sincronização empregados, monitora-se o crescimento folicular por US (VANDERWALL; WOODS, 2007; LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009).

2.5 PRINCÍPIOS DA ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

Cerri, Mólnar e Vezozzo, (1996) explicam que a US Doppler, apesar de ser uma ferramenta recente no cotidiano da Medicina Veterinária, já havia sido estudada em 1842, por um pesquisador austríaco, Johann Christian Doppler, que descreveu o efeito Doppler como a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto que se encontra em movimento em relação ao observador.

Seguindo este princípio, a US Doppler baseia-se na movimentação das hemácias em relação ao transdutor, de forma que alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representados por imagens com específicas cores e tonalidades (FEIGENBAUM, 1986; GINTHER, 2007).

Assim, a US Doppler vem sendo usada em TE para avaliação dos corpos lúteos, sendo este um método relativamente recente em Medicina Veterinária. A ferramenta Doppler fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos, e o conhecimento dos princípios físicos básicos desta técnica auxiliam na compreensão do método (GINTHER; UTT, 2004; CARVALHO; CHAMMAS; CERRI, 2008).

Dessa forma, esta ferramenta, associada à US convencional, demonstrou ser efetiva, prática e não invasiva para avaliar os aspectos hemodinâmicos dos órgãos reprodutivos (útero e ovários) em grandes animais (BOLLWEIN et al., 2002b; GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007; SILVA; GINTHER, 2010),

O chamado efeito Doppler (fd) pode ser definido como sendo o princípio físico no qual se verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas quando o objeto (corpo) refletor se move em relação a uma fonte de onda sonora. Supondo que o transdutor do equipamento capte o movimento de um objeto analisado, deve-se esperar um deslocamento da frequência incidente sobre o objeto, promovendo aumento da resposta quando ambos se aproximam, e redução quando se afastam. No âmbito médico e veterinário, este efeito é usado durante o exame dos vasos sanguíneos. As hemácias em movimento dentro dos vasos, ao encontrarem uma onda sonora, comportam-se como corpos refletores. O estudo por meio do Doppler registra o movimento do sangue no sistema cardiovascular. A diferença entre a frequência do som transmitido e a daquele refletido é chamada deslocamento de frequência Doppler (VERMILLON, 1997; SZATMARI et al., 2001; GINTHER; UTT, 2004).

De acordo com Ginther (2007) e Ferreira, Ignácio e Meira (2011), o advento da US colorida Doppler na reprodução equina possibilitou reavaliar conceitos antes considerados

definitivos quanto à fisiologia da reprodução. Essa técnica demonstrou ser efetiva e prática para a avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão vascular do trato reprodutivo de equinos.

A técnica de US Doppler apresenta três modos de ação distintos: Modo-B, que utiliza escalas de cinza e é primordialmente empregado para identificação de estruturas anatômicas a serem avaliados posteriormente pelo modo colorido; Modo-Doppler, que é subdividido em funções *color* e *power-flow*, e nesta técnica é possível estimar a perfusão sanguínea tecidual, levando-se em consideração a porcentagem de tecido com pixels coloridos durante o exame; Modo espectral, que fornece valores exatos sobre a velocidade do fluxo sanguíneo e índice Doppler vascular e tecidual (GINTHER; MATTHEW, 2004).

Segundo Palmer e Driancourt (1980) e Ginther (2007), desde a década de 80, o uso da US em escala de cinza (modo B) revolucionou os métodos de diagnosticar e monitorar os eventos reprodutivos e as devidas alterações morfológicas do trato reprodutivo na espécie equina. Ginther (2007) explica que o modo-B (Figura 02), que utiliza escalas de cinza, é primordialmente empregado para a identificação anatômica de estruturas que devem ser avaliadas posteriormente pelos modos coloridos.

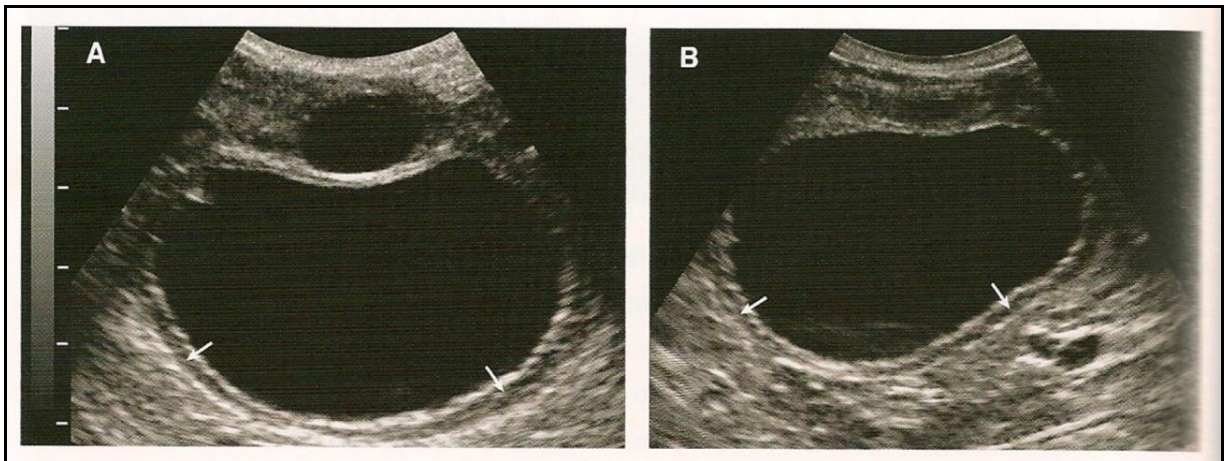


Figura 02: Representação ultrassonográfica de modo-B, de folículos pré-ovulatórios um dia (A, B) antes de ovular.

Fonte: GINTHER, 2007.

No Modo-Doppler, subdividido em funções *color* e *power-flow*, há vários volumes de amostragem dentro de uma região circunscrita (caixa colorida). O sinal obtido para cada um desses elementos de amostragem é codificado por cores, em relação ao sentido do movimento, e por nuances, em relação ao módulo da velocidade do movimento. Sobre a imagem em

tempo real é apresentada outra imagem, colorida, que representa um mapeamento dos elementos móveis em relação à intensidade e ao sentido do movimento. Por convenção, o fluxo que se direciona ao sentido do transdutor é representado em vermelho, enquanto o fluxo que se afasta em azul. O fluxo sanguíneo mais rápido tende a apresentar tonalidades claras, como amarelo e laranja, quando em direção ao transdutor, quando em sentido contrário ao transdutor as tonalidades de cores podem variar em azul claro e vermelho e verde (Figura 03) (KAWAKAMA; KODAIRA; CERRI, 1993; FINN-BODNER; HUDSON, 1998; SZATMÁRI et al., 2001; CARVALHO; CHAMMAS; CERRI, 2008).

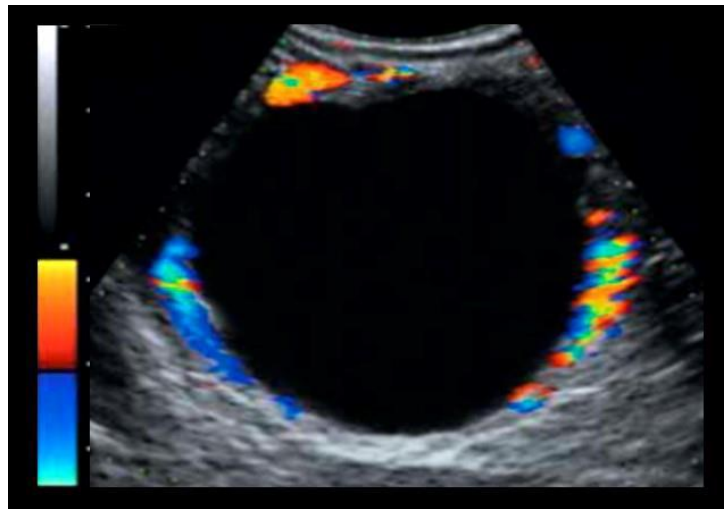


Figura 03: Exame ultrassonográfico Doppler modo colorido. Corte transversal do folículo de égua, mostrando a perfusão vascular através dos sinais coloridos.
Fonte: GASTAL et al., 2006.

Deste modo é possível estimar a perfusão sanguínea tecidual, levando-se em consideração a porcentagem de tecido com pixels coloridos durante o exame. Já o modo-espectral fornece valores exatos de velocidades de fluxo sanguíneo e índices Doppler vasculares e teciduais (GINTHER; MATTHEW, 2004; SILVA, 2010).

Na função *Power Doppler* a imagem extraída é semelhante ao Doppler colorido, entretanto o deslocamento do fluxo sanguíneo é processado utilizando apenas uma escala de cor, laranja, e a intensidade dos pontos coloridos varia de acordo com a força dos sinais Doppler (número de hemácias movendo-se em uma velocidade específica) (SZATMÁRI et al., 2001).

Segundo Ginther (2007), a intensidade de pontos refere-se ao grau de brilho dos pontos coloridos Doppler. A intensidade total de pontos coloridos é a soma de todos os níveis de brilho para cada ponto colorido gerado pelo equipamento ultrassonográfico. A intensidade total de pontos dividida pelo número de pontos será considerada a intensidade média, conforme explicam Silva e Ginther (2010).

Segundo Bollwein et al. (1998), os primeiros estudos com US Doppler baseavam-se em informações obtidas nas grandes artérias (artérias ovariana, uterina e vaginal) responsáveis pela suplementação sanguínea do trato reprodutivo. Porém, estudos mais recentes, como os de Silva et al. (2005), Silva e Ginther (2006), Ferreira, Gastal e Ginther (2008), Ginther et al. (2008) e Ferreira, Ignácio e Meira (2011) tendem a realizar exames diretamente no tecido alvo, como, por exemplo, endométrio, parede folicular e corpo lúteo, ou em vasos próximos. Assim, a US Doppler serve como diagnóstico auxiliar de distúrbios na ovulação e avaliação do status funcional do corpo lúteo.

O modo espectral ou pulsado é utilizado para avaliar o fluxo sanguíneo em tempo real, em vaso de grande calibre ou em uma parte dele (STOUT, 2011). Essas informações sobre o fluxo sanguíneo em função do tempo são demonstradas na forma de um gráfico, onde o eixo horizontal representa o tempo e o eixo vertical a frequência de deslocamento Doppler (FINN-BODNER; HUDSON, 1998; CARVALHO, 2009). Neste gráfico, a linha de base horizontal representa o fluxo zero, o fluxo em direção ao transdutor é representado acima da linha de base e abaixo desta linha é demonstrado o fluxo em direção oposta (FINN-BODNER; HUDSON, 1998; SZATMÁRI et al., 2001).

Essa avaliação quantitativa é realizada de acordo com as alterações do som emitido e do eco captado, e a amplitude dos mesmos é utilizada para gerar uma representação gráfica da velocidade do fluxo sanguíneo, e cada ciclo dessa onda representa um ciclo cardíaco completo (picos de sístole e diástole); sendo o máximo do pico sistólico representado pelo ponto mais elevado no gráfico espectral (PSV), da mesma forma que o ponto mais baixo no gráfico imediatamente anterior ao próximo pico sistólico, representa a velocidade final da diástole (EDV). A média de todas as velocidades máximas do ciclo cardíaco dividida pelo tempo de duração do mesmo é chamada de média das máximas velocidades (TAMV) (GINTHER, 2007; SILVA, 2010).

Contudo, o modo espectral pode ser utilizado para mensurar o fluxo sanguíneo se o ângulo entre o transdutor e o vaso sanguíneo for recriado a cada mensuração, o que nem sempre é passível de ser calculado. Devido à dificuldade da análise, por se utilizar US transretal e apresentação de vasos tortuosos nos quais o escaneamento de um segmento em

corte longitudinal não é possível, dessa forma impossibilitando o cálculo do ângulo de insonação e conseqüentemente não obtendo as velocidades reais do fluxo (SILVA, 2010), deve-se utilizar o índice de resistência (RI) e pulsatilidade (PI), que são razões que não dependem do ângulo e indicam resistência ao fluxo (CERRI et al., 1996; STOUT, 2011).

RI e PI apresentam correlação negativa com a perfusão vascular pela artéria em questão, ou seja, quanto maior o RI menor a perfusão vascular, e quanto maior o PI menor a perfusão sanguínea em tecidos distantes (RIVERS et al., 1996; SHOKEIR et al., 2002; ACOSTA et al., 2004a; GINTHER et al.; 2004; GINTHER, UTT, 2004). Além disso, possuem boa representação da hemodinâmica, e não apresentam variações elevadas entre mensurações repetidas em um mesmo indivíduo, em um mesmo momento (SILVA, 2010).

Ginther e Utt, (2004) relatam em seu estudo que, as características espectrais do fluxo sanguíneo de um determinado vaso são acessadas por meio do posicionamento de um cursor de volume de amostra (*gate*) sobre o lúmen do vaso, sendo gerado o gráfico espectral (Figura 04).

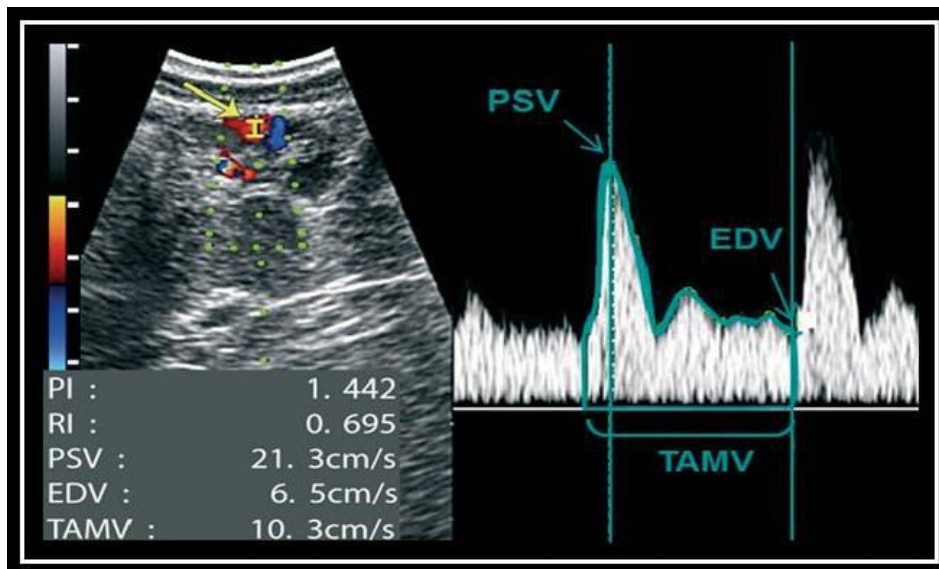


Figura 04: Imagem ultrassonográfica no modo Doppler espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O posicionamento do cursor Doppler está sobre o lúmen do vaso sanguíneo obtendo um gráfico espectral. A velocidade máxima é representada pelo pico sistólico (PSV) e a velocidade final de um ciclo cardíaco é representada pela velocidade diastólica final (EDV).

Fonte: FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011.

2.6 APLICAÇÕES A ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

2.6.1 Perfusão Vascular Ovariana

A US modo-B facilita a predição do momento da ovulação pela observação de alterações morfoecogênicas do folículo dominante, como formato do folículo, ecogenicidade e espessura da camada da granulosa e presença de banda anecóica (PIERSON; GINTHER, 1985, GASTAL; GASTAL; GINTHER, 1998).

Além disso, mudanças na hemodinâmica ovariana são detectadas durante todo o desenvolvimento folicular e estão relacionadas com o remodelamento do tecido ovariano e do sistema vascular responsável por sua irrigação (ACOSTA et al., 2003; GINTHER et al., 2007b).

Logo, a US Doppler pode ser eficaz na determinação do potencial ovulatório de folículos dominantes durante o período de transição de primavera (ACOSTA et al., 2004a; GASTAL et al., 2007) assim como ao longo da estação reprodutiva (ACOSTA et al., 2004b; GASTAL et al., 2006; GINTHER et al., 2007a; GINTHER et al., 2009; ALTERMATT et al., 2012; ULIANI, 2012; ROMANO, 2013).

2.6.2 Avaliação da Ultrassonografia Doppler Pré-Cobertura

O acompanhamento do desenvolvimento folicular em éguas é feito por meio da US convencional, levando-se em consideração alterações morfoecogênicas, como descrito por Pierson e Ginther (1985) e Gastal, Gastal e Ginther (1998).

A tecnologia Doppler oferece uma nova alternativa para a avaliação do desenvolvimento e potencial ovulatório de folículos dominantes (FERREIRA; MEIRA, 2011), porque mudanças na hemodinâmica ovariana podem ser detectadas durante todo o desenvolvimento folicular e estão relacionadas com o remodelamento do tecido ovariano e do sistema vascular responsável por sua irrigação (GINTHER, 2007).

Em éguas, o período de transição de primavera, que é no início da atividade reprodutiva, é caracterizado pelo desenvolvimento de ondas foliculares maiores anovulatórias. Durante essa fase, folículos dominantes apresentam taxa de crescimento e dimensões semelhantes ao observado durante a estação reprodutiva, um aumento progressivo da vascularidade a partir da divergência ocorre somente em futuros folículos ovulatórios,

enquanto folículos anovulatórios possuem baixa vascularidade independentemente de seu diâmetro (ACOSTA et al., 2004a).

Os folículos pré-ovulatórios podem apresentar baixa perfusão sanguínea mesmo durante a estação reprodutiva. Silva et al. (2006) relataram uma relação entre vascularidade elevada de folículos pré-ovulatórios com maiores taxas de prenhez. Sabe-se que, em éguas, tanto folículos pré-ovulatórios com alta vascularidade, quanto folículos com baixa vascularidade, originam CLs funcionais e semelhantes (ROMANO et al., 2012). Logo, pode-se concluir que a irrigação do futuro folículo ovulatório não está relacionada com a posterior função secretora do CL e, desta forma, os motivos pelos quais éguas com folículos pré-ovulatórios com baixa irrigação sanguínea apresentam menores taxas de prenhez ainda são incertos.

Ao se realizar uma inseminação artificial com sêmen congelado, preconiza-se que a infusão de sêmen seja realizada o mais próximo possível do momento da liberação do oócito. Logo, a determinação da iminência da ovulação é uma ferramenta importante para a obtenção de resultados satisfatórios (SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007). De acordo com Gastal, Gastal e Ginther (2006), a vascularidade folicular em éguas é máxima 24 horas antes da ovulação espontânea, ou induzida com hCG, e uma diminuição abrupta da perfusão sanguínea folicular ocorre durante as quatro últimas horas que antecedem a ovulação. Resultados parciais indicam que a vascularidade do folículo dominante mantém-se constante durante as últimas horas pré-ovulatórias (ROMANO et al., 2012; BOAKARI, 2014). Desta forma, a hemodinâmica do futuro folículo ovulatório precisa ser esclarecida para determinar se a US Doppler é ou não uma ferramenta útil para a predição da iminência da ovulação em éguas.

Folículos hemorrágicos anovulatórios (FHAs) são oriundos da falha na ovulação, seguida pela formação de um hematoma no antro folicular (GINTHER; PIERSON, 1984). Aparentemente, a incidência de FHAs é maior durante os meses de intensa atividade ovariana e em éguas tratadas com hormônios indutores de estro e ovulação (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2010), prática esta comum entre médicos veterinários de campo.

Por ser uma importante causa de subfertilidade na espécie equina, FHAs devem ser diagnosticados precocemente, a fim de se evitarem gastos desnecessários com tratamentos hormonais e transporte de sêmen ao longo da estação de monta (FERREIRA; MEIRA, 2011). Entretanto, a decorrência natural desse distúrbio é de difícil predição.

De acordo com Ginther et al. (2006), FHAs possuem proeminente vascularização ao longo de toda sua circunferência durante os dias que antecedem sua formação. Todavia,

futuros folículos ovulatórios também podem apresentar elevada vascularidade na iminência da ovulação (ACOSTA et al., 2004a), o que dificulta a diferenciação entre ambos por meio da avaliação Doppler. Desta forma, a US convencional é a melhor alternativa para o diagnóstico precoce de FHAs, baseando-se no aumento exorbitante em sua taxa de crescimento diário associado à presença de grande quantidade de pontos ecogênicos dispersos no antro folicular.

A tecnologia Doppler auxilia na determinação do melhor momento para o tratamento de FHAs. Hormônios com ação indutora do estro ou ovulação apresentam baixa eficácia no tratamento de folículos hemorrágicos recém-formados. FHAs tendem a se reorganizar e, desse modo, originam estruturas semelhantes ao CL maduro. FHAs com características morfoecogênicas e vasculares semelhantes às de CLs funcionais são responsivas a tratamentos com agentes luteolíticos (FERREIRA, 2013).

2.6.3 Avaliação da Ultrassonografia Doppler Pós-Cobertura

A US Doppler é a única técnica atualmente disponível por meio da qual é possível realizar estudos *in vivo* e de forma não invasiva sobre a hemodinâmica do sistema reprodutivo concomitante com o acompanhamento do desenvolvimento, da manutenção e da regressão do CL. Uma íntima relação entre a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do CL equino foi recentemente descrita por Ginther et al. (2007a, 2007b, 2008). Um aumento simultâneo na vascularidade luteal e na concentração plasmática de P4 é observado entre D1 e D6, enquanto a luteólise funcional é acompanhada por uma diminuição progressiva na perfusão sanguínea do CL (GINTHER et al., 2007b e 2008). Desta forma, a tecnologia Doppler pode ser utilizada na avaliação do *status* funcional do CL, informação importante para a seleção de receptoras no momento da inovulação e, posteriormente, no monitoramento gestacional.

De acordo com Ginther et al. (2007a), éguas com CLs maduros apresentam uma diminuição progressiva na concentração plasmática de P4 e na perfusão sanguínea do CL a partir de, respectivamente, 40 min e 24 h pós-tratamento com PGF2 α . Conseqüentemente, a presença e a intensidade de sinais Doppler sobre o tecido luteal podem ser utilizadas para detectar refratariedade a tratamentos indutores do estro em éguas.

2.6.4 Avaliação Uterina Pós-Cobertura

Em éguas, um aumento no fluxo sanguíneo do útero é observado durante as duas primeiras e a oitava horas pós-IA, o que possivelmente está relacionado com o transporte espermático e o processo de limpeza uterina (FERREIRA, 2012). Além da motilidade espermática, contrações miométriais são imprescindíveis para o transporte dos espermatozoides até o sítio de fertilização durante as primeiras horas pós-infusão de sêmen (TROEDSSON; LIU; CRABOM, 1998), logo após a cobertura ocorre o estabelecimento de um processo inflamatório fisiológico e transitório que tem como objetivo eliminar do trato reprodutivo o excedente de sêmen, debris celulares e possíveis agentes contaminantes (TROEDSSON, 1999). Acredita-se que essas variações devam-se à interação espermatozoide-endométrio e à ação de fatores inflamatórios ou componentes vasodilatadores presentes no plasma seminal.

A US Doppler pode ser utilizada no diagnóstico auxiliar de endometrites persistentes pós-cobertura. Assim como partir da nona hora pós-IA (FERREIRA, 2012), a perfusão sanguínea do útero gestante de éguas é baixa e constante entre D0 e D2 (SILVA et al., 2005; FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2010). Logo, um fluxo sanguíneo uterino elevado durante esses períodos pode indicar o estabelecimento de um processo inflamatório patológico e crônico. Entretanto, estudos a respeito se fazem necessários.

2.6.5 Diagnóstico e Monitoramento Gestacional

Por meio do exame ultrassonográfico modo-B, a vesícula embrionária é visualizada pela primeira vez no lúmen uterino em D11 em 89% das éguas gestantes como uma estrutura anecóica, esférica e com diâmetro aproximado de 4,8 mm (GINTHER, 1983b). Desta forma, e por convenção, o diagnóstico da gestação em rebanhos comerciais equinos é realizado usualmente entre os dias 12 e 15 pós-ovulação. Com a recente evolução na qualidade da imagem ultrassonográfica Doppler, é possível realizar o diagnóstico da gestação entre D8 e D9, quando a vesícula embrionária possui dimensões inferiores a 3,0 mm, essa riqueza de detalhes do modo-B pode auxiliar no diagnóstico precoce de gestações gemelares, nas quais exista uma sobreposição das vesículas embrionárias.

Estudos recentes descreveram a relação entre a presença e a localização da vesícula embrionária com a hemodinâmica do útero grávidico na espécie equina (SILVA; GINTHER,

2006; SILVA et al., 2005; FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2010), o que possui potencial aplicação no diagnóstico de disfunções vasculares uterinas que possam comprometer a interação concepto-maternal e o normal desenvolvimento embrionário/fetal.

Em éguas gestantes, um aumento progressivo na perfusão sanguínea é detectado em ambos os cornos uterinos a partir de D11 (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2010), sendo que um pronunciado aumento na vascularidade é observado no corno que contém a vesícula embrionária quando comparado ao corno contralateral (SILVA et al., 2005). Esse aumento é mais acentuado no tecido endometrial, que está em contato direto com a vesícula embrionária em relação a segmentos adjacentes (SILVA et al., 2005). Soma-se a isso o fato de que, resultados parciais de estudo recente (FERREIRA, 2012) sugerem um efeito negativo da idade sobre a hemodinâmica uterina durante a fase inicial da gestação, já que um aumento progressivo da vascularidade uterina não foi observado em éguas gestantes velhas quando comparadas a éguas jovens (≥ 15 anos e < 6 anos, respectivamente).

De acordo com Silva e Ginther (2006), a futura posição do embrião é indicada por um discreto sinal Doppler presente no endométrio a partir da fixação do concepto. Devido ao fenômeno denominado orientação, espera-se que o embrião propriamente dito seja visualizado pela primeira vez na porção ventral da vesícula embrionária (GINTHER, 1983a). A presença desse discreto sinal Doppler na porção dorsal do endométrio, logo após a fixação, pode ser um indicativo de desorientação embrionária, que predispõe ao desenvolvimento anormal do cordão umbilical e a uma possível descontinuidade da gestação (WILSHER; OUSEY; ALLEN, 2009).

Finalmente, a frequência cardíaca embrionária pode ser facilmente mensurada de forma precoce, por meio da US Doppler, mediante a visualização de sinais coloridos pulsados de forma rítmica sobre o embrião propriamente dito. De acordo com Silva e Ginther (2006), batimentos cardíacos embrionários podem ser detectados entre os dias 17 e 20 pós-ovulação, ou seja, dois dias antes do previamente descrito por Ginther (1995).

A sexagem fetal em éguas, por meio da US convencional, pode ser realizada pela identificação do tubérculo genital e é recomendada para estágios iniciais de desenvolvimento fetal (CURRAN; GINTHER, 1991) ou pela diferenciação anatômica das gônadas e genitália externa do concepto, e é utilizado em gestações intermediárias a avançadas (a partir de D58 e entre D120 e D210, respectivamente) (BUCCA, 2005). Ambas as técnicas apresentam elevado grau de precisão. Entretanto, Curran e Ginther (1991) relatam uma inadequada visualização do tubérculo genital a partir de 64º dia de gestação.

De acordo com Resende, Carmo e Alvarenga (2012), a US Doppler pode auxiliar na determinação do sexo fetal por permitir a visualização da perfusão sanguínea tecidual de testículos e ovários. Em machos, sinais coloridos Doppler são visualizados na região do plexo pampiniforme e na veia testicular, enquanto uma exacerbada perfusão sanguínea é detectada entre as regiões cortical e medular de gônadas fetais do sexo feminino. Conforme relatado pelos autores, esse método de avaliação apresentou uma acurácia de 100% na determinação do sexo fetal em 120 éguas gestantes entre D100 e D160. Desta forma, informações quanto à vascularidade tecidual associadas à maior riqueza de detalhes anatômicos oferecida por equipamentos Doppler modernos propiciam uma precisão maior no diagnóstico do sexo fetal em éguas.

2.6.6 Perfusão Vascular Luteal

Concomitante e subsequente à ovulação, as células da granulosa sofrem mudanças bioquímicas e morfológicas, processo denominado luteinização, que envolve as alterações morfogenéticas das células da granulosa, inicialmente produtoras de estrógeno, em células luteais secretoras de P4, em associação a uma intensa neovascularização (BERGFELT; ADAMS, 2011).

O CL é uma estrutura dinâmica que devido a sua atividade funcional curta e transitória, de aproximadamente 14 dias, demanda rápido desenvolvimento e regressão de um extenso sistema vascular, sendo um dos tecidos mais vascularizados do corpo (GINTHER, 2007).

Segundo Ginther et al. (2007b), após a ovulação a área de fluxo sanguíneo luteal aumenta de forma constante e progressiva até envolver praticamente toda sua área ao redor do 6º dia pós-ovulação. Entre D8 e D14, a perfusão vascular (PV) luteal apresenta valores máximos, seguido por uma queda durante o período de luteólise. Durante este período, a concentração plasmática de P4 apresenta um perfil semelhante, caracterizando uma relação entre a PV e concentração plasmática de P4. Da mesma forma, Bollwein et al. (2002a), por meio de dados coletados da artéria ovariana, observaram uma relação entre o aporte sanguíneo ovariano e a concentração plasmática de P4 (BOLLWEIN et al., 2002b).

Resultados obtidos por análise imuno-histoquímica foram semelhantes aos obtidos na US Doppler, e Al-Zi'Abi, Watson e Fraser (2003), observaram que, após a ovulação, há uma invasão das células endoteliais na cavidade do corpo hemorrágico resultando no início do

processo de vascularização inicialmente ruim, entre as células luteais. Já no D10, caracterizou-se uma completa e densa rede de capilares. Durante a fase inicial da regressão luteal (D14), ocorreu um pequeno decréscimo na área e na densidade dos microvasos, enquanto que em D17, após a luteólise, a extensa rede vascular presente na fase lútea intermediária já regrediu completamente.

Fatores como a proliferação endotelial durante a fase lútea inicial e média sugerem uma intensa angiogênese luteal. A elevada e reduzida expressão de RNAm do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), durante a luteogênese e luteólise, respectivamente, indicam que o VEGF possui uma atividade regulatória do fluxo sanguíneo neste tecido (AL-ZI'ABI; WATSON; FRASER, 2003). Um estudo *in vitro* demonstrou que o LH, PGE2 e PGF2 α , estão envolvidos na angiogênese e na regressão vascular luteal, em éguas. Entretanto, estes são processos complexos e regulados por inúmeros outros fatores (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

O estudo de Pinna et al. (2014) revela que a US colorida Doppler é considerada uma das técnicas mais adequadas para estudo da hemodinâmica do trato reprodutivo de animais de grande porte, e teve por objetivo avaliar a perfusão do CL primário e a sua correlação com o diagnóstico de gestação positivo em éguas. Para isso, foram utilizadas 16 éguas mestiças com idade entre quatro e 15 anos e em bom estado corpóreo, distribuídas em dois grupos, sendo um grupo com éguas gestantes (n=8) e ou outro com éguas vazias (n=8). Em ambos os grupos foram avaliados a perfusão sanguínea do CL e o perfil plasmático de progesterona. Todos os parâmetros foram avaliados sete e quatorze dias após a ovulação (D7 e D14). As éguas foram examinadas por meio de US modo B e *Power-flow*. A perfusão sanguínea do CL foi estimada em tempo real, levando-se em consideração a porcentagem (0 a 100%) de tecido luteal com sinais coloridos visualizados durante exame ultrassonográfico Doppler contínuo de no mínimo um minuto. Observou-se que a distribuição entre as classes de perfusão sanguínea tiveram efeito significativo se a égua estava gestante ou não. Concluiu-se que a US colorida Doppler pode sugerir um diagnóstico positivo de gestação, já que as éguas gestantes apresentaram um CL primário mais vascularizado que as éguas não gestantes.

Um estudo recente desenvolvido por Romano et al., (2012) revelou que a vascularização do folículo pré-ovulatório não foi influenciada na PV luteal e nem a concentração plasmática de P4 do corpo lúteo formado (Figura 05). Neste mesmo estudo, os autores observaram, por meio de análises de vasos da parede de folículos 12 horas antes da ovulação, e que apresentava baixa perfusão sanguínea, que originaram CLs com uma extensa

vascularização e produção de P4 adequada, com concentração média de 13,5 ng/mL no D8, da mesma maneira que folículos com alta perfusão vascular.

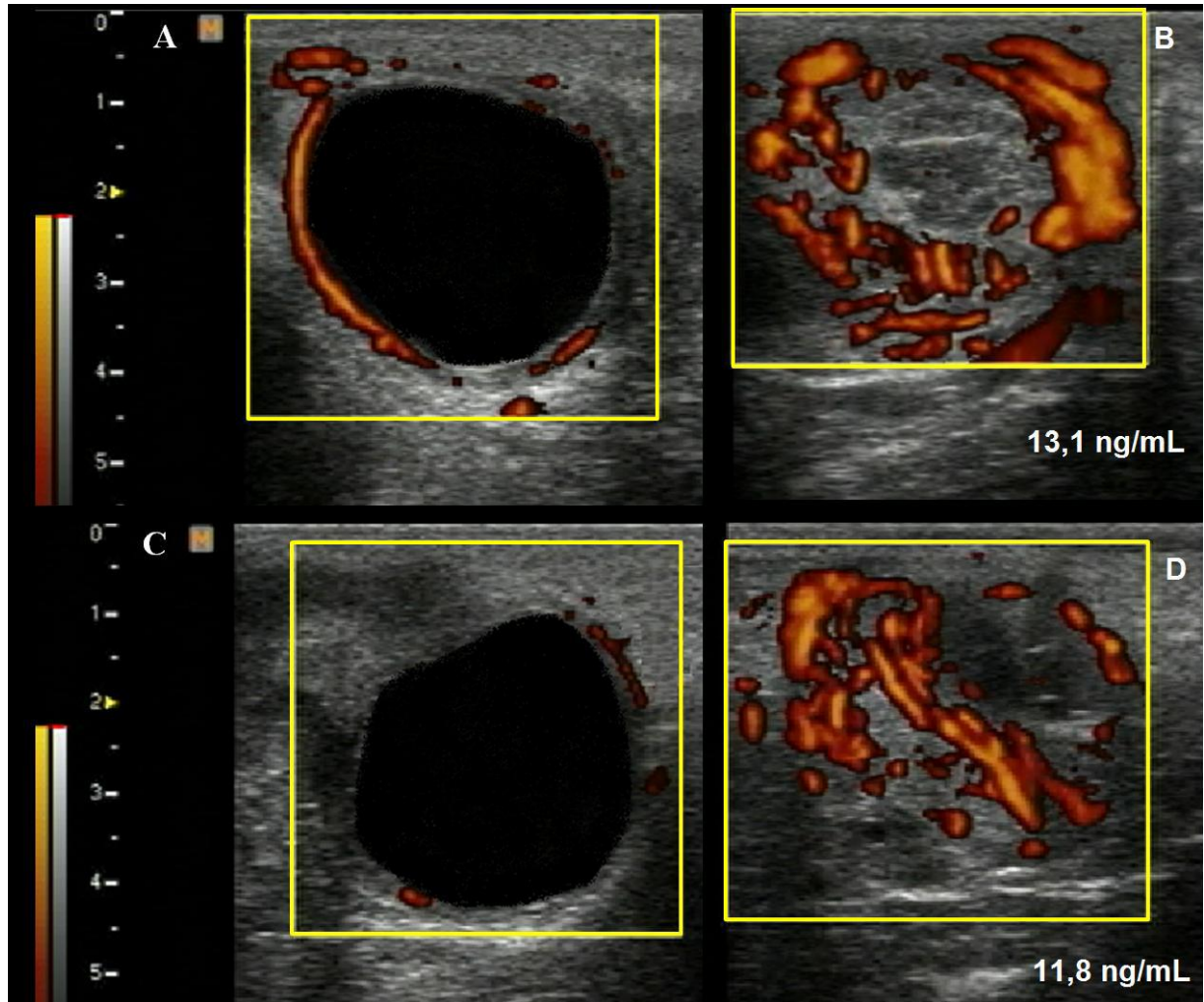


Figura 05: Imagens ultrassonográficas Doppler, função Power-flow, de folículos pré-ovulatórios e os respectivos corpos lúteos oito dias pós-ovulação, em éguas. A perfusão vascular folicular e luteal foram estimadas de acordo com a extensão de tecido (parede folicular ou tecido luteal) com sinais Doppler, durante exame contínuo e em tempo real. Folículos com alta (A) e baixa (C) vascularidade, deram origem a CLs funcionais e com elevada perfusão sanguínea e adequada produção de P4 (B e D).

Fonte: Adaptado de ROMANO et al., 2012.

Além disso, o processo de neovascularização não está associado às dimensões do CL, uma vez que não há relação entre o diâmetro luteal e as mudanças nos valores do PI da artéria ovariana ipsilateral a ovulação (BOLLWEIN et al., 2002b). Adicionalmente, uma pesquisa realizada por Arruda et al., (2001) demonstrou que não há relação entre a área do CL e a produção de P4. Portanto, as mudanças cíclicas que ocorrem no aporte sanguíneo do ovário e CL, durante o diestro, devem ser principalmente determinadas por mudanças na resistência

vascular ovariana devido ao crescimento e regressão dos capilares luteais (BOLLWEIN et al., 2002a).

Neste mesmo contexto Ginther et al. (2007b), relata no seu estudo que após a ovulação a área de fluxo sanguíneo luteal tem um aumento constante e progressivo quanto à forma, até envolver praticamente toda sua área ao redor do 6º dia pós-ovulação. No período entre o oitavo dia (D8) e o décimo quarto (D14), a PV luteal apresenta valores máximos, seguido por uma queda durante o período de luteólise (Figura 06). Durante este período, a concentração plasmática de P4 apresenta um perfil semelhante, caracterizando uma relação entre a PV e concentração plasmática de P4.

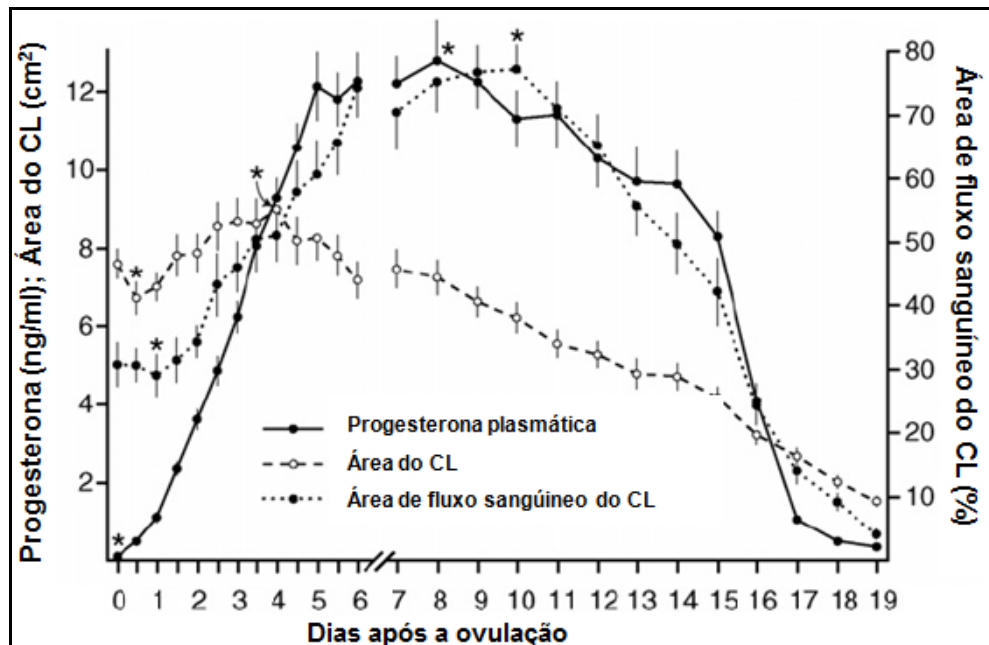


Figura 06: Média (\pm e.p.m) para área luteal, área de fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas. Asteriscos indicam aumento ou decréscimo significativo ($P < 0,05$) dentro de cada momento. Dia 0 = dia da ovulação.
Fonte: GINTHER et al., (2007b).

De acordo com Ginther e Utt, (2004) a perfusão vascular pode ser avaliada de forma objetiva e subjetiva. Desta forma, o corpo lúteo (CL) pode ser avaliado em tempo real de forma subjetiva, levando-se em consideração a porcentagem da área luteinizada com sinais Doppler coloridos. No entanto Bollwein et al. (2002a) reforça que, adicionalmente a estas análises, as imagens mais representativas do exame, caracterizadas por apresentarem maior quantidade de pixels coloridos em sua maior área luteal, podem ser selecionadas e o número total de pixels coloridos contados através da utilização de *softwares* específicos.

Em outro estudo, realizado por Resende (2014), objetivou comparar a perfusão luteal, por meio da US Doppler em éguas jovens e idosas suplementadas com aminoácido L-arginina. Neste trabalho a autora optou pelas análises subjetivas da perfusão vascular luteal. Foi estimada levando-se em consideração o percentual da área luteal com sinais Doppler coloridos (Figura 07) classificando de 0 a 100%. Este trabalho revelou uma baixa perfusão vascular luteal logo após a ovulação (D0), período em que há a formação do corpo hemorrágico e, após esta fase, houve um aumento da perfusão vascular luteal, coincidindo com o período de luteogênese, desta forma, houve uma maior perfusão vascular na estrutura luteal.

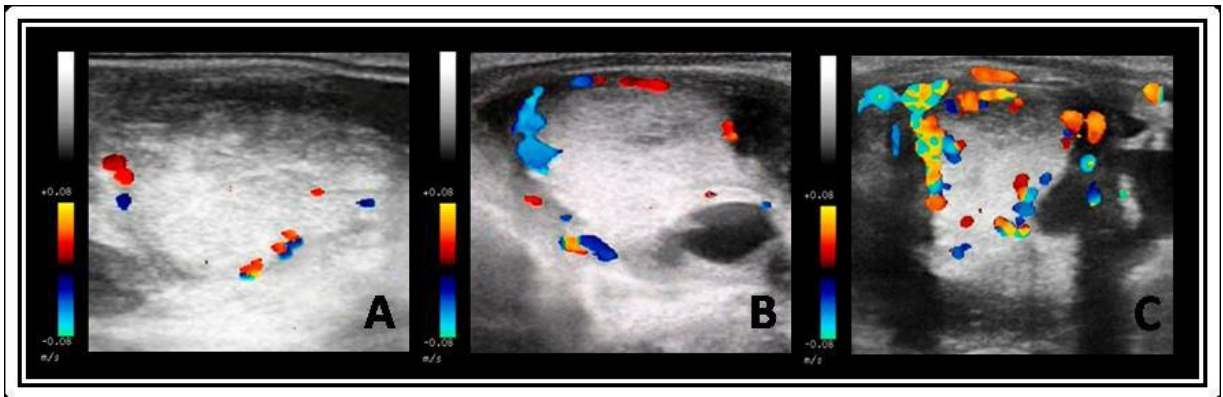


Figura 07: Exame ultrassonográfico modo color Doppler de corpos lúteos de éguas. Seleção de imagens representativas da avaliação subjetiva da perfusão vascular luteal, em uma classificação de 0 a 100%, onde A=10%, B= 20% e C=50% do tecido luteal com pontos Doppler coloridos.
Fonte: RESENDE, 2014.

O trabalho realizado por Romano (2013) avaliou inicialmente a PV luteal de maneira subjetiva, considerando o percentual de tecido luteal com sinais coloridos Doppler (Figura 08) durante o exame contínuo de no mínimo um minuto foi determinada de acordo com a extensão (0-100%), posteriormente foi feita análises objetivas. O autor pode concluir que houve uma alta correlação entre a PV luteal subjetiva e o número de pixels coloridos, intensidade total dos pixels e área luteal vascularizada demonstra que o método subjetivo de avaliação é eficiente.

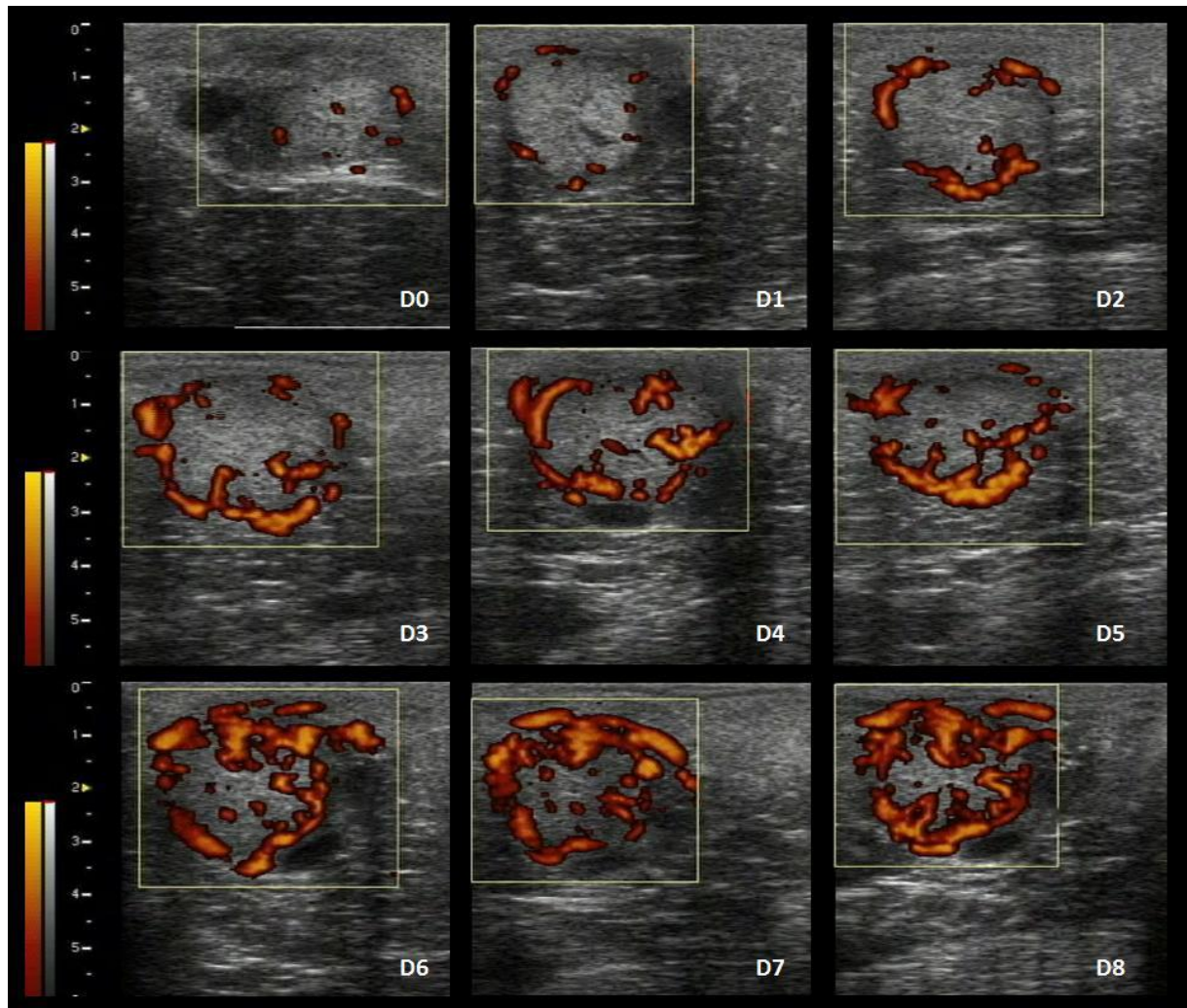


Figura 08: Imagens da perfusão vascular luteal durante oito dias pós-ovulação (D0 a D8), obtidas por meio da US Doppler colorida, função *Power-flow*. A classificação subjetiva da perfusão vascular (%) foi determinada de acordo com a extensão (0-100%) de tecido luteal com pontos coloridos em relação à área luteinizada. Fonte: ROMANO, 2013.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado entre novembro de 2013 e maio de 2014, nas instalações da Fazenda do Instituto Vital Brazil, situada no Km 23, da estrada RJ 122, no município de Cachoeiras de Macacu, localizado no Estado do Rio de Janeiro. A propriedade encontra-se na latitude 22°27'45'' sul e longitude 42°39'11'' oeste, a uma altitude média de 57m.

Os animais foram mantidos em sistema semi-intensivo, permaneciam durante o dia em piquetes e alimentados com capim elefante (*Pennisetum purpureum*; Schum), ração concentrada, farelo de trigo, suplementação mineral e acesso livre à água.

Os procedimentos foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais protocolado com número 011023/14.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos ao controle folicular. Para isso, foram realizados exames ultrassonográficos, utilizando-se um ultrassom modelo S6 (SonoScape – Shenzhen, China), com transdutor linear transretal de 5,0 a 10,0Mhz, no Modo B. Quando detectados folículo acima de 35mm e edema endometrial, foram realizadas a indução de ovulação com 1.500 UI de hCG (Vetecor 5000 U.I., Calier S.A., Barcelona, Espanha).

As éguas foram inseminadas de maneira convencional, no corpo do útero, com dose inseminante de 500 milhões de espermatozoides, e volume de 20mL de sêmen asinino e garanhão diluído na proporção 1:1, conforme recomendado por Pickett *et al.* (1987); Samper *et al.* (2007) e Brinsko *et al.* (2011).

Os animais foram divididos em dois grupos aleatoriamente, o primeiro grupo foi inseminado com sêmen de asininos (n=9) e o outro grupo com sêmen de garanhão (n=11).

O diagnóstico de gestação foi realizado no 14º dia pós ovulação através do aparelho de ultrassom modelo S6V (SonoScape – Shenzhen, China). Confirmado diagnóstico de gestação positivo, os ovários foram monitorados pela US modo B e modo Doppler, na função *power-flow* este procedimento foi realizado semanalmente nos 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º, 63º, 70º, 77º, 84º, 91º, 98º, 105º, 112º, 119º, 126º, e 133º e 140º dias de gestação para acompanhar

o início e o desenvolvimento dos corpos lúteos acessórios, estes então analisados quanto à sua hemodinâmica.

Após a formação do primeiro corpo lúteo, esses ovários foram monitorados pela US modo B para sua localização. Além disso, cada animal possuía uma ficha, usada para anotações necessárias, juntamente com os vídeos gerados, e era utilizada para mapear e identificar os corpos lúteos acessórios.

A avaliação da perfusão vascular (PV) luteal foi realizada, inicialmente, de maneira subjetiva, considerando o percentual de tecido luteal com sinais coloridos Doppler (Figura 09) durante o exame contínuo de no mínimo um minuto e classificado em escala de 0 a 100% (ROMANO, 2012).



Figura 12: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 5% da perfusão luteal.



Figura 13: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 10% da perfusão luteal.

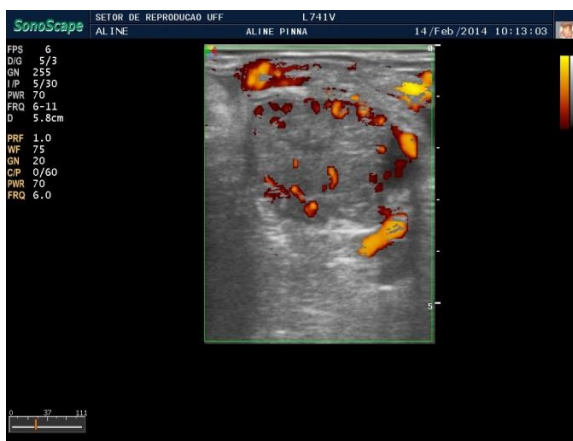


Figura 14: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 20% da perfusão luteal.



Figura 15: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 30% da perfusão luteal.



Figura 16: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 40% da perfusão luteal.



Figura 17: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 50% da perfusão luteal.



Figura 18: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 60% da perfusão luteal.

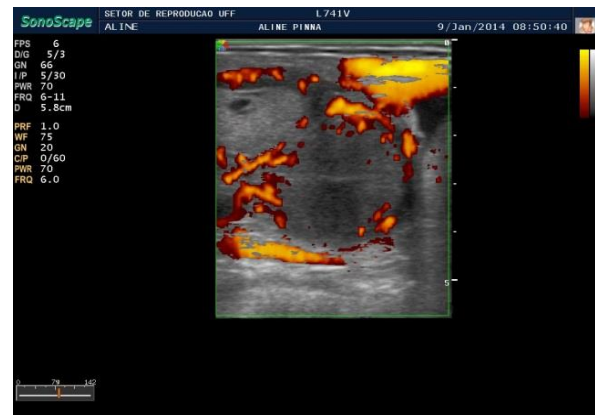


Figura 19: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 70% da perfusão luteal.



Figura 20: Avaliação subjetiva de imagem ultrassonográfica Doppler função *power*, CLa 80% da perfusão luteal.

Neste estudo utilizou-se a US Doppler modo *Power-flow*, conforme descrito no estudo de Ginther e Utt (2004). Realizou-se o exame por meio de US modo B e *Power-flow*, utilizando equipamento Doppler. Foi mantido o “settings” do equipamento constante ao longo do estudo (Prf:6;Frequencia 6-11;Pwr 70; GN: 255). Adicionalmente, a vascularidade luteal foi avaliada de forma objetiva através da determinação da quantidade e intensidade de pontos coloridos Doppler em imagem congelada, de acordo com Silva e Ginther (2010).

Posteriormente, realizou-se a análise objetiva, com intuito de validar o método subjetivo. Os exames ultrassonográficos foram gravados em um computador portátil Hp Mini equipado com placa de captura de vídeo (Pinnacle Studio 9).

Para análise, os vídeos foram fragmentados em uma imagem por segundo, utilizando-se o programa “Free Video to JPG Converter v.5.0.22”. Em seguida, três imagens do CLs de cada exame, caracterizadas por apresentarem a maior quantidade de sinais coloridos em sua maior área, foram selecionadas (Figura 10), extraídas e salvas em formato TIFF, utilizando-se o programa Adobe PhotoShop CC 2014(32 bit , Adobe Systems, San Jose, CA). O número total de pixels e a intensidade foram gerados pelo programa ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD), em uma imagem formato TIFF (Figura 11), sendo este procedimento realizado nas três imagens com melhor representação.

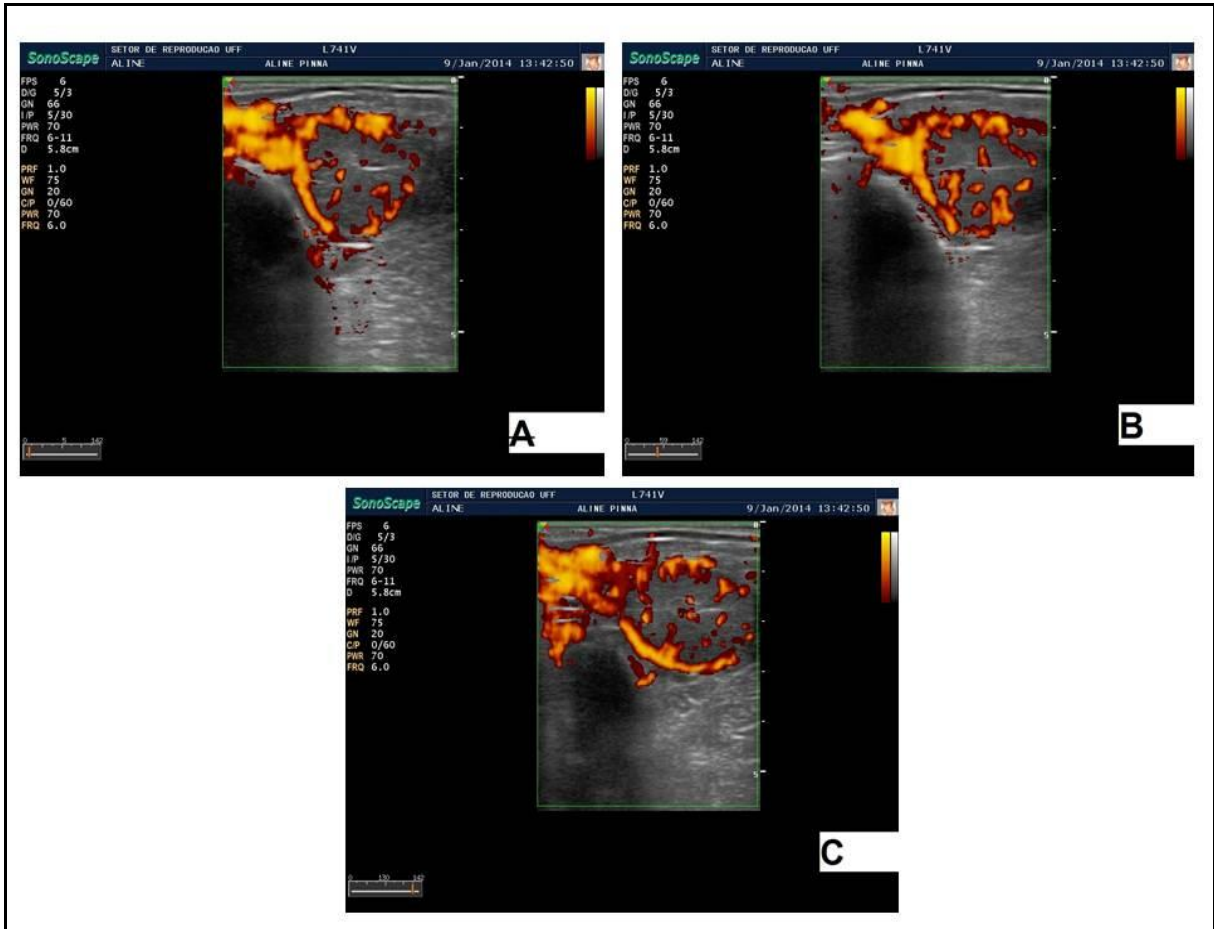


Figura 10: Imagens ultrassonográficas Doppler, função *Power-flow*, de um corpo lúteo suplementar equino - mesmo animal no mesmo momento (A, B e C).

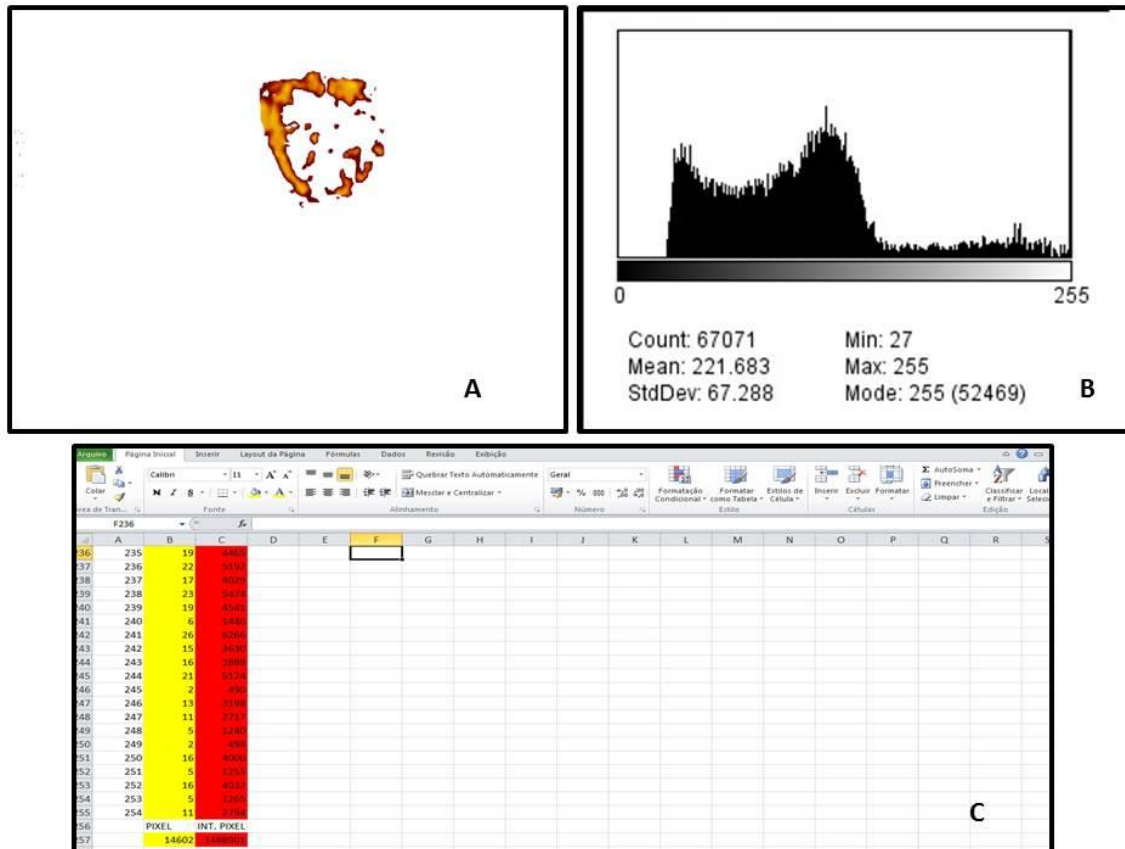


Figura 11: A- Imagem formato TIFF extraída do programa Adobe PhotoShop CC 2014. B- Análise de histograma obtida pelo programa imaj.j. C- visualização dos valores de pixel e intensidade pelo Excel 2010.

A intensidade dos pixels é caracterizada com base no brilho dos pixels coloridos, sendo que maior brilho representa maior intensidade e maior velocidade do fluxo sanguíneo. A intensidade total dos pixels é a somatória das intensidades, de cada pixel, gerada pelo computador. Assim, no modo *Color-flow* a velocidade do fluxo sanguíneo pode ser visualizada pela intensidade dos pixels (pontos) coloridos, a partir do escuro para o claro, sendo que a cor escura indica baixa velocidade e a clara alta velocidade. O fluxo dirigido ao transdutor é codificado em vermelho e o fluxo que se afasta é codificado em azul. No modo *Power flow* observa-se apenas uma cor, no qual podem ser detectados vasos pequenos e/ou com fluxo muito lento, ou seja, onde se faz a observação de possíveis alterações de vascularização. É importante ressaltar que a vascularização é graduada pela intensidade, quantidade e tamanho dos pixels coloridos (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007; ROMANO, 2013).

As análises estatísticas foram realizadas através da média dos valores obtidos das três imagens selecionadas de cada avaliação.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados por meio de programa computacional para análises estatísticas (SAEG[®] 9.0, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil). Inicialmente, foi realizada a estatística descritiva (média \pm desvio padrão). Inicialmente foi avaliado o efeito macho na formação de corpos lúteos suplementares, para avaliar a porcentagem de corpos lúteos entre os grupos usou o teste de fisher ($P < 0,05$), quando oi comparado a quantidade de estruturas lúteas formada foi usado o ANOVA + tukey ($P < 0,05$), e tabulação das variáveis: CL Subjetivo, Pixel e Intensidade de pixel. Na sequência, o teste de Lilliefors foi realizado para a normalidade das variáveis estudadas. Devido a distribuição não-normal, foi adotada a análise não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Utilizaram-se o Índice de Correlação de Pearson e a Análise de Regressão Linear Simples e Múltipla para correlacionar as variáveis.

4 RESULTADOS

Neste estudo foi observado o desenvolvimento de corpos lúteos acessórios nos ovários de 20 éguas gestantes, do 14º dia após diagnóstico gestacional positivo até 140 dias de prenhez. Foi observado o desenvolvimento de corpos lúteos acessórios em 75% (15/20) dos animais estudados. Nesta etapa do estudo foi acompanhada a formação inicial, desenvolvimento e a quantidade de corpos lúteos acessórios até os 105º dia de gestação, conforme dados na Tabela 01, e constatou-se que a média entre a primeira formação de estruturas lúteas acessórias foi de 46,6 dias. Até os 105º dias formaram 43 CLS, sendo 33 CLS oriundos de ovulação e 10 provenientes da luteinização de folículos anovulatórios hemorrágico obtendo uma média de 2,8 CLS/ égua. Todas as éguas do estudo mantiveram sua gestação até o fim.

Tabela 01: Momento de formação o 1º corpo lúteo Suplementar, total de corpos luteos suplementares formados a partir de ovulações e luteinizações.

Égua	1º Formação de CLS (dias)	Total de CLS oriundos de ovulação	Total de CLS oriundos de luteinização	Total de CLS até 105º dias
A	42	1	0	1
B	42	1	0	1
C	49	1	0	1
D	49	1	0	1
E	63	1	0	1
F	42	1	0	1
G	63	3	0	3
H	42	2	1	3
I	35	2	0	2
J	49	2	0	2
K	35	5	3	8
L	42	4	0	4
M	49	3	0	3
N	56	2	3	5
O	42	4	3	7

Nesta etapa do estudo, as gestações foram divididas em dois grupos: prenheses de jumento (n=9) e de garanhão (n=11). Foi avaliado o efeito macho na formação de corpos lúteos suplementares CLS (sendo que algumas éguas não formaram estruturas lúteas suplementares). As observações feitas a partir da porcentagem de áreas luteais, número de corpos lúteos suplementares e as avaliações subjetivas e objetivas nos animais gestantes de garanhão foi superiores a de jumento.

Jumento: 55.5 (5/9); $1,0 \pm 0,0$; $50,7 \pm 22,3$; $15072,1 \pm 6482,5$; $e12703924,4 \pm 639221,0$ (P<0,05).

Garanhão: 90.9 (10/11); $3,8 \pm 2,4$; $46,4 \pm 21,8$; $12658,7 \pm 6589,8$; $1058441,5 \pm 602970,4$ (P<0,05).

Tabela 02: Efeito do macho na formação ou não de corpos lúteos suplementares em éguas.

Macho	% de CLS	N⁰ de CLS	Av Subjetiva	Av Objetiva PIX	Av Objetiva INT PIX
Jumento (n=9)	55,5 (5/9)	$1,0 \pm 0,0^b$	$50,7 \pm 22,3^a$	$15072,1 \pm 6482,5^a$	$12703924,4 \pm 639221,0^a$
Garanhão (n=11)	90.9 (10/11)	$3,8 \pm 2,4^a$	$46,4 \pm 21,8^b$	$12658,7 \pm 6589,8^b$	$1058441,5 \pm 602970,4^b$

fisher (P<0,05) ANOVA + tukey (P<0,05) Kruskal Wallis (P<0,05).

Na Tabela 03 e nos Gráficos 01 e 02, a seguir, podemos encontrar os dados referentes ao número de corpos lúteos acessórios com relação às avaliações subjetivas, pixel e intensidade de pixel. Não foram encontradas diferenças $p>0,05$ com relação ao número de CL acessórios e os graus avaliados. Obtendo os valores médios independente do tempo de $45,1 \pm 21,5$ para o CL subjetivo; $13096,5 \pm 11078,1$ para pixel e $1168957,3 \pm 10456003$ para intensidade de pixel.

Tabela 03: Avaliação qualitativa do corpo lúteo subjetivo, número de pixel e intensidade de pixel pelos números de corpos lúteos acessórios.

Nº CLas	CL Subjetivo	Pixel	Int.Pixel
1	50,4±22,0	14560.2±6659.4	1318687.2±1065722.2
2	45,1±21,1	16463.3±31235.5	1235600.1±1358552.3
3	46,3±22,4	12625.7±6855.2	1080546.4±614637.2
4	44,7±24,2	11924.3±7187.1	939342.3±649133.3
5	43,7±21,2	11763.3±6423.4	1142462.2±1083007.5
7	46,2±16,5	15424.1±17755.5	1762146.5±3087332.6
8	41,5±24,6	11453.3±6951.3	959710.1± 595173.9

*^{a,b} diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

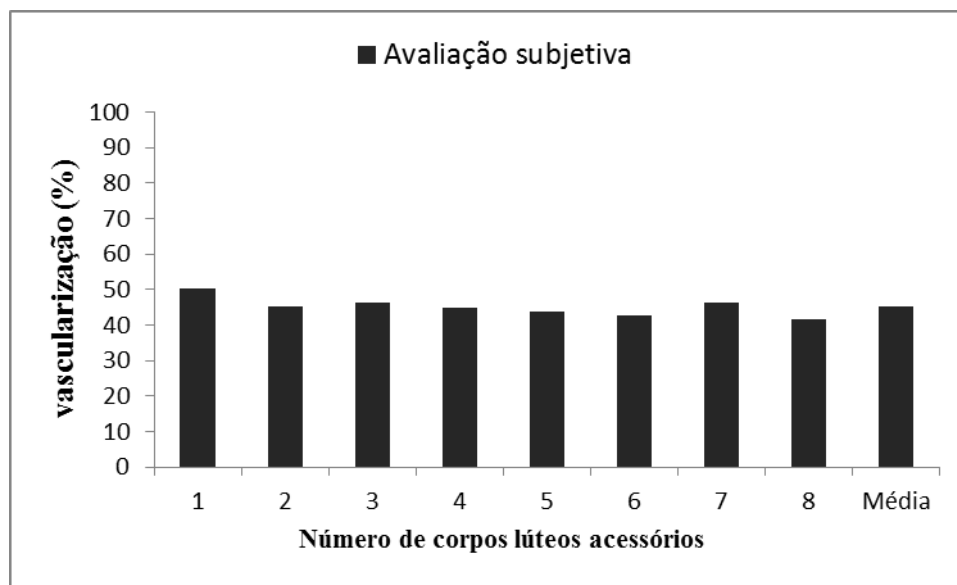


Gráfico 01: Avaliação subjetiva das éguas (n=15) com formação de corpos lúteos acessórios durante a estação reprodutiva, Novembro de 2013.

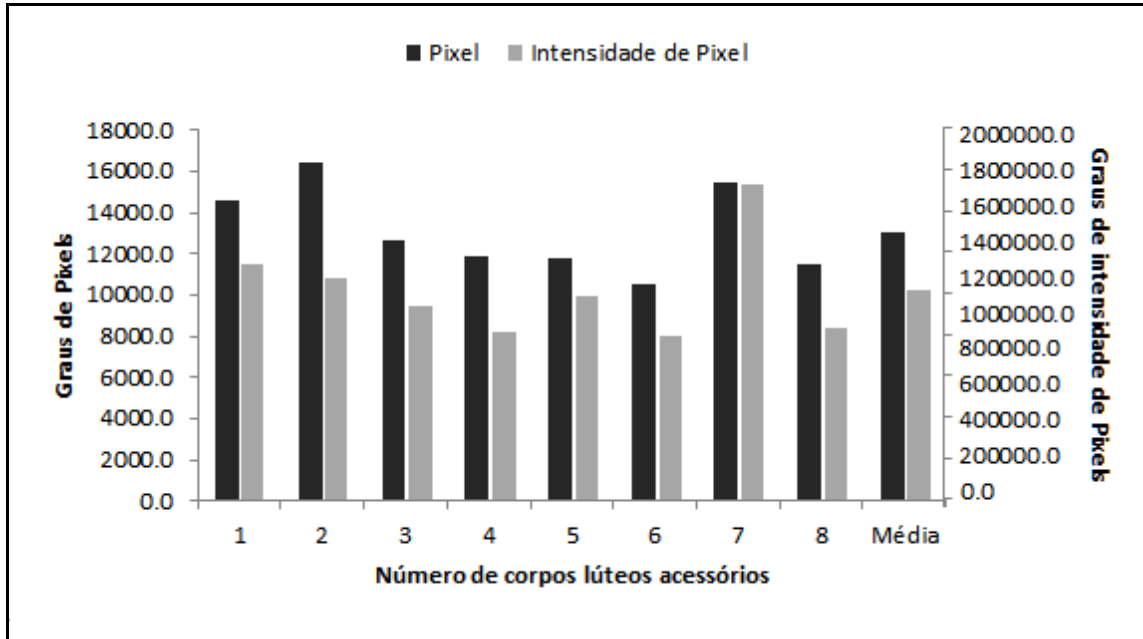


Gráfico 02: Avaliação objetiva (Pixel e Int. Pixel) das éguas (n=15) com formação de corpos lúteos acessórios durante a estação reprodutiva, Novembro de 2013.

Nas Tabelas 03 encontram-se os dados referentes ao tempo de formação dos corpos lúteos acessórios com relação às avaliações subjetivas, pixel e intensidade de pixel. Nestas avaliações foram encontradas diferenças $p>0,05$ em relação ao tempo de formação dos CL acessórios e os graus avaliados. Obtendo os valores médios independente do número de corpos lúteos de $44,7\pm 14,9$ para o CL subjetivo; $12847,6\pm 8963,4$ para pixel e $16749456,1\pm 12830711,4$ para intensidade de pixel.

Tabela 04: Avaliação subjetiva dos corpos lúteos acessórios, número de pixel e intensidade de pixel pelo tempo de avaliação.

Tempo	CLs Subjetivo	Pixel	Int.Pixel
35-42	15,0 \pm 7,1d	6658.3 \pm 1088.9c	612731.5 \pm 87853.7bc
42-49	13,0 \pm 13,1d	4601.8 \pm 3077.4c	350722.5 \pm 283689.9c
49-56	31,5 \pm 17,2c	8421.3 \pm 4396.5b	686462.4 \pm 351442.6bc
56-63	40,0 \pm 20,1bc	11350.2 \pm 5932.5b	830885.3 \pm 488532.4b
63-70	44,1 \pm 20,1b	12132.7 \pm 5710.8b	1423670.2 \pm 1804058.7ab
70-77	53,1 \pm 16,1ab	14273.6 \pm 5477.3ab	1232084.5 \pm 528220.1ab
77-84	61,0 \pm 13,1a	17306.1 \pm 5082.2a	1856174.9 \pm 2101772.1a
84-91	62,1 \pm 12,5a	22831.7 \pm 34512.5a	1519362.1 \pm 496366.2a
91-98	62,0 \pm 14,5a	17728.8 \pm 5317.5a	1465757.8 \pm 581008.6a
98-105	62,9 \pm 14,3a	22938.1 \pm 31540.1a	1541730.3 \pm 543102.6 ^a
105-112	57,9 \pm 14,5a	16024.9 \pm 5085.6ab	1674725.7 \pm 1864170.1 ^a

112-119	50,1±16,1ab	13057.8±5405.1b	1045707.2±524285.2b
119-126	41,8±15,5bc	12646.6±13895.4b	918872.2±421568.9b
126-133	31,5±15.9c	7942.6±4265.5c	807018.1±990536.2bc
133-140	18.2±16.8d	4808.7±3664.4c	783551.4±1764104.4bc

*a,b,c,d diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Nos graus de vascularização dos corpos lúteos acessórios avaliados, subjetivo e objetivo (Pixel e Int. Pixel), pode perceber diferenças na perfusão vascular do 35º ao 70º dias de gestação, devido ao início, e desenvolvimento dos CLS. Entretanto a intensidade de pixel nos momentos (tempo) 63 e 105 dias foi precoce tanto no aumento do grau avaliado quanto no decréscimo dos valores em relação às demais variáveis.

Observa-se (Gráfico 03) que a perfusão vascular (PV) luteal a partir dos 70 dias de gestação não diferiu entre os graus das variáveis, obtendo o máximo da vascularização até os 119 dias, indicando o maior número de corpos lúteos acessórios maduros, a partir desse período pode-se perceber uma diminuição da PV das estruturas.

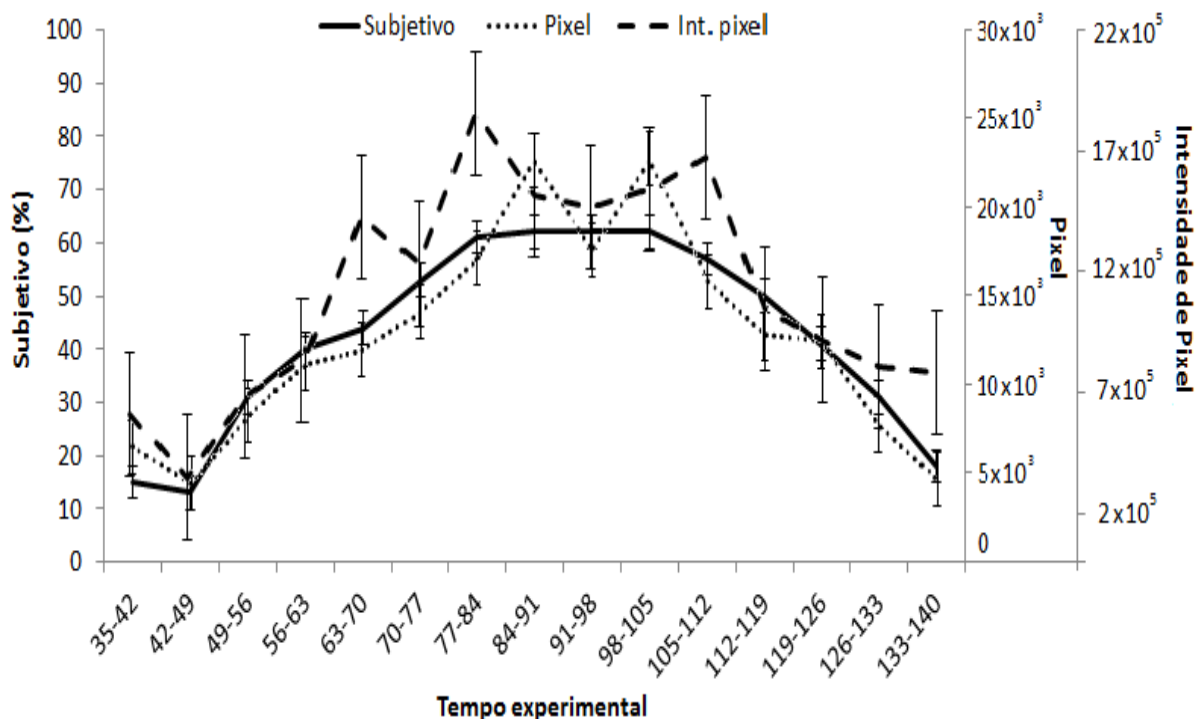


Gráfico 03: Imagem representativa das avaliações subjetivas e objetivas, em relação ao tempo de formação.

Por meio do índice de correlação de Pearson dos tempos de gestação das variáveis CL subjetivo, Pixel e Intens, em relação ao Pixel do tempo de gestação estudado (35 a 133 dias), observou-se uma forte correlação positiva para o subjetivo com pixel ($r=0.94 - P<0,001$), intensidade de pixel com subjetivo ($r=0.89 - P<0,001$) e intensidade de pixel com pixel ($r=0.93 - P<0,001$) (TABELA 04).

Tabela 05: Índice de correlação positiva(ICP) para as variáveis (Cl subj., pixel, int. pixel) oriundas de corpos lúteos acessórios de éguas de 35 a 140 dias gestação.

	CLs Subjetivo	Pixel	Int. Pixel
CLs Subjetivo	*****		
Pixel	0.94	*****	
Int. Pixel	0.89	0.93	*****

Quanto a análises de regressão linear simples foi obtido uma forte correlação para análise subjetiva com pixel ($r^2=88$) obtendo a formula ($y= 6,56+0.003 \times$, ou seja, $I \text{ Subj.} = 6,56+0.003 \times \text{pixel}$, para obter o valor aproximado da avaliação subjetiva quando estiver o valor do pixel), nas análises de pixel em relação às avaliações subjetivas ($r^2=88$), obtendo a seguinte formula $y= (-441,7) + 285,6 \times X$ ou $y= (- 441,7) + 285,6 \times \text{Subjetivo}$, para as avaliações do numero de pixel em relação a intensidade ($r^2=87$), obteve a seguinte formula $y= (-35702,4) + 86,5 \times X$ (ou Intensidade de pixel) e diante dos valores de pixel pode se determinar o valor da intensidade de pixel $r^2= 87$ a partir da formula $y= 1947,3+001 \times X$ (ou Pixel). Os dados obtidos estão expostos numa representação gráfica, mostrando uma semelhança ente os valores subjetivos e a quantidade de pixel, número de pixel em relação às avaliações subjetivas, pixel em relação à intensidade de pixel, e a intensidade de pixel em relação à quantidade de pixel (Gráficos 04 a 07).

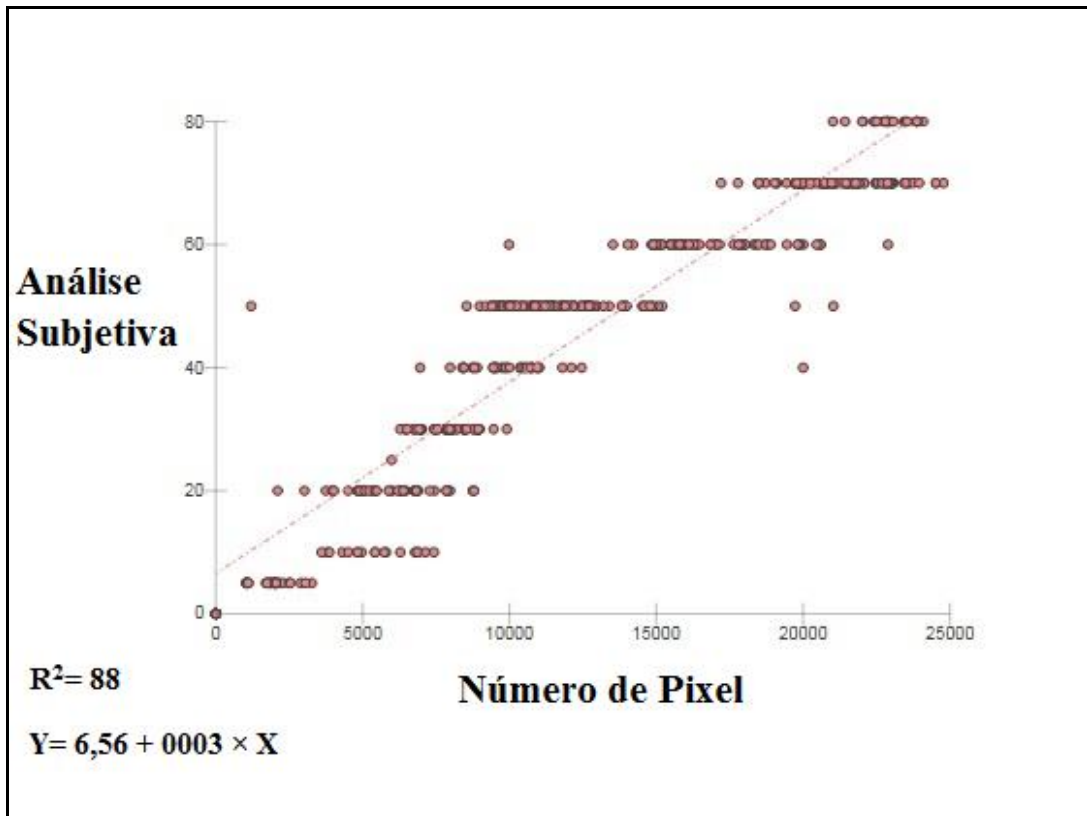


Gráfico 04: Análise de regressão linear simples, avaliação subjetiva em relação ao número de pixel.

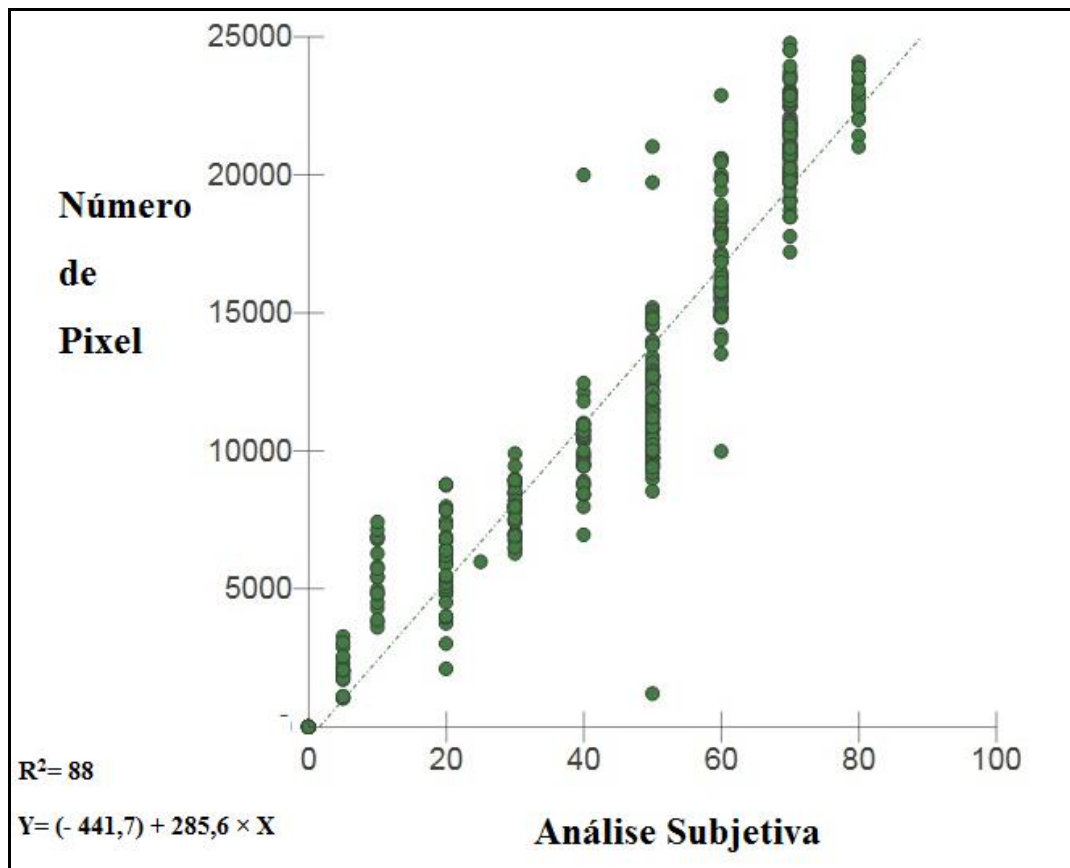


Gráfico 05: Análise de regressão linear simples, número de pixel em relação à análise subjetiva.

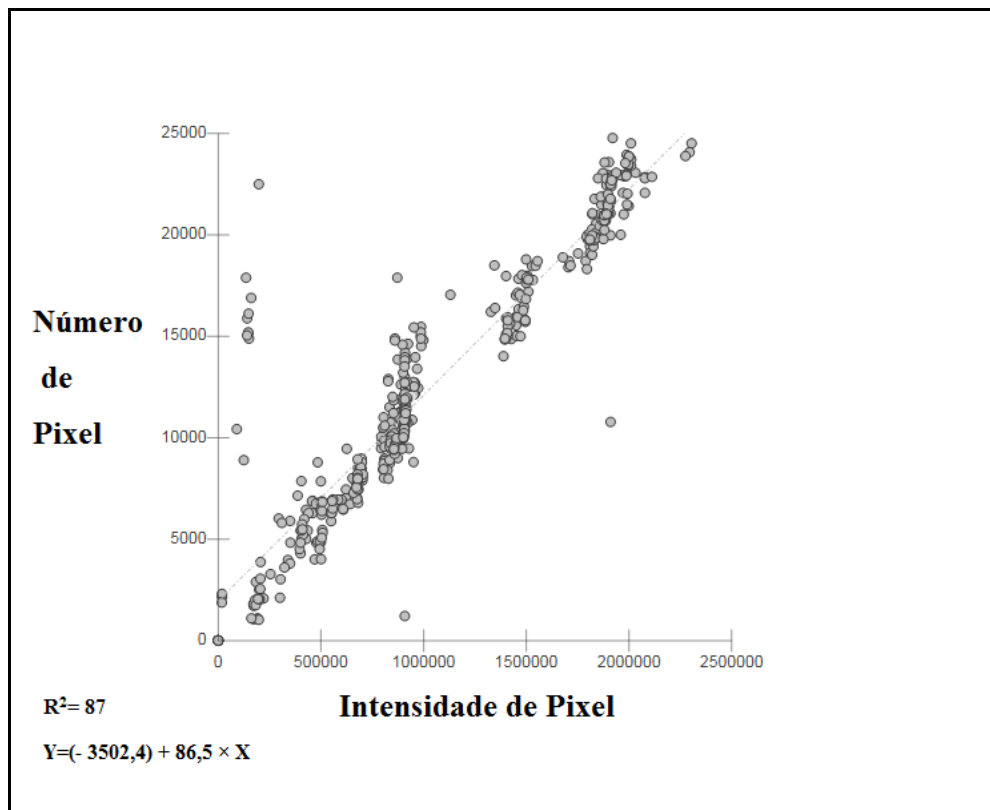


Gráfico 06: Análise de regressão linear simples, número de pixel em relação à intensidade de pixel.

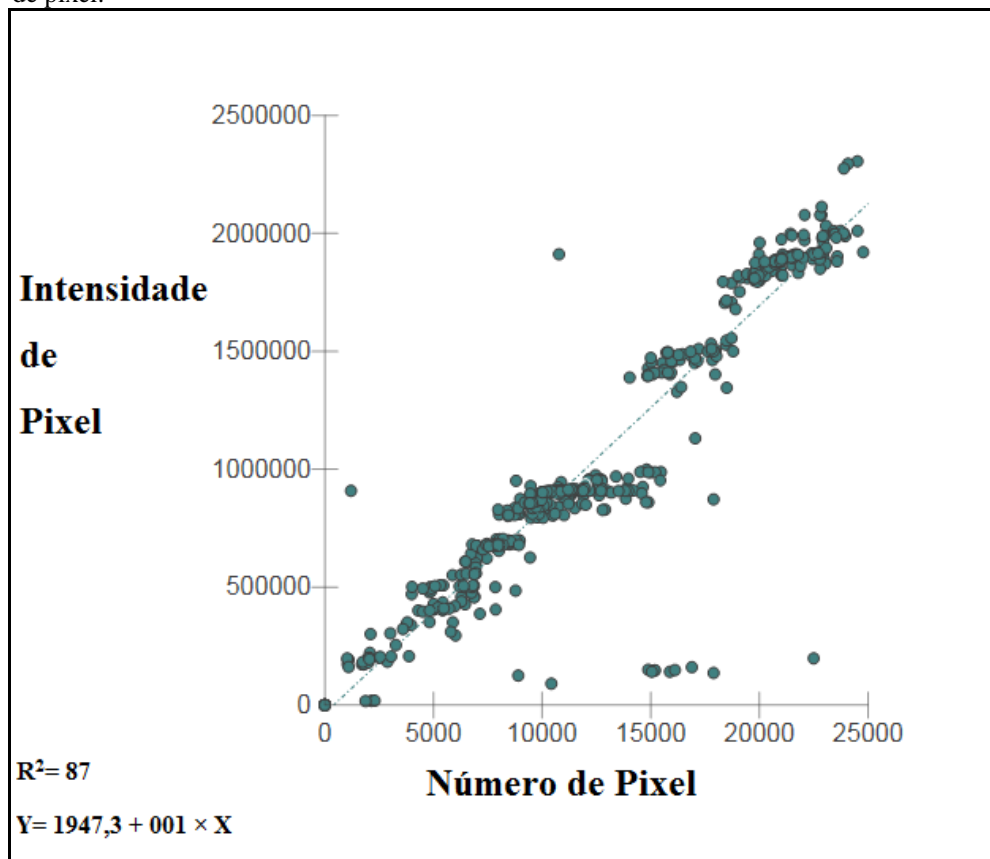


Gráfico 07: Análise de regressão linear simples, intensidade de pixel em relação ao número de pixel.

5 DISCUSSÃO

Conforme explicam Hafez e Hafez (2004), os folículos luteinizados resultam em corpos lúteos acessórios, produzindo progesterona e contribuindo para a manutenção da gestação. Brinsko et al. (2011) afirmam que a progesterona produzida pelos CLS complementa a P4 produzida pelo CL e, juntos, mantêm a gestação nos primeiros cinco meses de prenhez. Devido a dados como este, encontrados na literatura, muitos acreditam que os corpos lúteos acessórios sejam fundamentais para a manutenção da gestação em éguas nos primeiros meses, quando a produção de progesterona depende dos CL e CLS.

Porém, a presente pesquisa identificou o desenvolvimento de corpos lúteos acessórios apenas nos ovários de 75% (15/20) das éguas gestantes do estudo, portanto cinco éguas, que não apresentaram CLS, conseguiram manter sua gestação apenas com a produção de progesterona produzida pelo CL, contrariando a literatura. Já no estudo de Matta (2013), todas as 62 éguas do estudo (100%) apresentaram formação de CLS, enquanto no de Silva (2012), que avaliou 25 éguas gestantes, uma égua que só apresentou um CLS e outra que não apresentou nenhum (ambas recebendo tratamento hormonal), sofreram abortamento, mas outras três éguas, mas que também receberam tratamento hormonal, e não apresentaram formação de CLS, mantiveram sua gestação além dos 130 dias do estudo.

No estudo de Allen et al. (1987), os autores constataram que a transferência de embriões de jumentas para éguas resultava no desenvolvimento de uma cinta coriônica excepcionalmente pequena. Conforme explica Ginther (1992), esta cinta é formada por ondulações superficiais no córion, que se aprofundam, permitindo que células trofoblásticas invadam e migrem através do endométrio, o que ocorre por volta dos dias 36 e 38, migrando para a lâmina própria para se diferenciar nos cálices endometriais, que passarão a produzir a gonadotrofina coriônica sérica (eCG). Além disso, Silva (2012) acrescenta que, durante o período de expansão do alantocório, entre os dias 40 e 120 de gestação, as células trofoblásticas também adquirem capacidade de sintetizar, entre outros hormônios, a progesterona. Voltando ao estudo de Allen et al. (1987), os autores revelam que cerca de 70% destas transferências de jumentas para éguas são abortadas entre os dias 80 e 85 de gestação, e acreditam que isso se deva ao desprendimento da placenta (retardada e anormal) acompanhado por uma reação vigorosa, mediada por células maternas, contra as células trofoblásticas do feto de jumento. Segundo Antczak et al. (1982) e Kydd et al. (1982), essa estimulação antigênica causada pelas células trofoblásticas invasivas (que irão formar os cálices endometriais) ocorre porque estas células especializadas expressam altas

concentrações de antígenos paternos, ligados ao complexo de histocompatibilidade maior da classe I (MHC I). Assim, provocam uma forte resposta imune humoral pela mãe, além de uma forte resposta celular no endométrio. Este fato pode justificar o efeito macho encontrado neste estudo, onde a formação de CLS foi maior em éguas gestantes de garanhão do que nas de jumentos.

Este modelo de perda da gravidez, apresentado por Allen et al. (1987), mostra uma forte evidência de memória imune, e a taxa de morte fetal é reduzida através da imunização da égua receptora contra linfócitos de jumentos. Os resultados destes autores apontam para a necessidade de uma reação dos copos endometriais para a placentação e sobrevivência fetal, não como resultado da produção hormonal dos copos, mas por causa do forte estímulo antigênico das células trofoblásticas invasivas no organismo materno. Se a cinta coriônica não se desenvolve corretamente e não invade o endométrio materno entre os dias 36-38, a reação de interdigitação e implantação placentária não é acionada no endométrio, e um ataque mediado por células se inicia contra a placenta e o feto. Mas, se a cinta conseguir invadir o endométrio, a estimulação antigênica resultante da mãe induz uma resposta imunológica protetora, em vez de citotóxica, para o feto. Assim, os autores sugerem um papel importante para as células trofoblásticas invasivas da placenta equina em iniciar e conduzir a fixação e interdigitação da placenta não-invasiva, para o sustento fetal, e na modulação da interação imunológica materno-fetal, para permitir a sobrevivência do feto “geneticamente estranho” no útero, e a produção de progesterona para a manutenção da gravidez.

Por outro lado, Allen et al. (1987) constataram que este processo não ocorreu nos 30% dos casos restantes, ou seja, ocorreu a sobrevivência de 30% das gestações extra específicas de jumentos em éguas, sem a presença de qualquer corpo lúteo suplementar, devido à falha no desenvolvimento dos cálices endometriais. Nestes, não houve o desenvolvimento dos cálices endometriais, mas ocorreu a implantação e interdigitação do alantocórion com o endométrio, em menor velocidade que nos casos de implantação convencional (prenhez de cavalo), porém ocorreu o desenvolvimento normal do feto e o nascimento a termo. A concentração de P4 também se manteve constante entre 40 e 70 dias de gestação, no entanto apresentou aumento gradual a partir dos 100 dias, possivelmente como resultado da elevação da síntese de progestágenos pela placenta. Este fato levantou a questão de que este fenômeno pode ser imunologicamente ou geneticamente mediado. Além disso, também questiona a real importância dos CLS para a manutenção da gestação, assim como visto no presente estudo, tendo em vista a ocorrência de gestações viáveis na ausência do desenvolvimento dos cálices endometriais e consequentemente dos CLS.

Segundo Ginther (1992), Greco et al. (2008), Samper (2009), Brinsko et al. (2011) e Matta (2013), a partir dos 36° a 40° dias de gestação, a produção de progesterona é feita pelo conjunto do CLP com os CLS, sendo que em torno de 180 dias de gestação esta produção passa a ser feita unicamente pela unidade feto-placentária. Silva, Puoli Filho e Meira (2012) e Brinsko et al. (2011) explicam que os CLS se desenvolvem a partir dos 36° a 40° dias de gestação, através do estímulo hormonal da gonadotrofina coriônica equina (eCG), que é secretada pelos cálices endometriais, sendo que o processo que dá origem aos CLS envolve, além do aspecto endocrinológico, fatores imunológicos desencadeados pela origem dos cálices endometriais, que por sua vez secretarão o eCG que estimulam a formação dos CLS. No entanto, o significado desta invasão e posterior resposta imunológica vão além da formação dos CLS e envolve mecanismos responsáveis pela manutenção da gestação. Daí a importância de uma adequada formação da cinta coriônica e invasão do endométrio pelas células trofoblásticas, como revelado no estudo de Allen et al. (1987). Esta suplementação de progesterona pelos CLP e CLS possui tempo limitado, e, segundo Ginther (1992) e Brinsko et al. (2011), a regressão dessas estruturas está ligada ao mecanismo de regressão dos cálices endometriais, embora esta última ocorra antes da regressão dos CLS.

Neste aspecto, alguns autores destacam o uso de análogos do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), buscando modular a dinâmica folicular, melhorar a função do corpo lúteo original e possibilitar a formação de corpos lúteos acessórios em bovinos (SILVA; COSTA, 2005; HOWARD et al., 2006; MACHADO et al., 2008). Mas no estudo de Loiola et al. (2014) não houve diferença ($P > 0,05$) entre as variáveis avaliadas, portanto, a administração do análogo de GnRH não elevou a taxa de gestação em receptoras de embriões bovinos, demonstrando que esta estratégia não foi eficaz em incrementar os índices de fertilidade.

Em estudos realizados em suínas, Guthrie e Polge (1976) dizem que a aplicação de gonadotrofinas na fase lútea do ciclo estral leva à formação CLS, enquanto Wiesak (1989) diz que leva ao aumento da secreção de progesterona pelos CL existentes. Portanto, a aplicação de gonadotrofinas no período inicial de gestação poderia, dessa forma, aumentar a secreção de progesterona sanguínea no início da gestação. Porém, no estudo de Carvalho et al. (2013), não se observou efeito das gonadotrofinas sobre os níveis de progesterona circulante nem sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas suínas pluríparas.

A literatura consultada diz que a formação de CLS em éguas começa a ocorrer em torno do 36° a 40° dias de gestação, e no trabalho de Matta (2013), os CLS começaram a se formar ao redor dos 35 dias, sendo que seu estudo utilizou, também, éguas suplementadas

com P4 exógena, onde as éguas suplementadas apresentaram de 2 a 4 corpos lúteos acessórios, enquanto as cíclicas de 2 a 6 estruturas. No estudo de Silva (2012), o número de CLS variou de dois a seis em cada égua suplementada até os 130 dias de gestação, e de dois a nove em éguas cíclicas. Porém, o presente estudo constatou que a média entre a primeira formação de estruturas lúteas acessórias foi de 46,6 dias, seguindo até os 105 dias de gestação (após o 105º dia não houve mais formação de CLS pelas éguas), obtendo uma média de 2,8 CLS/ égua.

Segundo Silva, Pioli Filho e Meira (2013), todos os corpos lúteos, tanto o primário quanto os suplementares, degeneram por volta dos 150-200 dias de gestação, e neste estudo identificou-se que a perfusão vascular (PV) luteal dos CLS apresentou o máximo da vascularização até os 119 dias, indicando o maior número de corpos lúteos acessórios maduros, sendo que, a partir desse período, pode-se perceber uma diminuição da PV destas estruturas, e até os 140 dias do estudo ainda se observavam algumas, porém em franca regressão. No trabalho de Matta (2013), após 150 dias da ovulação, tanto nas éguas cíclicas como nas suplementadas não foi mais observada a presença de corpos lúteos, sugerindo que a partir deste ponto a produção de progesterona tenha sido exclusivamente de origem placentária, com o que este estudo concorda, já que os resultados obtidos através da diminuição do fluxo de sangue destas estruturas também sugere que a produção de P4 passou a ser de origem placentária.

Sobre os dados referentes ao número de corpos lúteos acessórios com relação às avaliações subjetivas, pixel e intensidade de pixel, não foram encontradas diferenças $p > 0.05$ com relação ao número de CL acessórios e os graus avaliados, neste estudo e, infelizmente, não foi encontrado nenhum outro estudo semelhante, referente à CLS, para fazer uma comparação com este resultado.

Em relação os dados referentes ao tempo de formação dos corpos lúteos acessórios e às avaliações subjetivas, pixel e intensidade de pixel, este estudo encontrou diferenças $p > 0.05$ em relação ao tempo de formação dos CLS e os graus avaliados, mas também não foram encontrados estudos para comparação de resultados.

Nos graus de vascularização dos corpos lúteos acessórios avaliados, subjetivo e objetivo (Pixel e Int. Pixel), também pode-se perceber diferenças na perfusão vascular do 35º ao 70º dias de gestação, devido ao início e desenvolvimento dos CLS, com a intensidade de pixel nos momentos (tempo) 63 e 105 dias se mostrando precoce tanto no aumento do grau avaliado quanto no decréscimo dos valores em relação às demais variáveis. Sobre este aspecto, também não foram encontrados estudos para comparação de resultados sobre CLS,

porém, no estudo de Novais Filho (2014), onde o autor trabalhou com indução de luteólise, após a aplicação de $PGF2\alpha$ foi observado que tanto a perfusão sanguínea objetiva (PVO) quanto a área com sinais coloridos (ASC) diminuíram ao longo das 48h de avaliação após o tratamento, e pela avaliação subjetiva da perfusão do CL, maiores diferenças entre grupos não tratados com $PGF2\alpha$ (D2-NaCl, D8-NaCl) foram detectadas. O autor acredita que este fato se deva pela maior facilidade em detectar variações de cores e intensidade delas pela avaliação visual do que apenas pela mensuração da área com sinais coloridos, utilizado para calcular a PVO por programas de computador, e este estudo concorda, pois foi possível estimar uma boa vascularização dos CLS sem a necessidade de usar os programas pra avaliar pixel.

Segundo Novais Filho (2014), a avaliação subjetiva da perfusão vascular é um método simples, rápido e é uma análise confiável para estimar a funcionalidade do CL. Romano (2013) também concluiu, em seu estudo, que a alta correlação entre a PV luteal subjetiva e o número de pixels coloridos, intensidade total dos pixels e área luteal vascularizada demonstra que o método subjetivo de avaliação é eficiente, com o que concorda este estudo, que chegou a mesma conclusão em relação a estas avaliações em relação aos CLS.

6 CONCLUSÕES

Foi observado o desenvolvimento de corpos lúteos acessórios em 75% (15/20) dos animais estudados, sendo a média entre a primeira formação de estruturas lúteas acessórias de 46,6 dias, com uma média de 2,8 CLS/égua.

Foi observado o efeito macho na formação de corpos lúteos suplementares CLS, onde o número de CLS e as avaliações subjetivas e objetivas nos animais gestantes de garanhão foi superiores a de jumento.

Em relação às avaliações subjetivas, pixel e intensidade de pixel, foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) em relação ao tempo de formação dos CLS e os graus avaliados, obtendo os valores médios (independente do número de corpos lúteos) de $44,7 \pm 14,9$ para o CL subjetivo; $12847,6 \pm 8963,4$ para pixel e $16749456,1 \pm 12830711,4$ para intensidade de pixel.

Nos graus de vascularização dos corpos lúteos acessórios avaliados, subjetivo e objetivo (Pixel e Int. Pixel), foi possível perceber diferenças na perfusão vascular do 35º ao 70º dias de gestação, devido ao início, e desenvolvimento dos CLS. Entretanto a intensidade de pixel nos momentos (tempo) 63 e 105 dias foi precoce tanto no aumento do grau avaliado quanto no decréscimo dos valores em relação às demais variáveis.

A perfusão vascular (PV) luteal a partir dos 70 dias de gestação não diferiu entre os graus das variáveis, obtendo o máximo da vascularização até os 119 dias, indicando o maior número de CLS maduros, e a partir desse período pode-se perceber uma diminuição da PV das estruturas.

Observou-se uma forte correlação positiva para o subjetivo com pixel ($r=0.94 - P < 0,001$), intensidade de pixel com subjetivo ($r=0.89 - P < 0,001$) e intensidade de pixel com pixel ($r=0.93 - P < 0,001$). Quanto a análises de regressão linear simples, foi obtido uma forte correlação para análise subjetiva com pixel.

Assim, a hipótese defendida, de que a avaliação subjetiva seria eficiente, estava correta, pois, através da avaliação dos corpos lúteos acessórios durante a gestação da égua, verificando o momento em que todos os CLS estão no pico máximo de vascularização e o momento da sua regressão, correlacionando com a vascularização na tabela de tempo, permitiu perceber as variações de pixels. Dessa forma, ao correlacionar esses dados, é possível estimar uma boa vascularização dos CLS sem a necessidade de usar os programas pra avaliar pixel. Portanto, a avaliação subjetiva é fidedigna e eficiente para o veterinário de campo.

7 RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA

Ainda são raros os trabalhos direcionados para análise e avaliação de CLS em éguas, havendo pouca base de referência de dados, evidenciando a necessidade de novos estudos.

Devido à hipótese de que a formação de corpos lúteos acessórios seria fundamental para a manutenção da gestação em éguas não estar correta, já que cinco éguas do estudo não desenvolveram CLS e mantiveram sua prenhez, recomenda-se ampliar esta pesquisa com a avaliação conjunta da formação de CLS com a dosagem sanguínea de progesterona, buscando avaliar sua produção pelas éguas que formarem e que não formarem os CLS, e também pesquisas que promovam a dosagem da gonadotrofina coriônica equina (eCG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p.502-507, 2004a.

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.637-642, 2004b.

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v.12, p.513-527, 2001.

ALLEN, W.R.; SHORT, R.V. Interspecific and Extraspecific pregnancies in equids: anything goes. **Journal of Heredity**, v.88, n.5, p.384-392, 1997.

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

ALLEN, W.R.; KYDD, J.H.; BOYLE, M.S.; ANTCZAK, D.F. Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.197-209 Suppl, 1987.

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

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

ANTCZAK, D.F.; BRIGHT, S.M.; REMICK, L.H.; BAUMAN, B. Lymphocyte alloantigens of the horse. I Serologic and genetic studies. **Tissue Antigens**, v.20, p.172-187, 1982.

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R.. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.5, p.233-239, 2001.

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

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.305-317, 2005.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F_{2α} no endométrio de fêmeas bovinas**. 185f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BOAKARI, Y.L. **Efeito da hCG ou deslorelina sobre a hemodinâmica folicular e perfil endógeno de LH em éguas cíclicas**. 63p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2014.

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

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

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C. **Manual of equine reproduction**. 3.ed. 2011.

BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v.64, p.568-571, 2005.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em equinos. **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução animal**, p.16, Goiânia, 2005.

CARVALHO, C.F. **Ultrassonografia Doppler em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2009. p.1-30, p.71-83

CARVALHO, L.F.R.; SILVA FILHO, J.M.; SILVA, I.J.; BANDEIRA, M.N.; MORAIS, M.P.; RUAS, J.R.M. Efeito da aplicação de hCG ou GnRH sobre a concentração sérica de progesterona e eficiência reprodutiva em porcas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.659-664, 2003.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultrasonografia. **Ciência Rural**, v.8, n.3, p.872-879, 2008.

CERRI, G.G.; MÓLNAR, L.J.; VEZOZZO, D.C.P. **Doppler**. São Paulo: Sarvier, 1996.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J.R. Risk factors for the development of haemorrhagic anovulatory follicles in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.473-80, 2010.

CURRAN, S.; GINTHER, O.J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenology**, v.36, p.809-814, 1991.

DAELS, P.F. The spring-transition: diagnosis and management. **Anais do Congresso Nazionale Multisala Sive 10**, Domenica, 2004. p.12-15, 2004.

DIAZ, F.J.; ANDERSON, L.E.; WU, Y.L.; RABOT, A.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.65-68, 2002.

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

FERREIRA, J.C. Avaliação ultrassonográfica Doppler pré e pós-cobertura do trato reprodutivo de éguas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.108-114, 2013.

FERREIRA, J.C. **Influência das alterações degenerativas endometriais e da idade na hemodinâmica do trato reprodutivo de éguas após a inseminação artificial e durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário**. 176f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista Julho de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012.

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.

FERREIRA, J.C.; MEIRA, M. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v.41, p.1063-1069, 2011.

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

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, M. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae** (UFRGS. Impresso), v.39, p.S105-S111, 2011.

FERREIRA-DIAS, G.; BRAVO, P.P.; MATEUS, L.; REDMER, D.A.; MEDEIROS, J.A. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.30, p.247-259, 2006.

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

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; DONADEU, F.X.; ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.314-321, 2007.

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

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

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

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2. Horses**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1995. p.23-118.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: ColorDoppler ultrasonography**. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O.J.; MATTHEW, D.U. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24 p.516-526, 2004.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy of the equine ovaries. **Theriogenology**, v.21, p.471-483, 1984.

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

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. **Animal Reproduction**, v.3, p.29-40, 2006.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Effect of prostaglandin F₂alpha on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.315-328, 2007a.

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

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L.; FERREIRA, J.C.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.684-693, 2008.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β estradiol decrease and more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.311-317, 2009.

GRECO, G.M.; AVANZI, B.R.; FIORATTI, E.G.; QUEIROZ, F.J.R.; MEIRA, C.; ALVARENGA, M.A. Efeito da interrupção do tratamento com progesterona em éguas receptoras acíclicas apresentando a formação de corpos lúteos acessórios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.590, 2008.

GUTHRIE, H.D.; POLGE, C. Control of oestrous and fertility in gilts with accessory corpora lutea by prostaglandina analogues, ICI 79.939 and ICI 80.996. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, p.427-430, 1976.

HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004.

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

HOWARD, J.M.; MANZO, R.; DALTON, J.C.; FRAGO, F.; AHMADZADEH, A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.224-233, 2006.

KOHEK, M.B.F.; LATRONICO, A.C. O papel dos receptores das gonadotrofinas na reprodução feminina. Revisão. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.45 p.369-374, 2001.

KYDD, J.; MILLER, J.; ANTCZAK, D.F.; ALLEN, W.R. Maternal anti-fetal cytotoxic antibody responses of equids during pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.32, Suppl, p.361-369, 1982.

LA PAZ, M.N.; FONSECA, V.U.; CAMPOS, D.B.; ARTONI, L.P.; SOUSA, L.M.M.C.; PAPA, P.C. Produção de progesterona in vitro pelas células do corpo lúteo bovino ao longo da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.370-376, 2007.

LEY, W.B. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**. São Paulo: Roca, 2006.

LIRA, R.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.R. Transferência de embrião em equinos: revisão. **Acta Veterinária Brasília**, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

LOIOLA, M.V.G.; PEREIRA, D.F.C.; VASCONCELOS, L.V.; LIMA, M.C.C.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; BITTENCOURT, R.F.; JESUS, E.O.; RIBEIRO FILHO, A.L. Taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos tratadas com um análogo do GnRH no momento da inovulação. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.3, p.782-789, 2014.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.; BARBOSA, R.T.; DE OLIVEIRA, C.A.; BINELLI, M. Ovarian function in nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v.69, p.798-804, 2008.

MATTA, M.P. **Avaliação dos parâmetros de gestação de éguas da raça mangalarga marchador.** 94f. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

MOURA, C.E.B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos.** 123f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v.12, p.27-43, 1991.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.245-262, 2000.

NISWENDER, G.; NETT, T.M. Luteal phase. In: **Equine reproduction.** MCKINNON, A.; VOSS, J.L. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 172-173, 1993.

NOVAES FILHO, L.F. **Resposta luteal à PGF2 α (Dinoprost Trometamina) durante as fases de luteogênese e manutenção do corpo lúteo em éguas.** 51f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.13, n.3, p.203-216, 1980.

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

PINNA, A.E.; CAMPOS, D.G.; LEMOS, S.G.; BRANDÃO, F.Z.; CUNHA, L.E.R.; MEIRELLES, L.R.; SALOMÃO, M.C.; TORRES FILHO, R.A.; ROMÃO, M.A.P. The use of doppler ultrasonography (power-flow mode) for the evaluation of luteal blood perfusion and its correlation with the diagnosis of pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.484, 2014.

RESENDE, H.L. **Comparação da perfusão vascular folicular, luteal, uterina e perfil hormonal plasmático entre éguas jovens e idosas suplementadas ou não com L-Arginina.** 117f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal, UNESP, 2014.

RESENDE, H.L.; CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. Use of Doppler ultrasound for equine fetal sex determination. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, p.285, 2012. Abstract.

RICHARDS, J.S.; HEDIN, L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Annual Review of Physiology**, v.50, p.441–463, 1988.

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

ROMANO, R.M. **Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas**. 101f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, FMVZ – UNESP, Botucatu-SP, 2013.

ROMANO, R.M.; FERREIRA, J.C.; CANESIN, H.S.; IGNÁCIO, F.S.; NOVAES FILHO, L.F.; MEIRA, C. Luteal vascular perfusion and plasma progesterone concentration are not affected by the vascularity of preovulatory follicle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.421, 2012.

SAMPER, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. 2.ed. Saunders-Elsevier, 2009.

SAMPER, J.C.; ESTRADA, A.J.; MCKINNON, A.O. Insemination with frozen semen. In: RUDOLPH, P.; GOWER, J. **Current therapy in equine reproduction**. Maryland Heights-MO: Saunders Elsevier, 2007. p.285-288.

SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.43, p.53-64, 2002.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum functions in cattle: an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.241-251, 2004.

SHOKEIR, A.A.; SHOMA, A.M.; ABUBIEH, E.A.; NASSER, M.A.; EASSA, W.; EL-ASMY, A. Recoverability of renal function after relief of acute complete ureteral obstruction: clinical prospective study of the role of renal resistive index. **Urology**, v.59, n.4, p.506-510, 2002.

SILVA, L.A. Ultrassonografia Doppler na reprodução equina: presente e futuro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária + Equina**, v.29, p.66-77, 2010.

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

SILVA, J.C; COSTA, L.L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. **Theriogenology**, v.65, p.49-60, 2005.

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

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

SILVA, E.S.M.; PUOLI FILHO, J.N.P.; MEIRA, C. Aspectos relacionados à formação, função e regressão dos corpos lúteos suplementares em éguas. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.3, p.283-293, 2012.

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

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, p.339-346, 2006.

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

STOUT, T.A.E. Uso da ultrassonografia com Doppler colorido na clínica reprodutiva equine. **Anais XII ABRAVEQ**, Campinas: São Paulo. 11-12 Junho, p. 40-43, 2011.

SZATMÁRI, V. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.42, n.2, p.93-107, 2001.

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

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

ULIANI, R.C. **Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-B e Doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação.** 154f. Dissertação (Mestrado em Reprodução

Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: YOUNGQUIST, R.S.; THRELFALL, W.R. **Current therapy in large animal theriogenology**. Missouri: Saunders, 2007. p.211-219.

VERMILLON, R.P. Basic physical principles. In: SNIDER, A.R.; RITTER, S.B.; SERWER, G.A. **Echocardiography in pediatric heart disease**. 2.ed. Missouri: Mosby, 1997. Cap.1, p.1-10.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.277-285, 2002.

WIESAK, T. Effect of pregnancy, injection of oestradiol benzoate or hCG on steroid concentration and release by pig luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.86, p.247-254, 1989.

WILSHER, S.; OUSEY, J.; ALLEN, W.R. Abnormal umbilical cord attachment sites in the mare: a review illustrated by three case reports. **Equine Veterinary Journal**, v.41, p.930-993, 2009.

WUTTKE, W.; PITZEL, L.; KNOKE, I.; THEILING, K.; JARRY, H. Immune-endocrine interactions affecting luteal function in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.19-29, 1997.