

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

TIAGO GOMES RODRIGUES

Avaliação do efeito luteotrófico da eCG em éguas

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
2014**

TIAGO GOMES RODRIGUES

Avaliação do efeito luteotrófico da eCG em éguas

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, na área de Biotecnologia da Reprodução.

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
FEVEREIRO 2014**

TIAGO GOMES RODRIGUES

Avaliação do efeito luteotrófico da eCG em éguas

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, na área de Biotecnologia da Reprodução.

Apresentada em 27 de fevereiro de 2014

Banca Examinadora

Dr. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor, Reprodução Animal) UENF.

Dr. Bruno Fagundes (Doutor, Ciência Animal) UNIG.

Dr. Eduardo Shimoda (Doutor, Produção Animal) UCAM.

Prof. José Frederico Straggiotti Silva
(Orientador)

*A vida é uma grande universidade,
mas pouco ensina a quem
não sabe ser aluno...*

Augusto Cury

A Deus, força maior.

*A meus pais, Genilson e Clarinda, pela vida e exemplo de trabalho, honestidade,
carinho e amor.*

Aos que me acompanharam e ajudaram a desenvolver este estudo.

*Aos animais, principalmente aos cavalos, que serviram como objeto de estudo, de
estímulo e dedicação.*

*Aos embriões coletados e potros nascidos, porque, a cada evento observado, estes
serviram de aprendizado, renovação e estímulo para novos estudos.*

DEDICO

Agradecimentos

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – CCTA, pela oportunidade de realização curso e pelos ensinamentos que obtive.

Ao professor orientador, José Frederico Straggiotti Silva, por ser mais que um orientador e profissional; pela sua competência em ajudar, acima de tudo, pela amizade demonstrada durante o curso.

À amiga, companheira e guerreira, Patrícia, que participou direta e indiretamente para a realização deste estudo.

À professora Rosemary Bastos, pela ajuda na execução das mensurações hormonais deste experimento.

Aos amigos, parceiros, Japão e Juli, pela força dada na reta final desta caminhada.

Aos demais professores desta instituição, que acompanharam meu desenvolvimento e sempre me deram apoio.

Aos proprietários dos haras, aos funcionários e tratadores de cavalos de Campos dos Goytacazes, que confiaram em meu trabalho e me ajudaram na condução da presente pesquisa.

Aos funcionários da UENF, aos vigias do curral, em especial, pelo carinho, amizade e compreensão acerca dos horários em que estive em experimento.

A todos aqueles que, embora não tenham sido citados, participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Muito obrigado.

BIOGRAFIA

TIAGO GOMES RODRIGUES, filho de Genilson da Silva Rodrigues e Clarinda Gomes Rodrigues, nasceu em 29 de janeiro de 1983, na cidade de Coronel Fabriciano – MG.

Mudou-se para Campos em 2000, terminando seu 2º grau no Colégio Anglo Sistema de Ensino.

Foi admitido em Janeiro de 2001, no curso de graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ.

Em 2003, entrou no Programa de Iniciação Científica fomentado pela CAPES – UENF, iniciando suas pesquisas no laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal, com término em 2006.

Em 2006, submeteu-se à defesa de monografia e conclusão do curso.

Em março de 2007, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em fevereiro 2009.

Em março de 2009, ingressou no curso de Doutorado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se aos exames finais em janeiro 2014.

RESUMO

RODRIGUES, TIAGO GOMES, M. SC; UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO; JANEIRO 2014, Avaliação do efeito luteotrófico da eCG em éguas.
ORIENTADOR: PROF. JOSÉ FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA.

Este estudo foi conduzido com a finalidade de avaliar o uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) logo após a ovulação de éguas, na formação do corpo lúteo e produção de progesterona. Foram utilizadas 50 éguas, com idade variando de 3 a 16 anos em condição corporal compatível com a atividade reprodutiva, durante duas estações de monta, entre os meses de setembro/março de 2011/2012 e 2012/2013. Estas éguas foram monitoradas por palpação retal e ultrassonografia, sendo observadas as características dos órgãos genitais durante o estro até o dia da ovulação (D0) e no diestro em D2, D4 e D8. O experimento foi dividido em dois tratamentos: **Tratamento I** (n=25) – éguas monitoradas com ovulação natural e **tratamento II** (n=25) – éguas cuja ovulação foi induzida com a administração endovenosa de 1 mg de acetato de deslorelina (análogo do GnRH). Verificada a ovulação, as éguas de ambos os tratamentos foram subdivididas em cinco grupos de cinco animais, obedecendo à administração do fármaco estudado (eCG), sendo **G1**: controle; **GII**: 250 UI eCG no D0; **GIII**: 250 UI eCG no D0 + 250 UI eCG no D2; **GIV**: 500 UI no D0; e **GV**: 500 UI eCG no D0 + 500 UI no D2. Para a avaliação do efeito da dose-resposta do fármaco manipulado nestes animais e influência do eCG na qualidade inicial da glândula luteínica, foram coletados os dados: tônus uterino, ecogenicidade, tamanho do corpo lúteo (CL) e concentração de progesterona. Analisando os parâmetros das características reprodutivas coletadas em função dos tratamentos e grupos por dia, não foram encontradas efeitos de diferenças significativas. Em vista da complexidade dos eventos relacionados e das particularidades peculiares na formação do CL que envolvem a espécie em questão, as investigações a respeito da eCG são de grande valia na aplicação prática das biotecnologias reprodutivas equinas.

Palavras-chave: equinos, corpo lúteo, gonadotrofina coriônica equina (eCG).

ABSTRACT

RODRIGUES, TIAGO GOMES, D. SC; STATE UNIVERSITY OF NORTH FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, JANUARY, 2014, Assessment of the luteotrophic effect of eCG in mares.
LEADER: PROF. JOSE FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA.

This study was conducted to evaluate the use of equine chorionic gonadotropin (eCG) after ovulation in mares in order to evaluate the formation of the corpus luteum and progesterone production. Fifty (50) mares, ranging in age from three to sixteen and body condition compatible with reproductive activity, were used during two breeding seasons between the months of September / March 2011/2012 and 2012/2013. Where were monitored by rectal palpation and ultrasonography were observed features of the genitals during estrus to ovulation day (D0) and diestrus in D2, D4 and D8. The experiment was divided into two treatments: I (n = 25) - Mares monitored with natural ovulation and group II (n = 25) - Mares whose ovulation was induced with intravenous administration of 1 mg of deslorelin acetate (GnRH analogue). Verified ovulation, the mares of both treatments were sub divided into 5 groups of 5 animals, following administration of the study drug (eCG) and GI: control; IGI: 250 IU eCG in D0; GIII: 250 IU eCG in D0 + 250 IU eCG at D2; GIV: Of the 500 IU; and GV: 500 IU eCG at D0 + D2 500 IU. For the evaluation of the dose response effect of the drug in these animals manipulated and influence of eCG on the initial quality of the luteal gland, the data were collected with uterine tone, echogenicity, size of the corpus luteum (CL) and progesterone concentration. No effects of significant differences were found when analyzing the parameters of reproductive traits collected in the treatments and groups per day. Given the complexity of the events related and peculiar characteristics in the formation of CL involving the species in question, investigations regarding the eCG are of great value in the practical application of the equine reproductive biotechnologies.

Keywords: horses, corpus luteum, equine chorionic gonadotropin (eCG).

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 - CICLO ESTRAL	16
2.2 - FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO	18
2.3 - INÍCIO DA GESTAÇÃO E MANUTENÇÃO DO CORPO LÚTEO	24
2.4 - INDUÇÃO DA OVULAÇÃO	27
2.5- A PROGESTERONA E SUA APLICABILIDADE	29
2.6- FORMAÇÃO E FUNÇÃO DOS CÁLCICES ENDOMETRIAIS	32
2.7 - GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA – eCG	35
2.7.1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA eCG	36
2.7.2 - PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA eCG	38
2.7.3 - PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A eCG	40
2.7.4 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA eCG	41
2.7.5 - APLICAÇÃO DA ECG NA BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL	42
2.8- SINCRONIZAÇÃO RECEPTORA/DOADORA	46
2.8.1- SELEÇÃO DE RECEPTORAS NO MOMENTO DA INOVULAÇÃO	48
3 -Materiais e Métodos	51
3.1 - LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS	51
3.2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
TRATAMENTO I	52
TRATAMENTO II	53
3.2.1- DA AMOSTRAGEM	53
3.3- COLETA DOS DADOS	54
3.3.1 - EXAME CLÍNICO DOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS.....	54
3.3.1.1 - OVÁRIOS, FOLÍCULOS E OVULAÇÃO	54
3.3.1.2 - QUALIDADE DE CORPO LÚTEO	55
3.3.1.3 - TÔNUS UTERINO	55
3.3.1.4 - ABERTURA DA CÉRVIX	56
3.3.1.5 - EDEMA UTERINO	57
3.4. - AMOSTRA PARA DOSAGEM DE PROGESTERONA	57
3.4.1 - PROCEDIMENTO DO RADIOIMUNOENSAIO	58
3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5- CONCLUSÃO	71
6 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	72

LISTA FIGURAS

- Figura 1-** Alterações hormonais ocorridas durante do ciclo estral normal de 21 dias na espécie equina 20
- Figura 2-** Perfusão sanguínea do corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de progesterona ao longo do ciclo estral de éguas. 23
- Figura 3-** Esquema de dias para coleta das amostras do experimento, sendo D0 o dia da ovulação da égua monitorada. 53
- Figura 4-** Associação da dinâmica folicular e ecogenicidade uterina 57
- Figura 5 -** Representação gráfica da concentração média de P4 de todas as éguas (n=50), nos dias de coleta amostrais, independente da administração farmacológica submetida..... 69
- Figura 6 –** Representação gráfica da concentração de progesterona nos dias 0, 2, 4 e 8 de acordo com o tratamento e grupos estudados 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Morfoecogenicidade do corpo lúteo	55
Tabela 2- Descrição da rotulagem, para procedimento da dosagem de P ₄ por radioimunoensaio, segundo fabricante do Kit	59
Tabela 3- Avaliação com ultrassonografia dos animais no quarto dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo a morfoecogenicidade do corpo lúteo dentro de cada grupo	63
Tabela 4- Avaliação da ultrassonografia dos animais no quarto dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo o tamanho (mm) do corpo lúteo dentro de cada grupo analisado	65
Tabela 5- Avaliação uterina por meio da palpação retal dos animais no quarto dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo o tônus uterino dentro de cada grupo	67
Tabela 6 – Análise estatística da ecogenicidade do CL, tônus uterino e tamanho do corpo lúteo, comparação das médias entre os grupos com manipulação farmacológica e tratamentos já utilizados. Análise de variância para cada tratamento das características analisadas ($p \leq 0,05$)	68

Lista de abreviaturas

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

FSH - Hormônio folículo estimulante

LH - Hormônio luteinizante

CL – Corpo lúteo

COX-2 - *Ciclo-oxigenase-2*

TEE – Transferência de embrião equino

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

IETS - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

PMSG – Gonadotrofina do soro de égua prenhe

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

zCG - Gonadotrofina coriônica em zebras

dCG - Gonadotrofina coriônica em jumentas

P4 – Progesterona

PGF₂α – Prostaglandina

TP – Trofoblastina

TSH – Hormônio Tireoide Estimulante

IFN-t - Interferon-tau

ng – nanograma

ml - mililitro

UI – Unidade Internacional

1- INTRODUÇÃO

A transferência de embrião equino (TEE) consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora, geneticamente superior, e a transferência deste para uma fêmea receptora, encarregada de levar a gestação a termo. Esta biotecnologia é amplamente utilizada pela indústria equina, tendo cerca de 40 anos de estudos e aperfeiçoamentos, após a primeira descrição de TEE (1972). Desde a década de 1980, a técnica é realizada comercialmente (MCKINNON; SQUIRES, 2007) e, em 1986, o médico veterinário João Junqueira Fleury a trouxe para o Brasil (CAMARGO, 2008), contribuindo com inúmeros estudos e experimentos envolvendo a TEE.

A reprodução equina vem crescendo exponencialmente nas últimas duas décadas, tanto em adeptos como em quantidade de trabalho na área da biotecnologia assistida. Segundo a última publicação (2012) do Comitê Estatístico da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o Brasil figura como o primeiro maior produtor de embriões equinos do mundo, perfazendo mais de 12.000 inovulações, concentradas na Região Sudeste do país, com cerca de 40 centros de TEE registrados (ALVARENGA, 2010). Apesar do desenvolvimento, aperfeiçoamento e elevadas taxas de concepção aplicadas à espécie, seu emprego comercial ainda é muito atrasado em relação a bovinos, ovinos e suínos (RIERA, 2009).

Um dos principais pontos para a baixa eficiência dos programas de TEE, em relação às doadoras, consiste na dificuldade de induzir superovulação em éguas, o que é facilmente atingido nas outras espécies como bovino e ovino. Outro grande problema é a alta percentagem de fêmeas mais velhas usadas repetidamente, o que, além de diminuir a taxa de recuperação embrionária, é considerado um fator de melhoramento genético lento na espécie equina.

Os fatores que influenciam diretamente na TEE são: a qualidade do sêmen do garanhão, o dia da coleta, a qualidade embrionária e a escolha da receptora e/ou barriga de aluguel apta a gestar o embrião, sendo este último um dos mais importantes a ser considerado, visto que, para uma boa seleção, deve-se respeitar o limite de idade, o tamanho do animal, escore corporal, sanidade, estado reprodutivo, habilidade materna, docilidade, parâmetros indispensáveis ao sucesso da taxa de prenhes e redução da perda embrionária precoce, representando um empecilho de

quase todos os programas de TEE. O manejo e o alojamento das receptoras representam um dos itens mais caros no planejamento econômico em um centro de reprodução, estando cada vez mais escassos pelo aumento exponencial da demanda e pela necessidade de grandes áreas para sua manutenção, o que torna relevante o incremento em pesquisas direcionadas à eficiência da técnica no item relação doadoras/receptoras.

Pesquisadores, há 84 anos, descreveram que o soro de éguas prenhes estimulava o aumento do peso ovariano e o desenvolvimento sexual em ratas impúberes. A glicoproteína responsável por tal estímulo foi denominada PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotrofin*). Inicialmente, acreditava-se que este hormônio fosse produzido pela hipófise da égua prenhe (citado por COLE e HART, 1930). No entanto, com a evolução dos estudos imuno-histoquímicos, verificou-se que tal hormônio é sintetizado durante a gestação após a migração das células trofoblásticas do concepto para o endométrio materno, que formam os cálices endometriais (WOODING et al., 2001). Considerando a origem embrionária do PMSG e a semelhança de sua estrutura molecular com a gonadotrofina coriônica humana (hCG), tal hormônio glicoproteico tem sido designado, modernamente, de eCG (*equine Chorionic Gonadotrofin*). Nos equinos, a eCG é fundamental para a manutenção da prenhes, porque estimula a formação de corpos lúteos acessórios, mantendo a síntese de progesterona durante o período inicial da gestação, quando a placenta ainda não é capaz de sintetizá-la.

Em todas as espécies de mamíferos domésticos investigados até o momento, a eCG promove dupla atividade biológica, exercendo o papel semelhante ao do hormônio folículo estimulante (FSH) e ao do hormônio luteinizante (LH), ambos envolvidos na foliculogênese e ovulação. A eCG é a única gonadotrofina capaz de ligar-se tanto aos receptores de LH quanto aos de FSH (ROSA, 2009).

Portanto, o objetivo deste estudo consiste em expor o papel da eCG na reprodução equina, como agente luteotrófico, fato este que tornaria o uso deste hormônio uma ferramenta fundamental em programas de reprodução equina assistida.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- CICLO ESTRAL

O ciclo estral é denominado como um fenômeno rítmico, observado em períodos regulares, mas limitados de receptividade sexual, o estro, que ocorre em intervalos regulares em torno de 21 dias para os equídeos. Segundo McKinnon, e Voss (1992), o ciclo estral é a repetição de uma sequência de eventos em que a égua se prepara para receber o embrião. Os equídeos obedecem a um ritmo circanual reprodutivo, regulados primariamente pelas mudanças no fotoperíodo ao decorrer do ano, apresentando receptividade sexual na primavera e verão, sendo esta espécie classificada como poliéstrica estacional (HAFEZ, 2004).

Este sinal ambiental é traduzido para um sinal endócrino na glândula pineal, localizada no centro do cérebro. Esta glândula varia a síntese de melatonina em decorrência de maior ou menor luminosidade, hormônio este que possui atividade inibitória de gonadotrofinas. Na égua, dias curtos são associados à queda na secreção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, à diminuição na atividade ovariana. Por este motivo, a síntese de melatonina só se faz presente à noite, o que explica o mecanismo de sazonalidade dos equídeos, já que, no inverno, devido aos longos períodos de escuridão e à alta produção de melatonina, as éguas entram em anestro. Durante a fase acíclica, a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal fica deprimida, sendo baixas as concentrações plasmáticas dos hormônios FSH e LH, refletindo um padrão infrequente de liberação pulsátil destes hormônios e a inatividade ovariana (HAFEZ, 2004). A duração do anestro varia entre éguas e também entre os anos na mesma égua (DAELS, 2006).

Após os olhos receberem estimulação luminosa, primavera e verão, há uma sinalização para a glândula pineal e uma posterior inibição da síntese de melatonina, aumentando a produção de gonadotrofinas. O aumento da concentração plasmática de FSH é a chave para o recrutamento folicular, quando tem início seu desenvolvimento sincronizado em forma de onda (HAFEZ, 2004). Ginther (2000) afirma que a emergência das ondas foliculares em equinos e bovinos é estimulada por um pico de FSH e que, nas fêmeas equinas, a onda alcança um pico quando os

folículos atingem o diâmetro de 13 mm, ocorrendo então uma diminuição da concentração de FSH, que não impede que dois folículos alcancem o diâmetro de 22 e 19 mm. Quando os folículos alcançam este diâmetro, ocorre o desvio (GINTHER, 2007), e um folículo se torna dominante, com crescimento contínuo até a ovulação, e o outro, subordinado, regredirá na maioria das vezes. Gastal et al. (2000) concluíram que o LH não está envolvido no início do desvio, embora seja necessário para o crescimento do folículo, após o desvio e a ovulação.

O estro é caracterizado pela presença de folículo dominante, edema uterino, relaxamento cervical e comportamento de receptividade sexual, sinais estes causados pelo aumento de estrógeno circulante, produzido pelas células da granulosa do folículo dominante, preparando o trato genital da égua para receber e transportar os espermatozoides até o oviduto onde irá ocorrer a fecundação (ANDRADE, 1993).

O crescimento do ducto glandular do endométrio, as alterações histológicas do epitélio vaginal durante o ciclo estral, o crescimento do ducto da glândula mamária durante a mamogênese, a liberação de hormônio hipofisário, o auxílio no processo de implantação embrionária, e a potencialização dos efeitos da oxitocina e das prostaglandinas sobre as contrações uterinas, são também resultantes da ação dos estrógenos, segundo Hafez (2004).

O diestro é o período entre a última ovulação e um novo estro. Esta fase é caracterizada pela formação e presença do corpo lúteo após a ovulação (glândula endócrina temporária), que tem a função de produzir progesterona (P4). Esta, quando em concentrações elevadas no organismo, demonstra sinais na égua, como relutância ao garanhão, fechamento da cérvix preparação do útero para receber o embrião, como o aumento da atividade secretória das glândulas endometriais e inibição da mobilidade do endométrio e do estro, sinais que permanecem até a lise do corpo lúteo, totalizando 21 dias do ciclo estral (DAVID et al., 2011).

2.2- FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO

O corpo lúteo é uma estrutura glandular transitória, que inicia seu desenvolvimento no ovário, imediatamente após a ovulação, sob a ação de um conjunto de fatores mitogênicos, angiogênicos e de crescimento, os quais agem sobre as células foliculares remanescentes determinando a luteinização (SALLES e ARAÚJO, 2010). O corpo lúteo (CL) foi descoberto por Coiter em 1573 (LUZ, 2004). A sua origem, função e regulação foram estudadas por Marcello Malpighi em 1689. Em 1672, Regnier de Graaf descreve o corpo lúteo como corpos globulares, estruturas que permaneciam no ovário de coelhas entre o coito e o parto, cujo número está relacionado à quantidade de filhotes, ou então, estruturas transitórias na ausência de fertilização (NISWENDER et al., 2000). Em 1898, Prenant foi o primeiro a considerar o corpo lúteo como uma glândula endócrina. Frankel (1903) verificou que a remoção dos ovários de coelhas prenhes interrompia a gestação, confirmando a hipótese de Gustav Born's de que o corpo lúteo é requerido para a implantação e manutenção da gestação (SMITH et al., 1994). Em 1929, Corner e Allen identificaram a progesterona (P4) como o principal produto secretado pelo CL, sendo que sua fórmula estrutural foi demonstrada por Slota em 1934 (SMITH et al., 1994). Stocco et al. (2007) consideram que o corpo lúteo desempenha um papel central na regulação do ciclo estral e na manutenção da gestação, cuja função é realizada em grande parte pela progesterona. Assim, as evidências levaram a considerar o corpo lúteo como uma glândula endócrina temporária que se desenvolve a partir das células da teca e da granulosa remanescente do folículo ovulado (DAVIS e RUEDA, 2002), com rápido crescimento, diferenciação e luteinização (LUIS e QUINTERO, 1998).

Vários pesquisadores estudaram os mecanismos associados com o desenvolvimento, a manutenção e a regressão do corpo lúteo (MILVAE, 2000; DAVIS et al., 2003; FRASER e WULFF, 2003; BERISHA e SCHAMS, 2005; STOCCO et al., 2007). Os mecanismos intra e extrafoliculares que poderiam afetar a fase luteal e funcional em primatas e ruminantes domésticos foram descritos por vários autores (MILVAE et al., 1996; STOUFFER et al., 2001; DIAZ et al., 2002; SANGHA et al., 2002; WEBB et al., 2002; BOWEN-SHAUVER e TELLERIA, 2003; STORMSHAK, 2003; SCHAMS e BERISHA, 2005). O papel regulador da

progesterona tem despertado interesse, uma vez que determina o comprimento do ciclo estral e a manutenção da gestação, com ações fisiológicas em vários tecidos alvos (BERTAN, 2004). Além disso, a possibilidade de alterar a extensão de seu período ativo abriu perspectivas de controlar a época da ovulação nas diversas espécies de animais domésticos.

O processo ovulatório resulta das interações entre o LH e o AMPcíclico, prostaglandinas e enzimas proteolíticas (GINTHER et al., 1992). A ovulação na égua ocorre na fossa ovulatória que se localiza no bordo côncavo ou ventral do ovário. Um folículo recentemente ovulado é palpado e se apresenta como uma profunda depressão na superfície do ovário, que é preenchida com sangue oriundo da ruptura dos vasos da membrana basal e luteinização das células da granulosa, dentro de 8 a 14 horas, após a ovulação ocorrer (HAFEZ, 2004). O LH estimula as células da granulosa a se transformarem em células luteínicas, que invadem e proliferam no coágulo produzido dentro da cavidade folicular, para assim formar o corpo hemorrágico. Um aspecto interessante do desenvolvimento luteal inicial de algumas espécies é a elevada taxa de crescimento e proliferação celular (ARRUDA et al., 2001). Entre os dias 1 e 2 após a ovulação, esta estrutura começa a produzir progesterona e, quando a concentração plasmática supera 1 ng/ml, inicia-se o diestro, desaparecendo as características e o comportamento associados ao estro. A concentração de progesterona aumenta rapidamente, atingindo níveis séricos elevados aproximadamente no 6º dia do ciclo, quando mantém um platô (ARRUDA et al., 2001).

Durante o diestro, a concentração do LH é basal, sendo induzida pelo mecanismo de *feedback* negativo exercido pela progesterona. Após a luteólise, cessado este efeito inibitório, o estrógeno secretado pelos grandes folículos estimulam a secreção do LH, permitindo o desenvolvimento e maturação dos folículos primários e a secreção de mais estrógeno, estabelecendo o mecanismo de *feedback* positivo. A égua, diferentemente de outras espécies, não apresenta um pico pré-ovulatório de LH, mas sim uma persistente elevação neste período, até atingir o nível máximo em 1 a 2 dias após a ovulação (Figura 1) e então declina nos próximos 4 a 5 dias, voltando a valores mínimos durante a fase de diestro (GINTHER et al., 2008; TAROUCO, 2012).

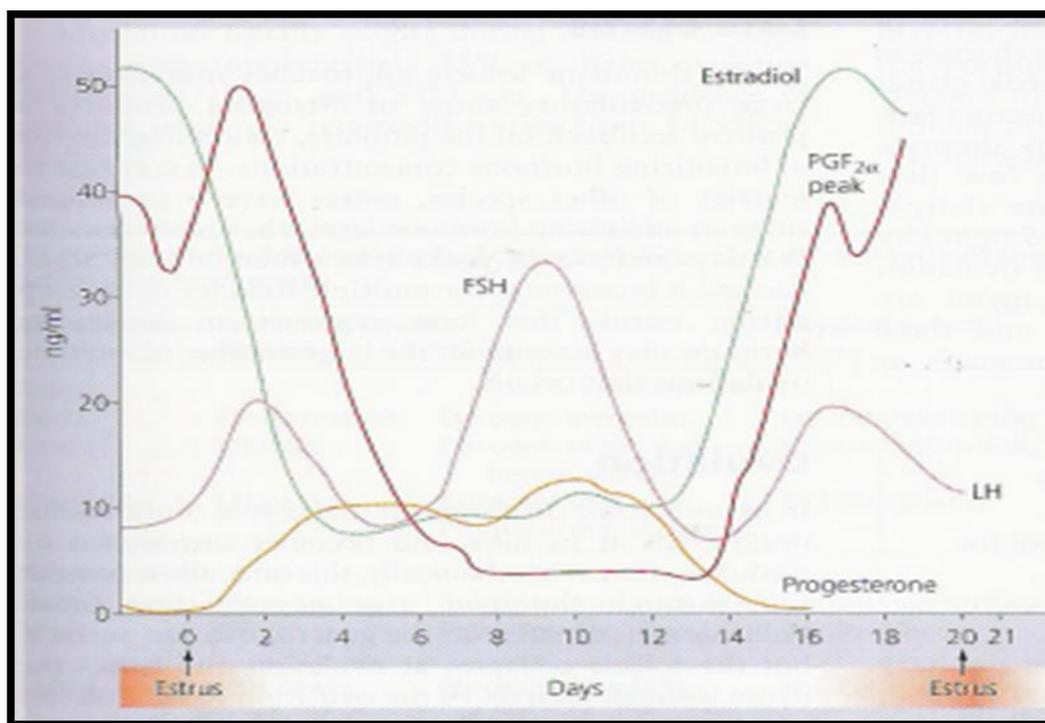


Figura 1- Alterações hormonais ocorridas durante do ciclo estral normal de 21 dias na espécie equina (adaptado de Knottenbelt, D.C., Equine Stud Farm Medicine and Surgery, 1 ed, Saunders, 2003).

Com a maturação do corpo lúteo, este aparece no ovário anatomicamente como uma área firme e esponjosa dentro do estroma ovariano, onde produz de 8 a 10 ng/mL de progesterona até aproximadamente 14 e 15 dias após a ovulação. Após a lise do corpo lúteo, o nível de progesterona diminui rapidamente entre 1 a 2 dias para menos de 1 ng/mL e a égua retorna ao estro (HUGHES et al., 1972).

Diferentes níveis plasmáticos de progesterona, durante o diestro, em éguas têm sido reportados (ARRUDA et al., 2001). Vivo et al. (1986) revelaram que animais em diestro apresentam níveis de P4 acima de 4 ng/ml em 48 horas após o final dos sintomas de estro, 5,49 ng/ml no 5º dia (PLOKTA et al., 1971) e de 7,7 ng/ml no 6º dia (SMITH; 1970) ou 10 ng/ml (STABENFELDT et al., 1971) no 6º dia do ciclo. Plokta et al. (1972) relatam a existência de um segundo pico de P4 com níveis de 7,8 ng/ml no 10º dia do ciclo estral e 9,36 ng/ml no 8º dia. Segundo Fathalla et al.(1988), a média de progesterona da fase luteínica é de 10,29 ng/ml, com variações nos níveis entre os dias 11 e 14 do ciclo estral de 13,95 ng/ml e 12,09 ng/ml.

Níveis máximos de progesterona, durante o diestro, em éguas Puro Sangue Árabe (PSA) são de $6,68 \pm 4,56$ ng/ml e, em éguas mestiças, de $6,56 \pm 1,83$ ng/ml, sendo aceitos como normais os níveis de 4,0 a 12,0 ng/ml para animais em diestro e 9,0 a 30,0 ng/ml para animais entre 15 e 30 dias de gestação (LOPATE e THERELFALL, 1991). Perkins et al. (1993) demonstraram acontecer uma secreção pulsátil de progesterona, concluindo haver em média 3,33 pulsos diários de liberação deste hormônio em éguas no 8º dia da ovulação; revelando que a concentração média de progesterona foi de 7,26 ng/mL. Caiado (2005) encontrou níveis séricos médios de progesterona de 7,0 ng/mL em receptoras que foram selecionadas para receberem embriões, entre os dias 4 e 8 após a ovulação. Segundo Sharp (2000), em éguas que permaneceram gestantes em seu experimento, a concentração plasmática de progesterona se manteve consistentemente acima de 4,0 ng/mL.

O aumento da concentração de progesterona ocorre até o dia 5 após ovulação e mantém um platô até a luteólise. Nagy et al. (2004) revelam também que as concentrações médias de P4, em éguas com mais de uma ovulação, tendem a ser maiores, afirmando que a capacidade de secreção de dois corpos lúteos é maior do que a de um, embora as características inerentes ao indivíduo, como peso, idade, metabolismo e receptores para o hormônio, podem influenciar nas concentrações plasmáticas de progesterona.

As dosagens de progesterona representam um meio eficiente para indicar a atividade da glândula luteínica, embora não possam ser utilizadas para uma avaliação rotineira. Entretanto, com o advento da ultrassonografia, pode-se fazer imediatamente a detecção e a avaliação do desenvolvimento tanto de folículos quanto de corpos lúteos, os quais são reconhecidos via exame ecográfico pelo tamanho, forma e características de ecogenicidade (ARRUDA et al., 2001). Imediatamente após a ovulação, o tecido luteínico em formação não pode ser bem reconhecido, passando a ser sonograficamente detectável após 2 a 4 dias. “Cavidades” em corpos lúteos foram diagnosticadas ultrassonograficamente por Kähn (1993). Estas estruturas luteínicas foram chamadas primordialmente de cistos do corpo lúteo, apresentando cavidades de tamanho variado e ecogenicidade semelhante à apresentada por folículos (ARRUDA et al., 2001).

Fazendo o uso da ecografia colorida *Doppler*, Romano et al. (2012) afirmaram que tanto folículos pré-ovulatórios com alta vascularidade quanto folículos com baixa

vascularidade originam dos corpos lúteos funcionais e semelhantes. Ferreira (2013) concorda que folículos pré-ovulatórios podem apresentar baixa perfusão sanguínea mesmo durante a estação reprodutiva, e conclui que a irrigação folicular não está intimamente relacionada com a posterior função secretora do corpo lúteo.

Uma forma alternativa de avaliação dos corpos lúteos por meio da utilização da ecografia é a medida da ecogenicidade da glândula em diferentes fases após a ovulação (ARRUDA et al., 2001). Escalas subjetivas de cinza, com notas que variam de 1 a 5, medem a densidade pela quantidade de brilho apresentada na tela do aparelho. A quantidade de tecido luteínico pode afetar a produtividade da glândula. Similarmente, a intensidade da ecogenicidade luteínica pode refletir a qualidade hemodinâmica e a funcionalidade luteínica. O período de baixos níveis de progesterona que ocorre no começo e no final do diestro coincide, temporariamente, com o alto escore na escala de ecogenicidade luteínica. Por outro lado, o período de maior produção de progesterona (meio do diestro) coincide com o baixo escore na escala de ecogenicidade luteínica (GINTHER, 1986).

Arruda et al. (2001), ao analisarem os resultados do acompanhamento diário de morfoecogenicidade luteínica, definiram que, até o 2º dia após a ovulação, não se pode caracterizar a imagem do CL com a sua funcionalidade. Uma íntima relação entre a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do CL equino foi recentemente descrita por Ginther et al. (2007a, b, 2008), fazendo uso da ecografia *Doppler*. Revelaram um aumento simultâneo na vascularidade luteal e na concentração plasmática de P4 entre D1 e D6, enquanto a luteólise funcional é acompanhada por uma diminuição progressiva na perfusão sanguínea do CL, figura 2 (GINTHER et al., 2007b, 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 progesterona e na perfusão sanguínea do corpo lúteo a partir de, respectivamente, 40 minutos e 24 horas após o tratamento com PGF2 α .

A presença e a intensidade de sinais *Doppler* sobre o tecido luteal podem ser utilizadas para detectar a refratariedade a tratamentos indutores do estro em éguas (FERREIRA, 2013).

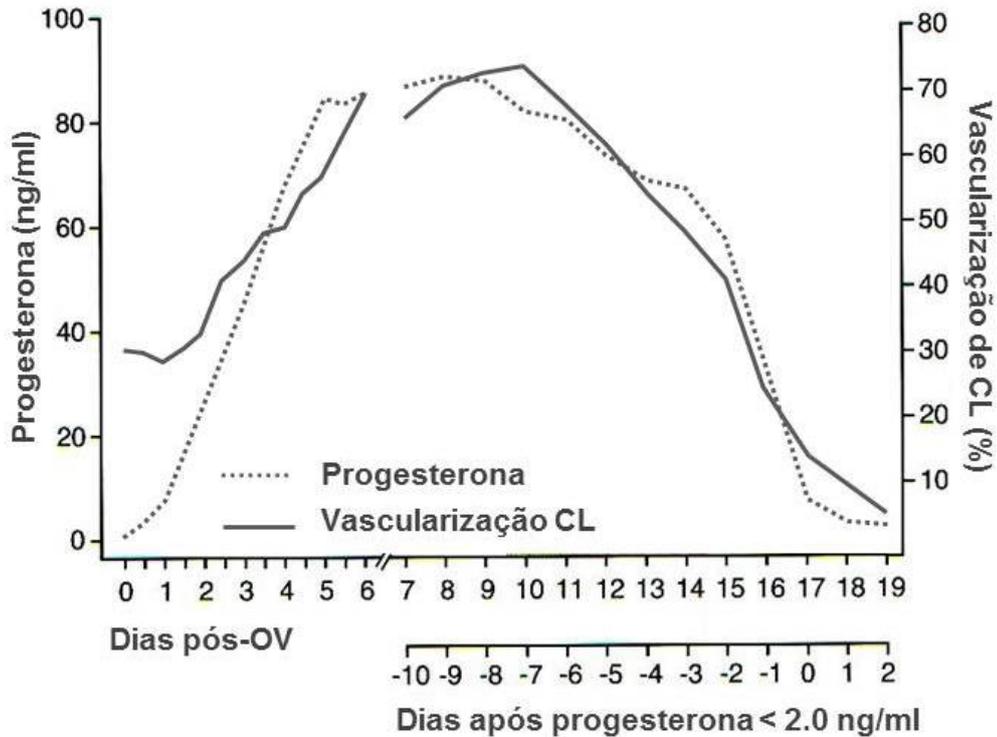


Figura 2. Perfusão sanguínea do corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de progesterona ao longo do ciclo estral de éguas. Uma correlação positiva entre a vascularidade luteal e o *status* funcional do CL é observada (Fonte: Adaptado de GINTHER, 2007b).

A cada ciclo estral, as células luteínicas esteroideogênicas sintetizam e liberam progesterona na circulação sistêmica, promovendo a quiescência na contratilidade do miométrio, o desenvolvimento glandular do endométrio e o ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do conceito. Na ausência da fertilização ou na incapacidade do conceito em sinalizar sua existência no útero, pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ são liberados pelas células endometriais, para promoverem a falência funcional e estrutural do corpo lúteo, determinando o término do ciclo estral e gerando um novo estro (BERTAN, 2004).

2.3 – INÍCIO DA GESTAÇÃO E A MANUTENÇÃO DO CORPO LÚTEO

Muitos aspectos do início da gestação na égua mostram-se únicos no gênero *Equus* e têm importante significado prático na moderna medicina veterinária equina (ALLEN, 2000). A partir da fecundação, até o estabelecimento de uma placenta madura e funcional, aproximadamente aos 150 dias, uma série de alterações morfológicas, imunológicas e endocrinológicas ocorre no oviduto e útero, as quais podem ser consideradas importantes componentes do estabelecimento e manutenção do estado gestacional, e que diferem de eventos equivalentes em outras espécies domésticas (ALLEN, 2000). A espécie equina apresenta particularidades em relação ao desenvolvimento morfológico do embrião, à origem dos anexos fetais, à junção feto-maternal, ao desenvolvimento do âmnio, dos cálices endometriais, à mobilidade do embrião e à atividade fetal (CAIXETA et al., 2008).

No momento apropriado, o embrião deve sinalizar a sua presença no sistema materno, sinal este necessário para a manutenção do corpo lúteo, a produção de progesterona e para a continuação do desenvolvimento do endométrio e da sua atividade secretora. A natureza recíproca do diálogo entre o embrião e o trato reprodutivo da égua tem início já no oviduto, e a mais tangível evidência de que o embrião e o oviduto interagem é o transporte diferenciado entre os ovócitos não fecundados e o zigoto, uma vez que os primeiros normalmente são retidos pelo oviduto, citado por Caixeta et al. (2008).

Allen (2000; 2001) utiliza o termo reconhecimento materno da gestação para comparar as diferentes estratégias utilizadas pelas espécies domésticas para garantir a continuação da vida e da função secretória do corpo lúteo, e então manter o útero em um estágio progestacional adequado para o suporte da gestação e crescimento do feto. McKinnon et al. (2000) acrescentaram que a secreção contínua de progesterona é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas equinas até 120 dias de gestação, já que, a partir deste momento, a placenta responde pelas concentrações progesterônicas.

A forma pela qual a luteólise é suprimida na égua não é bem conhecida, Betteridge (2000), citando Stout et al. (1999), relatou que uma *down-regulation* nos receptores para a oxitocina no endométrio previne a liberação de PGF2 alfa endometrial, evitando a lise do corpo lúteo. Uma elevada taxa na perda de gestação

na égua (32%) ocorre entre os dias 12 e 30 após a ovulação, por uma deficiência na liberação do fator de reconhecimento materno da gestação pelo concepto, o que facilita a ação da prostaglandina, a qual ganha acesso à circulação periférica, através da veia uterina e, acidentalmente, induz a luteólise do corpo lúteo equino (ALLEN e STEWART, 2001). Outros sinais utilizados pelo embrião como síntese de hormônios e proteínas parecem também ser responsáveis pelo reconhecimento materno da gestação, sendo alvo de estudos e pesquisas (CAIXETA et al., 2008).

A transformação do corpo lúteo cíclico em corpo lúteo gestacional implica a inibição da luteólise e a manutenção do estímulo hormonal luteotrófico com progesteronemia elevada. Isto é considerado patológico quando associado à pseudogestação, e é fisiológico na gestação (SALLES e ARAÚJO, 2010). O mecanismo de reconhecimento materno da gestação varia entre as espécies e inclui a inibição da luteólise, a fim de manter a secreção de progesterona indispensável pelo curso da gestação. O embrião exerce um efeito que impede a liberação de PGF2 α ou neutraliza o efeito luteolítico uterino (THIBAUT e LEVASSEUR, 2001).

Nos ruminantes, a transformação do corpo lúteo cíclico em corpo lúteo gestacional é assegurada pela intervenção do embrião, que bloqueia a ação luteolítica do útero, inibindo a secreção de PGF2 α e mantém a ação luteotrófica do LH necessária ao seu desenvolvimento (THIBAUT e LEVASSEUR, 2001). Moléculas secretadas pelo concepto interagem com o endométrio uterino e promovem uma reprogramação da síntese de proteínas no tecido endometrial, impedindo a secreção pulsátil de PGF2 α e a luteólise. O fator antiluteolítico é uma proteína de 20kDal chamada trofoblastina (TP), ou interferon-tau (IFN-t) do tipo I, secretado pelas células mononucleares do trofoectoderma (THIBAUT e LEVASSEUR, 2001).

O interferon-tau provoca diminuição da amplitude e da frequência da secreção pulsátil de PGF2 α pelo endométrio. A molécula proteica interferon é secretada pelo embrião entre os dias 16 e 23 de gestação na vaca e na cabra, 12 e 21 dias na ovelha, e o aumento da síntese ocorre no período de alongamento do embrião (GEISERT et al., 1988).

Embriões subdesenvolvidos que não se alongaram suficientemente são menos capazes de bloquear a luteólise e apresentam menores chances de sobrevivência. O não alongamento do embrião pode ser devido a fatores como retardo no desenvolvimento, anormalidades cromossômicas, anormalidades no meio

ambiente uterino. A incapacidade de alguns embriões em bloquear a luteólise no período considerado crítico, compreendido entre os dias 17 e 19 da gestação, pode levar à luteólise e à volta à ciclicidade.

Em primatas e equídeos, um dos mecanismos de reconhecimento materno da gestação envolve a produção de uma proteína denominada de gonadotrofina coriônica (GC). Em primatas, o conceito com 8 a 12 dias de gestação inicia a produção da GC, proteína dimérica estrutural e biologicamente similar ao LH, que estimula diretamente o corpo lúteo a liberar progesterona. Em equídeos, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) tem ação semelhante à do FSH e vai estimular o crescimento de vários folículos que podem ovular ou luteinizar, formando corpos lúteos acessórios que incrementam a produção de progesterona, a qual ajuda na manutenção da gestação até aproximadamente 150-160 dias de gestação. A partir deste momento, a placenta assume integralmente essa função (NISWENDER et al., 2000; THIBAUT e LEVASSEUR, 2001). Em ovinos, a placenta assume a produção de progesterona a partir dos 50-60 dias de gestação, estimulada pelo lactogênio placentário (PL), que é secretado pelo trofoblasto, a partir de 16-17 dias de gestação, e pela PGE2 (THIBAUT e LEVASSEUR, 2001).

A combinação da presença do interferon-tau e da progesterona evita o desencadeamento da liberação de PGF2 α pelo endométrio. O interferon-tau atua principalmente sobre as células epiteliais como sinal parácrino antiluteolítico. A proteína secretada pelo embrião suprime o aparecimento de receptores para a ocitocina no endométrio e reduz a magnitude dos pulsos de PGF2 α durante o início da gestação. Também é considerado que, em bovinos, o interferon-tau bloqueia a expressão da enzima COX-2 e da prostaglandina sintetase, imprescindíveis para a síntese de PGF2 α (XIAO et al., 1998). Em pequenos ruminantes, o interferon-tau faz com que a forma de liberação da PGF2 α passe de pulsátil para contínua e em pequena quantidade. Neste padrão de liberação, a PGF2 α não tem efeito luteolítico, além de ocorrer a sua transformação em PGE2, que possui efeito luteotrófico, fato que ajuda na manutenção do corpo lúteo (THIBAUT e LEVASSEUR, 2001).

A natureza dos mediadores luteotróficos e antiluteolíticos varia consideravelmente segundo as espécies. Nos ruminantes, o corpo lúteo é necessário durante todo o período de gestação; na cabra, é em torno de 150 dias, visto que, nesta espécie animal, a placenta não secreta progesterona, secreta o lactogênio placentário. Já na vaca, o corpo lúteo é necessário até os 210-230 dias

de gestação e, na ovelha, até 50-60 dias da gestação, porque, nessas espécies ruminantes, após esses períodos, quem assume a produção da progesterona é a placenta (SALLES e ARAÚJO, 2010).

2.4 - INDUÇÃO DA OVULAÇÃO

A alta variabilidade na duração do período do estro e a dificuldade em prever o momento exato da ovulação levaram ao desenvolvimento de métodos para o controle do ciclo estral e da ovulação, especialmente para melhorar o manejo reprodutivo e a sincronização da ovulação (VERONESI et al., 2003).

A maneira mais apropriada para prever o momento de induzir a ovulação consiste na administração de agentes indutores, quando um folículo de 33 mm de diâmetro é detectado em éguas pôneis, e, em éguas, um de 35 mm, período em que o folículo encontra-se responsivo ao LH (MELO et al., 2012). Deste modo, após a indução, a ovulação ocorrerá no período correspondente a 36 e 48 horas da indução, demonstrando uma variação individual acentuada, a qual pode estar relacionada ao diâmetro ovulatório de cada animal (MELO et al., 2012).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem sido utilizada por muitos anos para diminuir o período de estro e acelerar a ovulação. Sua eficiência é amplamente demonstrada na indução da ovulação, quando um folículo pré-ovulatório é detectado (MELO et al., 2012). Fleury et al. (2007) demonstram, em um de seus trabalhos utilizando hCG, que esta glicoproteína, quando administrada em fêmeas equinas, além de induzir a ovulação, tem o efeito de aumentar a produção de progesterona, proporcionando maior porcentagem de éguas com características reprodutivas desejáveis (antecipação na maturação do CL, aumento do tônus uterino, fechamento cervical e ausência de edema) em programas de reprodução assistida.

Apesar de ser um agente indutor de ovulação rotineiramente utilizado, o hCG apresenta a inconveniência de induzir a formação de anticorpos após injeções sucessivas (BERGFELT, 2000). Roser et al. (1979) concluíram que a formação de anticorpos se inicia após duas a cinco injeções de hCG. McCUE et al. (2004) também observaram que repetidas doses de hCG durante a estação de monta está relacionada com a menor eficácia na indução da ovulação, sugerindo a utilização

deste agente no máximo duas vezes em cada estação de monta. Os mesmos autores também observaram uma redução no percentual ovulação entre 24 e 48 horas após a indução nas éguas com idade avançada (acima de 15 anos).

A administração do GnRH sintético durante o estro estimula a liberação de LH e reduz a duração do estro (IRVINE, 1975). O desenvolvimento de agonistas e análogos de GnRH aumentou a meia vida deste hormônio por modificações estruturais (substituição e/ou remoção dos aminoácidos da molécula) no GnRH natural, o que permitiu o aumento na concentração de LH por 12 a 24 horas após a aplicação dos mesmos (BERGFELT, 2000). Samper et al. (2002) compararam o uso de hCG com um implante de acetato de deslorelina (Ovuplant – Pharmacia and UpJohn Co), nas doses de 2500 UI e 2,2 mg, respectivamente. O intervalo entre a indução e a ovulação foi maior para as éguas que receberam hCG (28 a 96 horas) em relação às que receberam o acetato de deslorelina (36 a 42 horas). Deste modo, com a utilização da deslorelina, é possível reduzir o número de coberturas, fato de grande auxílio para os programas de transferência de embrião e inseminação artificial, especialmente para sêmen refrigerado e congelado (MELO et al., 2012).

De acordo com Fleury et al. (2003), ao compararem as doses de 1,0; 1,5 e 2,0 mg de acetato de deslorelina em veículo de liberação lenta (BioRelease Delivery System), observaram que 90% das éguas ovularam em até 48 horas após a indução da ovulação, sendo o tempo médio de ovulação para os referidos grupos: 44,4; 49,8 e 48,7 horas, respectivamente. Fleury et al. (2007), avaliando os efeitos da utilização do hCG e o correlacionando ao acetato de deslorelina, afirmam que este último não induz diretamente a maturação do CL e apresenta um aumento discreto na concentração de progesterona (D6), em relação à concentração do grupo-controle.

O extrato de pituitária equina tem sido usado em diversos protocolos de superovulação em éguas (FARINASSO, 2004). Duchamp et al. (1987) mostraram que a dose de 50 mg de EPE foi eficiente para induzir a ovulação em 86% das éguas, sendo que a dose de 25 mg induziu a ovulação em 57% delas. O extrato de pituitária equina, ao contrário do hCG, não induz a formação de anticorpos, entretanto, deve-se levar em consideração a heterogeneidade das amostras de EPE (FARINASSO, 2004).

Utilizando 1 mg de acetato de deslorelina, Melo et al. (2012) obtiveram taxas de ovulação semelhantes às taxas dos achados de Samper et al. (2002), os quais

constatarem que, ao utilizarem o acetato de deslorelina, as ovulações foram concentradas entre 36 a 42 horas da indução, demonstrando ser uma alternativa eficiente para o hCG. A utilização de 10 mg de EPE intravenoso concentrou o momento da ovulação entre 24 a 36 horas após a indução. Entretanto, a administração de 5mg de EPE induziu a maioria das ovulações no período compreendido entre 36 a 48 horas, 66,6% dos animais em estudo (MELO et al. 2012).

Uma grande vantagem do emprego tanto do acetato de deslorelina, como do EPE na indução da ovulação é a não formação de anticorpos depois de repetidas administrações, como é o caso do hCG (DUCHAMP, 1987).

2.5- A PROGESTERONA E SUA APLICABILIDADE.

A progesterona é formada em todo o tecido esteroideogênico, como: ovário, testículos, glândula adrenal e placenta, tendo participação no anabolismo de todos os outros hormônios esteroides. Embora a progesterona tenha sido isolada do córtex adrenal e da placenta de vários animais, a principal fonte fisiológica continua sendo o corpo lúteo (KAWATE et al., 2000).

A progesterona tem vários efeitos biológicos em tecidos-alvo, mas estes precisam ter sido anteriormente submetidos a um período de estimulação pelo estrogênio (McDOWELL, 1987). Sua secreção é estimulada primariamente pelo LH, e sua função é promover o encerramento dos sinais de estro, manter a fêmea não receptiva ao macho, preparar o útero para a recepção do embrião e manter a gestação inicial, aumentando a atividade secretora das glândulas endometriais e a tonicidade uterina (FARIA e GRADELA, 2010). Além disso, a progesterona pode inibir a liberação episódica de LH, quando em níveis elevados, sendo, portanto, um importante regulador do ciclo estral (GONZÁLEZ, 2002; HAFEZ, 2004).

O estradiol e a progesterona juntos regulam as contrações do oviduto, resultando no transporte do óvulo fecundado para o útero. Os efeitos da progesterona são eficazes após efeitos estrogênicos (ALLEN, 2001). Aumenta a espiralização e a profundidade das glândulas uterinas, preparando o útero para a

implantação e a manutenção da prenhez (HAFEZ, 2004). A espiralização das glândulas aumenta a capacidade funcional, preparando o endométrio para promover a nutrição e o suporte ao concepto até a implantação e ocorrência da placentação (HAFEZ, 2004).

Sob a influência da progesterona, a consistência do muco cervical altera-se, tornando-se altamente viscoso, formando, assim, uma barreira entre o útero e o ambiente externo. Outro papel importante deste hormônio é o de promover o desenvolvimento do lóbulo alveolar das glândulas mamárias, aumentando a capacidade de suporte para uma eventual secreção de leite (CNOP FILHO, 2001).

O transporte dos estrógenos (particularmente o estradiol) e progestágenos (particularmente a progesterona) no plasma são semelhantes. Ambos são completamente carregados pela albumina, embora suas ligações moleculares sejam facilmente corrompidas. O excesso de progesterona está fortemente relacionado à transcortina. Quando os esteroides sexuais atingem a célula-alvo são liberados das proteínas transportadoras e penetram no interior das células onde atuam (JONES et al., 1983).

A secreção uterina, estimulada pela progesterona, produz o leite uterino (McKINNON e VOSS, 1992). O meio ambiente uterino é extremamente importante para o desenvolvimento do concepto equino e a progesterona é essencial para promover este ambiente favorável para uma provável prenhez, sendo que o conteúdo total de proteínas da secreção uterina, no ciclo estral das éguas, decresce rapidamente com o declínio dos níveis plasmáticos de progesterona (SHARP, 2000).

Corner e Allen (1930) prepararam um extrato de corpo lúteo (CL) de porcas em solução alcoólica e verificaram que, quando administrado em coelhas ovariectomizadas, a gestação era mantida. Poucos anos depois, essa substância produzida pelo CL foi isolada por vários grupos de pesquisa, tendo sido denominada de P_4 (BERTAN e BINELLI, 2006). Slotta (1934) relatou a identificação da fórmula estrutural da P_4 e, no mesmo ano, este hormônio passou a ser sintetizado com sucesso (BUTENANDT et al., 1934).

A terapia com progesterona tem uma enorme aplicabilidade no manejo reprodutivo da égua, segundo McKinnon (1999), atuando na: 1- regulação do estro em éguas no período de transição estacional; 2- sincronização de um lote de éguas; 3- regulação do estro em éguas cíclicas lactentes; 4- suspensão do comportamento

do estro; 5- tratamento de patologias reprodutivas; 6- manutenção da prenhez; e 7- coadjuvante na inovulação de embriões.

Existem várias formas de apresentação da progesterona no mercado, sendo Webel (1975) o primeiro pesquisador a reportar o uso de um progestágeno sintético via oral - Altrenogest - para o controle do estro e ovulação na égua. Desde então, tem havido numerosas citações do seu uso para este fim (NEELY, 1988; ALLEN et al., 1980; e SQUIRES et al., 1983) e diferentes veículos de administração têm sido desenvolvidos. Dinger et al. (1981) foram os primeiros a testar, em éguas, dispositivos, esponjas impregnadas com progesterona, inseridas na cavidade vaginal. Injeções intramusculares de progesterona foram desenvolvidas, mas, por serem de aplicações diárias, foram caindo em desuso.

Os progestágenos mais utilizados na hormonioterapia equina são a progesterona injetável oleosa; o altrenogest, que é a única progesterona oral sintética eficaz em cavalos (ALMEIDA et al., 1995); e a progesterona BioRelease Delivery System, conhecida como progesterona de longa ação (P4 LA®150; PINNA et al. 2007).

McKinnon et al. (2000) compararam a habilidade de diferentes progestágenos em manter a gestação de éguas, após a indução da luteólise, aos 18 dias de prenhez. Foram usados medroxiprogesterona, hexanoato de hidroxiprogesterona, altrenogest, norgestomet e o acetato de megestrol, concluindo que somente o altrenogest manteve a gestação, enquanto os outros progestágenos provocaram a perda da gestação entre 2 e 8 dias após a luteólise.

Rocha Filho et al. (2004), em seu experimento, propuseram o uso de receptoras em anestro e em fase de transição, mediante o uso de progestágenos, quando as receptoras destinadas a receber o embrião seriam utilizadas do 4º ao 8º dia após o início do tratamento. Testa et al. (2005) compararam as taxas de perda embrionária, quando inovularam embriões em um grupo de receptoras cíclicas e em outro grupo de receptoras em anestro, tratadas com estradiol e progesterona, não encontrando diferença significativa entre os dois grupos.

Caiado et al. (2007) usaram a progesterona (P4) de aplicação diária em receptoras equinas no período de D0 (dia da ovulação) ao D5, possibilitando a inovulação destas receptoras no D2 e a obtenção de taxa de prenhez estatisticamente similar à encontrada na literatura, com éguas no D5 consideradas excelentes e boas para inovulação. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Rodrigues

et al. (2012) apresentaram taxa de prenhez similares, administrando somente uma única dose de progesterona sintética de longa duração no momento da ovulação da receptora, com a inovulação no 2º dia após a ovulação.

Devido à proibição da comercialização da progesterona de longa ação na União Europeia, devido às normas sanitárias impostas, novos estudos utilizando dispositivo intravaginal impregnado com progesterona têm sido realizados para indução de estro e ovulação em éguas em anestro (WILDE, et al., 2002; VIDE LA et al., 2004; HANDLER et al., 2007), sendo necessário, no mínimo, 1,9 g de progesterona para concentrações séricas suficientes para causar inibição do crescimento folicular e ovulação (VIDELA et al., 2004). A presença de um corpo lúteo no momento da colocação do dispositivo afeta a eficácia do tratamento. Em éguas em anestro, foi observada uma melhor expressão dos sinais de estro, um maior número de éguas ovulando e um maior intervalo entre a remoção do dispositivo e o estro/ovulação do que em éguas em diestro e estro (FARIA e GRADELA, 2010). Por outro lado, as concentrações médias de progesterona e LH, após a aplicação do dispositivo, foram maiores em éguas em diestro (HANDLER et al., 2007). Variações na sincronização da ovulação, após o uso de dispositivos intravaginais de progesterona, têm sido relatadas (WILDE et al., 2002).

O uso de progesterona é contraindicado em éguas com processos infecciosos e/ou inflamatórios, pelo fato de o aparelho genital, quando sob efeito de progestágenos, ser mais susceptível à invasão de microrganismos (ALEXANDER et al., 1991). Assim sendo, o uso de dispositivos intravaginais pode propiciar um processo infeccioso benigno na mucosa vaginal pela ação mecânica que exercem sobre as paredes deste órgão (FARIA e GRADELA, 2010).

2.6- FORMAÇÃO E FUNÇÃO DOS CÁLICES ENDOMETRIAIS

As alterações endocrinológicas que ocorrem na égua durante a gestação são típicas desta espécie, a saber, o desenvolvimento, a função, a manutenção e, finalmente, a degradação dos cálices endometriais, que são estruturas temporárias produtoras do hormônio eCG (GINTHER, 1992; de MESTRE et al., 2008).

Após a ovulação, o corpo lúteo primário passa a produzir progesterona. Esta produção atinge concentrações plasmáticas de 6 a 10 ng/mL no dia 5, após a ovulação, e continuam, na égua prenhe, a crescer até 35 a 40 dias de gestação quando a eCG começa a ser produzida pelos cálices endometriais (ALLEN et al., 2002b). No início do 2º mês de gestação, os cálices endometriais são formados. Estes correspondem a formações de discretas protuberâncias de tecido altamente compacto, semelhantes a um anel, presentes na porção caudal do corno gravídico, resultantes da invasão de células trofoblásticas para dentro do endométrio (SHARP, 2000; WOODING et al., 2001; HAFEZ, 2004).

A égua possui uma placenta do tipo , que representa a forma menos invasiva de placentação (LUNN et al., 1997). No entanto, uma subpopulação de células trofoblásticas altamente invasivas se diferencia entre os dias 25 e 36 de gestação, para formar uma faixa avascular, composta por um tecido denominado cinta coriônica que circunda o concepto esférico na região entre o alantoide em formação e o saco vitelínico em regressão (DE MESTRE et al., 2008). Ao contrário das demais células não invasivas do trofoblasto equino, as células da cinta coriônica começam a se fixar e invadir o epitélio uterino aproximadamente aos 35 dias de gestação (ALLEN et al., 2002b). Segundo Ginther (1992), a formação histológica das células dos cálices pode ser dividida em cinco fases: fixação, invasão, fagocitose, migração e diferenciação. A cinta coriônica, inicialmente, consiste em um envoltório raso para, em seguida, ir-se alongando como estruturas vilosas, em torno do dia 33 (DE MESTRE et al., 2008).

A fixação ocorre no dia 37 e consiste numa ligação entre as interdigitações da superfície das células coriônicas alongadas e os dentículos correspondentes do epitélio endometrial. As células trofoblásticas invadem o endométrio para a penetração do citoplasma nas células epiteliais. Quando a invasão é concluída, somente uma minoria das milhares de células da cinta é transformada em células dos cálices, enquanto as células da cinta que não invadem o endométrio sofrem necrose (DE MESTRE et al., 2008). Continuando a invasão, as células da cinta sequestram e fagocitam as células epiteliais rompidas e desorganizadas (GINTHER, 1992). O processo de invasão destrói o epitélio endometrial em contato com as células da cinta, no entanto, o epitélio se regenera rapidamente e recobre a face luminal dos cálices endometriais em torno do dia 45, deixando este tecido completamente separado da placenta (LUNN et al., 1997).

A fase de migração envolve a penetração das células trofoblásticas e seu conteúdo na membrana basal do epitélio uterino, atingindo o estroma endometrial, entre as glândulas endometriais, formando nódulos distintos de 0,5 a 1,0 cm na superfície do endométrio, os quais circundam o concepto na base do corno uterino gravídico, denominados cálices endometriais (GINTHER, 1992; LUNN et al., 1997; ADAMS e ANTAZAK, 2001). A invasão cessa após a infiltração das células trofoblásticas no estroma endometrial e, então, as mesmas se hipertrofiam e se transformam em células dos cálices maduras (GINTHER, 1992). As células da cinta coriônicas possuem um grande núcleo e nucléolo (DE MESTRE et al., 2008). Sua matriz extracelular provavelmente tem, além da função de adesivo durante a fase de fixação, a função de digestão dos fragmentos das células epiteliais (GINTHER, 1992).

As células da cinta coriônica se transformam em células secretórias, binucleadas durante a formação dos cálices endometriais, e secretam eCG durante aproximadamente os dias 33 a 120 da gestação (LUNN et al., 1997; ADAMS e ANTAZAK, 2001; WOODING et al., 2001; ALLEN et al., 2002B; DE MESTRE et al., 2008). A quantidade secretada é grande e, provavelmente, uma importante parte ocorre no desenvolvimento do contato feto-maternal, necessário para o sucesso da gestação (WOODING et al., 2001).

A concentração da eCG permanece alta até 90 dias de gestação; após esse período, declina e, aos 150 dias, está ausente. O pico de secreção de eCG ocorre entre 55 a 70 dias de gestação, correspondendo ao período de tamanho máximo dos cálices endometriais (ALLEN, 2000).

A partir dos 80 a 90 dias de gestação, ocorre a regressão dos tecidos dos cálices associada a uma intensa resposta leucocitária materna (LUNN et al., 1997; SHARP, 2000; ADAMS e ANTAZAK, 2001; WOODING et al., 2001). Apreciável número de leucócitos maternos, incluindo linfócitos, plasma celular e eosinófilos, acumula-se na base dos cálices endometriais para formar um tipo de barreira imunológica entre os tecidos materno e fetal (ALLEN, 2000), degenerando e destruindo os cálices, sendo assim, a passagem dos ductos obstruídos das glândulas endometriais é restabelecida (ALLEN, 2001).

Os leucócitos maternos invadem o tecido dos cálices e destroem as células fetais, formando um tecido necrótico que aflora na superfície endometrial, dando origem às estruturas pedunculadas no alanto-córion, que se projetam para o interior

da cavidade alantoide, as chamadas bolsas alantocoriônicas (LUNN et al., 1997; ALLEN, 2000).

2.7- GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA – eCG

No início do 2º mês, por volta do dia 35 de gestação, o concepto equino desenvolve um segmento de células trofoblásticas que invade o endométrio do corno uterino gestante, formando os cálices endometriais. Os cálices endometriais são discretas protuberâncias de tecido denso que geralmente são em número de 12, presentes na junção do corno gravídico e o corpo como uma "banda circunferencial", pela separação de um anel de células (faixa de células coriônicas) a partir da placenta (ROSA et al., 2009).

Os cálices endometriais produzem gonadotrofina coriônica equina (eCG), que pode ser encontrada pela primeira vez no sangue, 38-42 dias após a ovulação, tendo uma atividade máxima aos 60-65 dias de prenhez, com um declínio progressivo observado até sua desapareção, em torno de 150 dias de gestação (ROSA et al, 2009). Por se tratar de uma proteína produzida e secretada pelas células placentárias especializadas no útero de éguas prenhes, a eCG também integra a família das glicoproteínas gestacionais (SUGINO et al., 1987, NIKKI KUMARI et al., 2013).

Os cálices endometriais, que contêm antígenos do pai, começam a ser rejeitados em torno do 80º dia, por meio de uma resposta leucocitária mononuclear imunológica típica, com rejeição bem encaminhada por volta do 100º dia. Com 100 - 150 dias, os cálices tornam-se necróticos, desprendem-se da superfície do endométrio e se estabelecem entre este e o alantocórion. Invaginações desenvolvem-se no alantocórion para acomodar os tecidos mortos dos cálices. Estes se tornam bolsas ou vesículas (LEGARDINER et al., 2008).

Portanto, uma função observada da eCG na égua é de proporcionar o isolamento semialogênico do feto no reconhecimento do sistema imunomaterno. As células dos mamíferos em geral fazem primariamente a supressão do sistema imune maternal e, em seguida, ocorre modificação das células imunológicas para fazê-las participar da implantação em vez de rejeitá-la. As células trofoblásticas equinas e, em particular, as células da cinta corial, têm capacidade imunocompetente, como

demonstrada pela persistência no transplante alogênico em éguas não gestantes (DE MESTRE et al., 2011). Não há evidência de que a eCG participe deste imunisolamento, visto que, de fato, os antígenos paternos são reconhecidos pelo sistema imunomaterno do 45º de gestação (BAKER et al., 2000).

2.7.1- PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA eCG

A Gonadotrofina coriônica equina é uma glicoproteína ácida de alto peso molecular, com uma grande cadeia de carboidratos, consistindo principalmente de ácido siálico, galactose e glicosamina (AGGARWAL et al., 1981). Possui um baixo ponto isoelétrico somente 2,4 e resistente à hidrólise ácida (MOORE et al., 1980). A eCG é um hormônio glicoproteico, que se assemelha aos hormônios da pituitária e da tireoide, sendo um heterodímero constituído por uma subunidade α , comum a todos os hormônios glicoproteicos entre os mamíferos, ligada de forma não covalente a uma subunidade β , que é específica a cada um dos hormônios (LEGARDINIER et al., 2008).

Um experimento realizado permutando a subunidade α entre os hormônios glicoproteicos, de diferentes espécies mamíferas, confirma a não alteração funcional dos respectivos hormônios (LH, FSH e TSH). Portanto, a subunidade β é a que determina as diferenças, sejam elas de especificidade e atividade biológica entre os hormônios glicoproteicos. Em todas as espécies analisadas, incluindo os cavalos, a subunidade α mostra estar codificada num único gene, cuja de aminoácidos da subunidade α mostra-se bastante idêntica entre as espécies, revelando de 68% a 79% de homologia da subunidade α equina para as outras espécies mamíferas avaliadas. No entanto, nos equinos, algumas alterações mostram-se presentes, incluindo a transposição da tirosina e da histamina na posição 87 e 93, fato este relacionado a particularidades da gonadotrofina equina (STEWART et al., 1987).

Em geral, cada subunidade β é também codificada por um único gene, que juntos formam uma família de genes relacionados, surgida claramente por meio da duplicação de genes. Foi descoberto que, nos humanos e equinos, a subunidade β teria derivado de uma terminação **C** da subunidade β pituitária e que, com a evolução das espécies, nos equinos por mutação e/ou nos pseudo-genes, a subunidade sofreu algumas modificações, apresentando particularidades próprias (LEIGH et al., 1990).

Estudos realizados com a eCG possibilitaram verificar que, em equinos, a subunidade β da eCG e do LH são idênticas e ambas codificadas por um único gene. Tal gene é expresso tanto na hipófise quanto nas células placentárias (MURPHY e MARTINUK, 1991).

Christakos e Bahl (1979) afirmaram que a subunidade α apresenta peso molecular de 43 kDa e a β , 16,9 kDa. Já Moore e Ward (1980) relataram que a molécula da eCG varia de 52 a 68,5 kDa, sendo que ambas as subunidades apresentaram peso entre 23 kDa. Segundo estes autores, a eCG apresentou diferentes graus de glicosilação, o que impossibilitou um peso molecular fixo. Virmani et al. (2003) relataram que o peso molecular das subunidades α e β possui aproximadamente 40 e 20 kDa, respectivamente. Estes autores compararam frações purificadas, obtidas pelo método cromatográfico em gel de filtração, a partir do soro equino, com padrão internacional de eCG, em gel de poliacrilamina SDS-Page, corado com azul de *coomasie*. Aleixo et al. (1995) observaram uma banda proteica em gel de poliacrilamina SDS-Page, corada com nitrato de prata de frações de plasma de éguas prenhes, precipitado com ácido metafosfórico e etanol, verificando uma banda correspondente à subunidade α em torno de 43 kDa, entretanto, não observaram nenhuma banda com 16,9 kDa.

A estrutura molecular da eCG é constituída por 45% de carboidratos, sendo que a subunidade β apresenta maior concentração de carboidratos. Destes carboidratos que constituem a molécula, aproximadamente 10% correspondem ao ácido siálico (LEGARDINIER et al., 2005). Murphy et al. (1991) relataram a importância do ácido siálico (ácido N-acetil neurâmico) na atividade biológica da eCG. Os mesmos autores verificaram que a remoção parcial dos carboidratos na molécula da eCG determinou uma redução na atividade biológica da mesma. Estes mesmos autores relataram que a glicosilação da eCG é semelhante à do hCG, constituindo uma semelhança entre as moléculas também pela quantidade de carboidratos presentes.

Uma das características da eCG é seu tempo de ação longa (MURPHY, 2012), em ratos, apresenta uma meia-vida de eliminação superior a 5 horas (AGGARWAL e PAPKOFF, 1985), enquanto, em carneiros, é de 21 horas (MARTINUK et al., 1991) e, em bovinos, a meia-vida foi estimada em 45.6 horas (SCHAMS et al., 1978). Sendo a extensa glicosilação da molécula a justificativa para esta meia-vida longa, alguns estudos estabeleceram que a meia-vida da molécula

da eCG em equinos é de aproximadamente de 6 dias (DRION et al., 2001), sendo a grande quantidade de ácido siálico, presente na molécula, o principal fator responsável pela longa meia-vida da eCG (MURPHY, 1991). Outro fator que colabora para a longa meia-vida desta molécula é o fato da eCG ter carga elétrica negativa, o que dificulta a filtração glomerular (LEGARDINIER et al. 2005).

2.7.2- PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA eCG

Cole e Hart (1930) foram os primeiros a descrever a característica particular da molécula de eCG, na função de expressar atividades biológicas similares às do FSH e também do LH ao mesmo tempo, em outras espécies de mamíferos. Administrou-se, em ratas impúberes, soro intraperitoneal, obtido de éguas em diferentes períodos gestacionais, promovendo o crescimento ovariano destes animais. Tal estímulo não foi observado quando o soro era proveniente de éguas com menos de 37 dias de prenhes. O estímulo máximo foi observado quando o soro era proveniente de éguas entre 43 e 80 dias de prenhes. Allen (1969) e Murphy e Martinuk (1991) descreveram que as concentrações séricas máximas de eCG são observadas em torno do dia 60 de gestação, período em que se observou uma atividade biológica entre 60 e 80 UI/mL.

Outros autores relataram alta atividade biológica em éguas com tempo gestacional em torno de 60 dias. Ayres et al. (2007) e Gené et al. (2007) mensuraram a atividade biológica em um “pool” formado com o plasma de quatro éguas, com 60 dias de prenhez em média, apresentando média de 158,4 UI/mL. Gonzales et al. (1998) encontraram uma atividade biológica de 52 UI/mL no plasma de éguas prenhes entre 45 a 100 dias. Aleixo et al. (1995) revelaram uma atividades de 72, 93, 89 e 65 UI/mL, em quatro matrizes com 58, 65, 72 e 85 dias de prenhez, respectivamente. Virmani et al. (2003) verificaram uma atividade biológica de 97 UI/mL do soro de diferentes pôneis de 60 a 110 dias de gestação.

Os hormônios placentários, como hCG e PMSG, apresentam mais de uma atividade biológica. Particularmente, o PMSG se comporta como LH na égua e, ao mesmo tempo, podendo possuir atividade tanto como FSH e LH em outras espécies. Ensaio bioquímicos *in vitro* têm de ser estabelecidos para investigar a dupla atividade molecular do PMSG, a fim de se obter uma imagem correta desta

glicoproteína. Isto envolveria estudos sobre interações hormônio-receptor, modelagem, etc.

Nos mamíferos, a eCG demonstra função luteinizante e folículo estimulante, característica biológica que a torna um potente agente de indução da foliculogênese nos animais domésticos e outros mamíferos. Tal característica a torna um hormônio promissor em protocolos que objetivem a sincronização do estro de fêmeas e, em vários estudos, a eCG demonstrou aumentar a fertilidade de fêmeas bovinas mesmo com condição corporal aquém da desejada (BARUSELLI et al., 2008).

Em equinos, a concentração basal de progesterona necessária para a manutenção da gestação torna-se garantida pela formação e manutenção de corpos lúteos acessórios (HAFEZ, 2004). A eCG promove a ovulação e/ou luteinização de folículos ovarianos entre os 17^o e 50^o dias de gestação. Tal efeito biológico é determinado pela ligação da eCG aos receptores de LH, verificando a manutenção de tais corpos lúteos acessórios até o 180^o dia de gestação. Após este período, as concentrações séricas de progesterona, necessárias à manutenção da prenhez, são garantidas pela placenta (GINTHER et al., 2005). Em gestações de cruzamento entre espécies do gênero *Equus* e formação de híbridos, a produção da eCG é notavelmente diminuída (ALLEN, 1975), com um concomitante aumento na frequência de aborto no início da gravidez (BOETA e ZARCO, 2010).

Em todas as espécies de mamíferos domésticos investigados até o momento, a eCG possui dupla atividade, exercendo ação semelhante à do hormônio folículo estimulante (FSH) e à do hormônio luteinizante (LH), estando geralmente em associação com as gonadotrofinas hipofisárias. O FSH é liberado esporadicamente até 40 dias e, provavelmente, também aproximadamente até o 100^o dia. Antes de 40 dias, o FSH é responsável pelo desenvolvimento folicular e, após os os 40 dias, a eCG passa a causar marcante atividade ovariana (ALLEN e STEWART, 1981).

O corpo lúteo primário de prenhes não é dissolvido no 14^o dia, persistindo até 120-150 dias. Entre os dias 18-40, os ovários são caracterizados pela presença de muitos folículos, e as ovulações não são comuns durante este período. Por volta de 40-120 dias, verifica-se uma atividade ovariana intensiva com o desenvolvimento multifolicular, ovulações e luteinização de folículos não rompidos. Os corpos lúteos acessórios começam a se formar entre os dias 40 a 60 de gestação, como resultado da ovulação; por outro lado, o corpo lúteo é formado no diestro, ou como resultado da luteinização de folículos anovulatórios. Verifica-se que a atividade folicular cessa

após este período (120 dias), quando todos os corpos lúteos regridem e os ovários tornam-se pequenos e inativos. Em suma, a eCG na égua é luteotrófica, possui meia-vida longa, visto que a metade de sua molécula é constituída de carboidratos e, portanto, continua presente por algum tempo, mesmo depois que os cálices endometriais são rejeitados (BOETA e ZARCO, 2010).

Devido à presença dos corpos lúteos acessórios, a concentração na circulação periférica de progesterona aumenta, alcançando e mantendo um platô de aproximadamente 50 a 140 dias, quando então declina, já que a progesterona placentária atua localmente e, assim, as concentrações sanguíneas são baixas após 5 meses.

2.7.3- PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A eCG

A molécula de eCG possui a propriedade de ser potencialmente imunogênica. Essa característica da molécula deve-se principalmente ao seu alto peso molecular, à alta porcentagem de carboidratos presentes e à sua origem heteróloga (DIRON et al., 2001). De fato, o imunomapeamento da eCG com anticorpos monoclonais localizou um grande sítio antigênico, sendo que este inclui o sítio de interação da eCG com os receptores de LH e FSH (CHOPINEAU et al., 1993).

Dessa maneira, a eCG pode induzir a formação de anticorpos pelo organismo quando aplicados exogenamente, o que pode causar refratariedade ao tratamento com a molécula em questão, e apresentar-se como motivo de grande preocupação, principalmente em programas reprodutivos, dos quais a eCG é empregada de maneira repetida e em altas dosagens. Já em equinos, a eCG, por se tratar de uma molécula homóloga, necessita de mais pesquisas para a administração exógena.

2.7.4- MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA eCG

A primeira técnica de extração da eCG foi desenvolvida por Gools e Cole (1940), obtendo um extrato bruto, parcialmente livre das proteínas séricas, precipitando o soro de éguas prenhes com acetona a 4°C. Um variante deste método foi descrito por Gospodarowicz e Papkoff (1967) e Aggarwal et al. (1980), que utilizaram uma solução de etanol a -20°C para solubilizar a eCG e precipitar esta solução com ácido metafosfórico. Os principais métodos de preparo e purificação da eCG descrevem a segregação da gonadotrofina a partir do sangue de éguas entre 60 e 90 dias de gestação, pela exposição do mesmo a condições extremas de pH, às baixas temperaturas e pela presença de solventes (ROSA et al., 2009).

Considerando as perdas de atividade biológica causadas pelas condições extremas de pH e pela exposição a diferentes solventes, Gonzales et al. (1998) propuseram um novo método na preparação da eCG, com o qual a amostra de soro ou plasma de éguas prenhes sofreria uma difiltração em cartucho de hemodiálise, para concentrar a amostra antes de submetê-la à absorção direta em resina de troca iônica e, com isso, obtiveram um rendimento de purificação de 1,5 vezes maior que o primeiro passo do método de purificação da eCG, desenvolvida por Gospodarowicz e Papkoff (1967).

Aleixo et al. (1995) também utilizaram a metodologia básica proposta por Gospodarowicz e Papkoff (1967), para a obtenção da eCG e a utilização em protocolo reprodutivo de ovelhas. Em outros dois estudos de extração e purificação da eCG, Ayres et al. (2007) e Gené et al. (2007) utilizaram o método de difiltração associado à cromatografia de afinidade, seguida de um gel de filtração.

McFarlane et al. (1991) desenvolveram um método para purificação de gonadotrofina coriônica em zebras (zCG) e de jumentas (dCG). Rosa et al. (2009) propuseram a purificação do plasma de éguas prenhes, pelo uso da cromatografia de afinidade com Blue Sepharose, seguida de cromatografia de afinidade com concanavalina A.

2.7.5- APLICAÇÃO DA eCG NA BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL

O papel fundamental da eCG na égua é de induzir a formação de corpos lúteos acessórios, aumentando a produção de progesterona e apoiando o terço inicial da gestão. Existem numerosas aplicações da eCG nas outras espécies domésticas, incluindo a indução de puberdade, a reversão de anestro, a superovulação e, mais recentemente, a melhoria da fertilidade (MURPHY, 2012).

A progesterona é um dos hormônios mais importantes no desenvolvimento embrionário em gestantes. As receptoras que apresentam o teor sanguíneo de progesterona acima de 4 ng/mL de plasma têm maior probabilidade de tornarem-se prenhes, considerando embriões de mesma qualidade. Portanto, se forem usadas técnicas de manejo que melhorem os teores plasmáticos de progesterona, tem-se potencial para melhorar os índices de prenhes, barateando os custos totais nos programas de transferência de embrião.

Várias tentativas têm sido feitas para estimular a produção de progesterona endógena em programas de transferência de embrião. Num processo fisiológico normal, esperar-se-ia que os tratamentos com eCG em equinos promovessem a formação de maior número e/ou condensação das células de corpos lúteos e pudessem também elevar de forma significativa os teores de progesterona.

A gonadotrofina coriônica equina (eCG), usualmente utilizada para induzir a superovulação em ruminantes, não é eficaz para esta função em equinos (GINTHER, 1992), possivelmente por uma limitada ligação da eCG com os receptores de FSH do folículo de éguas não gestantes (McCUE, 1996).

HÁ 40 anos, pesquisadores utilizaram eCG em receptoras bovinas e mostraram haver efeito favorável à elevação da concentração circulante de progesterona, criando o interesse do uso desta glicoproteína na espécie bovina.

Estratégias, como a administração da eCG em vacas, têm sido usadas a fim de induzir a formação de corpos lúteos acessórios e, conseqüentemente, maiores concentrações de progesterona no plasma (BARTOLOME et al., 2012). Os estudos de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, nas diferentes categorias de bovinos, têm demonstrado que a eCG, quando administrado em vacas de corte em anestro e de baixo escore corporal, aumenta as taxas de ovulação, estimulando maiores concentrações de progesterona no plasma e, conseqüentemente, melhores

índices de fertilidade (BARUSELI et al., 2004; BRYAN et al., 2008; DORNELES-TORTORELLA et al., 2013).

Trabalhando com vacas de alta lactação, Souza et al. (2009) discutiram sobre o papel da eCG, nesta categoria de animais, quando submetidos ao protocolo de inseminação, enfatizando os mecanismos fisiológicos que levam à maior produção de P4 luteal, após o tratamento com eCG, quando se pôde observar o aumento da proporção, tamanho e/ou função das células luteínicas do corpo lúteo.

A eCG também pode ser usada para a superovulação de bovinos (dose \pm 2000 UI) ou para melhorar a qualidade do folículo dominante (tratamento estimulador; dose de 400 UI). Durante o protocolo reprodutivo de tempo fixo, a eCG afeta o folículo e o corpo lúteo que se desenvolve, aumentando o diâmetro e acrescentando a função da glândula luteínica, ou seja, aumentando as concentrações plasmáticas de progesterona e a atividade das mitocôndrias nas células luteínicas (RIGOGGIO et al., 2013).

Já a adição de eCG em protocolos de IATF de vacas Nelore lactantes ciclando e em boa condição corporal, tratadas com dispositivos contendo progesterona, não melhora a taxa de prenhez (ERENO et al., 2008). A administração de eCG em vacas lactantes acíclicas, tratadas com progesterona ou progestágenos, tem sido recomendada pela ação do FSH/LH no desenvolvimento dos folículos de vacas em anestro (BRYAN et al., 2008).

Fazendo o uso da eCG em bubalinos, Carvalho et al. (2013) apresentaram resultados satisfatórios: aumento do crescimento do folículo dominante, maiores taxas de ovulação, melhor qualidade do corpo lúteo formado e, conseqüentemente, maiores concentrações de P4 endógeno após a ovulação e acréscimo na taxa de prenhez.

Em ovinos, com o intuito de sincronizar o momento da ovulação, são usadas algumas das gonadotrofinas (gonadotrofina coriônica equina - eCG; gonadotrofina coriônica humana - hCG; FSH), GnRH ou E2. O uso da eCG aumenta o desenvolvimento folicular e a prolificidade em ovelhas em regiões subtropicais (SOUZA, 2013); no entanto, sua eficiência no desenvolvimento folicular pode ser influenciada pelo momento de aplicação em relação ao tratamento de sincronização de estro (ALI, 2007; MURPHY, 2012).

A utilização de progesterona mais a eCG em ovelhas resultou em aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona do 6º ao 10º dias após a ovulação,

e em intervalos menores do estro após a ovulação, quando comparadas com fêmeas sincronizadas com prostaglandinas, o que foi atribuído ao fato de a eCG aumentar a concentração de E2, induzindo o aparecimento mais precoce do estro e do pico pré-ovulatório de LH e FSH (URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2008b).

Os animais que recebem eCG apresentam maiores concentrações de P4, provavelmente como resultado da atividade do CL, associada à dos grandes folículos luteinizados, em resposta à eCG, além da própria liberação do dispositivo de P4 (URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2007, 2008b). A utilização de eCG proporciona uma rápida redução no número de folículos pequenos ao exame ultrassonográfico, levando ao aparecimento de médios e grandes folículos que, sendo a fonte de E2, permitirão, com seu crescimento mais precoce, uma manifestação estral igualmente mais precoce (ALI, 2007). A aplicação da eCG por 24 horas, com a pré-retirada de pessários no dia da retirada ou no momento da monta, mostrou-se efetiva para sincronizar o estro em 100% das ovelhas, sendo 85% delas em até 72 horas após a retirada (TINAJERO et al., 2007). A aplicação da eCG 24 ou 48 horas antes da remoção das esponjas intravaginais resultou em menor intervalo do estro a ovulação, aliado ao desenvolvimento mais precoce de grandes folículos, originados do mesmo *pool* folicular, podendo, portanto, a eCG ser benéfica no uso de IATF (ALI, 2007). Um ponto a ser considerado no uso desta gonadotrofina é que, devido à sua longa meia-vida, pode levar ao desenvolvimento de grandes folículos estrogênicos anovulatórios, os quais influenciam, negativamente, o desenvolvimento embrionário precoce e o transporte no oviduto (HUSEIN e ABABNEH, 2008; MURPHY, 2012). Por outro lado, Ali (2007) cita que o mecanismo pelo qual a eCG aumenta a taxa ovulatória pode ser devido à elevada quantidade de folículos que entram na categoria >2 mm de diâmetro, à prevenção da ocorrência de atresia natural ou à reversão do processo atrésico.

Já em suínos, o uso mais comum da eCG tem sido a exploração da sua atividade na indução do hormônio folículo estimulante (FSH) e a promoção do estro em animais imaturos (MURPHY, 2012). Como a idade média em que os porcos atingem a puberdade pode ser variável, torna-se uma prática-padrão na indústria, para avançar a puberdade em suínos, a combinação de doses relativamente baixas da eCG (400-500 UI) a fim de induzir o desenvolvimento folicular, e a administração de 100-200 UI do hCG para induzir a ovulação. O tratamento dos animais imaturos resulta em um aspecto positivo para a ocorrência dos sinais de estro, em 90% das

marrãs, em 6 dias (BARTLETT et al., 2009). Embora se possa usar a eCG em animais muito jovens, é aconselhável observar o 1º estro cerca de 21 dias mais tarde e, no 2º estro, fazer uso do protocolo (MARTINAT-BOTTE et al., 2011). Isto resulta em taxa maiores de fertilidade (BARTLETT et al., 2009).

O tratamento com eCG tem sido menos frequentemente empregado para induzir a puberdade em ruminantes, embora tenha sido utilizado com sucesso em ovinos (SAWALHA et al., 2011).

De acordo com Maia et al. (2010), existem dois conjuntos de métodos de manipulação do ciclo estral em caprinos: um natural, que emprega o efeito macho, e outro artificial, utilizando-se prostaglandinas, progestágenos e gonadotrofinas.

Kridli e Al-Khetib (2006) e Barrett et al. (2004), trabalhando com 600 e 500 UI de gonadotrofina coriônica equina, mostraram que as fêmeas caprinas dos grupos experimentais manifestaram estro nas 72 horas seguintes ao final da sincronização e não apresentam diferença ($P > 0,05$). Doses de 1.250 UI do mesmo hormônio foram utilizadas por Riesenberg et al. (2001) em cabras fora da estação reprodutiva, quando observaram o mesmo tempo de intervalo. No trabalho de Fonseca et al. (2008), utilizando 200 UI de gonadotrofina coriônica equina e administrando prostaglandina $PGF_2\alpha$ no momento de retirada da esponja (dia 9) em cabras Alpinas, observou-se a redução do intervalo do estro que, em 88% dos animais, ocorreu nas primeiras 36 horas.

Segundo Freitas e Salles (2000), a aplicação de 200 UI de gonadotrofina coriônica equina em cabras Saanen, sincronizadas com progestágenos, modificou o período do intervalo entre a remoção do dispositivo e o início do estro ($22,6 \pm 10,1$ versus $26,6 \pm 10,6$ h). Os tratamentos hormonais com progestágenos associados à gonadotrofina coriônica equina têm apresentado bons resultados de respostas de estro, uma vez que essa gonadotrofina atua no recrutamento folicular ovariano de fêmeas cíclicas ou acíclicas (MIES FILHO et al., 1989). Menchaca et al. (2007) ressaltaram que o início da resposta superovulatória, na ausência de folículos grandes, desencadeou maior taxa de ovulação e melhor produção de embriões em cabras Alpinas. A administração de gonadotrofina coriônica equina, no momento de retirada do dispositivo, possivelmente diminuiu os efeitos negativos de progesterona na dinâmica do crescimento folicular e na ovulação (NOEL et al., 1994). O crescimento do folículo dominante nos animais tratados com gonadotrofina coriônica

equina foi maior que o do grupo-controle, o que concorda com os resultados de Ali (2007).

O aumento do diâmetro do folículo dominante nos animais que recebem gonadotrofina coriônica equina pode ter sido provocado pelos efeitos da gonadotrofina no eixo hipotálamo-hipófise-ovário e pelas alterações nos mecanismos regulatórios intraovarianos, devido, principalmente, à sua meia-vida prolongada e pela sua atividade de LH e de FSH (BARBOSA et al., 2013).

2.8- SINCRONIZAÇÃO RECEPTORA/DOADORA.

O manejo consiste em monitorar o comportamento reprodutivo da égua, utilizando a palpação e a ecografia transretal para acompanhar a atividade folicular e a ovulação. E, caso seja necessário, utilizar também hormônios exógenos para a sincronização do estro e a indução da ovulação. No momento da transferência, é importante que pelo menos duas receptoras estejam disponíveis para cada doadora, permitindo, assim, escolher a que apresenta melhores condições reprodutivas para receber o embrião (McKINNON e SQUIRES, 2007; LIRA et al., 2009).

Um dos métodos mais eficientes e baratos para obter esta síncrona foi descrito por Pashen et al. (1993), utilizando a aplicação de uma única dose de PGF2 alfa durante o diestro de doadoras e receptoras, para se obter a sincronização da luteólise. Já Alvarenga et al. (1998) obtiveram a luteólise por meio da aplicação de uma micro dose de prostaglandina no ponto apropriado de acupuntura localizado no espaço lombossacral, reduzindo as despesas com a sincronização. A sincronização doadora-receptora tem uma enorme influência nos resultados de um programa de transferência de embriões equinos (PANZANI et al., 2009).

As receptoras devem ovular 1 dia antes da doadora (+1) ou até 3 dias depois (-3) (McKINNON e SQUIRES, 2007). Neste caso, é aconselhável o uso de receptoras que estejam entre 4 e 8 dias após ovulação (LOSINNO et al., 2006). No entanto, num estudo de Carnevale et al. (2000), os resultados indicam que o dia pós-ovulatório em que a receptora se encontra seja talvez mais importante que a sincronização doadora-receptora. Quando existe um grande número de receptoras, uma doadora pode ser combinada com uma receptora que tenha ovulado

espontaneamente, sem recorrer à utilização de hormônios para sincronizar os seus ciclos. No entanto, quando isso não é possível, a sincronização tem que ser feita recorrendo à hormonioterapia, uma vez que é aconselhável ter pelo menos duas receptoras para cada doadora (McKINNON e SQUIRES, 2007).

Os hormônios mais utilizados em reprodução são a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), estrogênios (E2), progestagênios (como a progesterona – P4), gonadotrofina coriônica humana, hormônios gonadotróficos (GnRH), extrato de pituitária equina (EPE), hormônio folículo-estimulante equino purificado (eFSH) e ocitocina (FARIA e GRADELA, 2010).

Trabalhos recentes demonstram que receptoras, quando tratadas com progesterona exógena, podem ser utilizadas em um momento mais precoce do ciclo. Caiado et al. (2007), administrando progesterona de ação diária em receptoras a partir do dia da ovulação (D0), permitiram o uso destas já no 2º dia do ciclo (D2). Leury et al (2001) observaram a possibilidade da utilização de receptoras 3 dias após ovulação (D3), desde que estas apresentem bom tônus uterino na avaliação ginecológica. Rodrigues et al. (2012) fazem o uso de progesterona de longa ação no momento da ovulação da receptora, uma única dose e a utiliza já no 2º dia após ovulação (D2).

Nos últimos anos, o ingresso no mercado de novos veículos biodegradáveis de liberação lenta controlada, associados à progesterona, que mantém os níveis plasmáticos por 6 a 8 dias, com uma única aplicação injetável semanal, permite o uso de receptoras em anestro ou em fase transicional (LOSINNO et al.; 2006). Rocha Filho et al (2004) e Testa et al. (2005) avaliaram os índices de prenhes e a perda embrionária precoce em éguas receptoras em anestro ou transicionais, tratadas uma vez por semana com P₄^{LA}, em programas de transferência de embriões no Brasil. Não revelaram, entretanto, diferença significativa entre o grupo não ciclante e o ciclante, o que demonstra que este tratamento é seguro, desde que o emprego de progesterona seja continuado semanalmente até aos 120 dias de gestação.

2.8.1- SELEÇÃO DE RECEPTORAS NO MOMENTO DA INOVULAÇÃO

Losinno et al. (2006) destacam que as receptoras representam o gargalo para o programa de transferência de embrião, tornando-se um dos itens mais caros pelo aumento exponencial da demanda. Destacam ainda alguns pontos importantes no momento da seleção e ou aquisição das mesmas: tipo e tamanho; idade; categoria; sanidade reprodutiva; docilidade e habilidade materna.

Squires et al. (1998); Mckinnon (1999); Carnevale et al. (2000); Squires et al. (2003) destacam que, para a seleção de receptoras, objetivando transferência de embriões, deve-se levar em conta o estado geral da receptora, histórico reprodutivo, grau de sincronia e exame completo da genitália no momento da seleção. Entretanto, nenhum deles fez referência às características encontradas durante o cio e ovulação como fator importante na possível determinação desta seleção.

No exame ultrassonográfico, a dinâmica da ecotextura uterina é influenciada pelos diferentes momentos do ciclo estral, em virtude dos níveis de esteroides ovarianos predominantes. No diestro, sob a ação da progesterona, as pregas endometriais não são identificadas, apresentando uma ecotextura homogênea. Contrastando com isso, durante o estro, a imagem gerada pela insonação transversal no corno uterino apresenta-se claramente em forma de estrela, com partes alternadamente anecoicas até hipoecoicas de baixa intensidade, representando secreção endometrial e tabiques ecogênicos que correspondem às pregas endometriais edematizadas, que caracteriza o chamado edema uterino de ecotextura heterogênea (figura 2) sob a ação estrogênica e se apresenta com maior intensidade 2 dias antes da ovulação, desfazendo o edema após a ovulação (ANDRADE MOURA, 2011).

Caiado (2005), em seu trabalho, relata que os veterinários faziam apenas o controle do desenvolvimento folicular, por meio de palpação retal, com anotações minuciosas do tamanho e consistência dos folículos, ficando este exame restrito aos ovários, na grande maioria das vezes. Por outro lado, o exame completo da genitália, estendendo-se do útero à cérvix, poderia trazer mais informações ao veterinário no momento da transferência de embriões. Isto ocorre porque, no início dos trabalhos de transferência de embriões na espécie equina, a seleção de receptoras levava em conta principalmente o grau de sincronia entre doadoras e

receptoras, classificando as receptoras também quanto às características de todo o trato reprodutivo antes da ovulação e após a ovulação.

Squires et al. (1998, 2003) preconizam que receptoras de embriões equinos devem ser examinadas no dia 4 ou 5 após ovulação, por meio de ultrassonografia, quanto à presença de corpo lúteo e à ausência de fluidos ou dobras endometriais e que, além disto, o trato genital deve ser examinado via retal para observação do tônus uterino e cervical. Éguas que apresentam tônus uterino e cervical considerado excelente apresentam taxa de prenhez maior que as receptoras com tônus considerado marginalmente aceitável, segundo os mesmos autores.

Carnevale et al. (2000) demonstraram que os fatores mais importantes na seleção de receptoras, visando à transferência de embriões em equinos, são o tônus uterino e o cervical. Caiado et al. (2007) analisaram a concentração de progesterona de receptoras, no dia 5 após a ovulação, e concluíram que as consideradas aptas para receberem embriões apresentavam uma taxa de progesterona significativamente maior que as rejeitadas. Carnevale et al. (2000) também afirmaram que receptoras equinas classificadas com tônus uterino excelente ou bom, no momento da transferência de embriões no dia 5 após a ovulação, apresentaram uma taxa de gestação significativamente maior que as que foram classificadas com tônus marginalmente aceitável.

A progesterona é o único fator produzido pelo corpo lúteo necessário para o desenvolvimento da turgidez uterina na égua, segundo Bonafos et al. (1994). Citado por Caiado (2005), estes pesquisadores monitoraram o tônus uterino em éguas prenhes e não prenhes, classificando-os de 1 (flácido) a 6 (túrgido), sendo o trabalho conduzido do D0 ao D20 (D0= dia da ovulação), e a classificação se baseou na palpação do útero. Afirmaram que o pico máximo do tônus, encontrado em éguas não prenhes, ocorreu entre 6 a 13 dias, e que, a partir do D13, o tônus de éguas gestantes é maior que das não gestantes. A aplicação exógena de progesterona, nestas últimas, causa turgidez uterina semelhante à de éguas gestantes, com aproximadamente 30 dias.

McKinnon et al. (1988) trataram éguas ovariectomizadas com estradiol e progesterona, mostrando que o aumento do tônus uterino no início da prenhes e na pseudo-prenhez não é somente atribuído à progesterona, uma vez que a adição de pequenas quantidades de estradiol (1 mg), em éguas tratadas com progesterona (100 mg/dia de P4), resultou num tônus maior que o do tratamento somente com

progesterona ou com progesterona na mesma dose acrescida de 5 mg de estradiol. Estes autores atribuíram a classificação do grau de tônus uterino de 1 (mínimo) a 4 (máximo, tônus do início da prenhes).

Gastal et al. (1998) relataram que os métodos utilizados em diferentes experimentos, visando classificar o grau de contração uterina na égua, tiveram como base o implante de eletrodos e a medida extraluminal do grau de estiramento uterino, sendo que, por palpação transretal, classificaram o tônus uterino num escore de 1 a 4.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3-1. LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS

O experimento foi realizado no campus da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Unidade de Pesquisa Animal do LRMGA/CCTA) e em dois haras em Campos dos Goytacazes - RJ: Rancho Siq e RH Ranch. Latitude - 21°45'15" e Longitude -41°19'28" - altitude 13 metros, clima tropical com temperatura média anual de 22,5°C (GOOGLE EARTH, 2012).

Todo o trabalho de amostragem (coletas e transferências) foi realizado durante duas estações de monta entre os meses de setembro/março de 2011/2012 e 2012/2013. Foram utilizadas, durante o experimento, 50 éguas, com idade variando de 3 a 16 anos, e condição corporal compatível com a atividade reprodutiva.

Estas éguas foram mantidas em regime de campo, com pastagem de gramínea, água e sal mineral *ad libitum*, sendo suplementadas diariamente com volumoso e concentrado em bretes com cochos individuais.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As éguas foram divididas em dois tratamentos: Tratamento I – éguas monitoradas sem indução da ovulação; Tratamento II – éguas cuja ovulação foi induzida com a administração endovenosa de 1 mg de acetato de deslorelina (análogo do GnRH).

Todos os animais com folículos pré-ovulatórios com ou sem indução da ovulação foram monitorados com auxílio de ultrassonografia em intervalos de 12 em 12 horas, até o momento da ovulação. Verificado o término da fase estrogênica e a ovulação das éguas em estudo, as mesmas foram então subdivididas em cinco

grupos, obedecendo à administração do fármaco. Para o tratamento I, éguas (25) sem indução da ovulação: controle, 250 UI eCG no D0, 250 UI eCG no D0 + 250 UI eCG no D2, 500 UI no D0 e 500 UI eCG no D0 + 500 UI no D2. O tratamento II seguiu a mesma ordem da subdivisão, a diferença foi a realização da indução da ovulação em todos os animais.

TRATAMENTO I

Grupo I – CONTROLE: éguas ovuladas naturalmente, coletadas amostras sanguíneas no D0; D2; D4 e D8 para a dosagem da concentração de progesterona.

Grupo II – éguas ovuladas naturalmente, sendo, após a ovulação, administradas 250 UI eCG no D0, amostras coletadas, para a dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo III - éguas ovuladas naturalmente, sendo, após a ovulação, administradas 250 UI eCG no D0 + nova administração de 250 UI eCG no D2, amostras coletadas, para a dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo IV- éguas ovuladas naturalmente, sendo, após a ovulação, administradas 500 UI eCG no D0, amostras coletadas, para dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo V - éguas ovuladas naturalmente, sendo, após a ovulação, administradas 500 UI eCG no D0 + nova administração de 500 UI eCG no D2, amostras coletadas, para dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

TRATAMENTO II

Grupo I – CONTROLE + DESLORELINA: éguas induzidas à ovulação com 1 mg de deslorelina, sendo, após a ovulação, coletadas amostras, para a dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo II – éguas induzidas à ovulação com 1 mg de deslorelina, sendo, após a ovulação, administradas 250 UI eCG no D0, amostras coletadas, para dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo III - éguas induzidas à ovulação com 1 mg de deslorelina, sendo, após a ovulação, administradas 250 UI eCG no D0 + nova administração de 250 UI eCG no D2, amostras coletadas, para a dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo IV- éguas induzidas à ovulação com 1mg de deslorelina, sendo, após a ovulação, administradas 500 UI eCG no D0, amostras coletadas, para a dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

Grupo V - éguas induzidas à ovulação com 1 mg de deslorelina, sendo, após a ovulação, administradas 500 UI eCG no D0 + nova administração de 500 UI eCG no D2, amostras coletadas, para a dosagem de P4, nos seguintes momentos: D0, D2, D4 e D8.

A gonadotrofina coriônica equina utilizada no experimento foi comprada por meio de projeto UENF/FAPERJ – marca registrada “NOVORMON[®]” laboratório Pfizer. A administração da eCG foi realizada via intramuscular, obedecendo à diluição para a concentração hormonal que se pretendia, 250 UI ou 500 UI.

3.2.1 - DA AMOSTRAGEM

Determinada a ovulação das éguas em estudo e a administração do fármaco de acordo com o grupo que elas se encontravam, foram determinados os dias das coletas das amostras (Figura 3), D0 (o dia da ovulação), D2 (dois dias após a ovulação), D4 (quatro dias após a ovulação) e D8 (oito dias após a ovulação).

No dia da coleta das amostras sanguíneas, no próprio brete de contenção, as características do trato reprodutivo foram avaliadas e minuciosamente anotadas, para posterior avaliação e comparação com a quantificação hormonal.

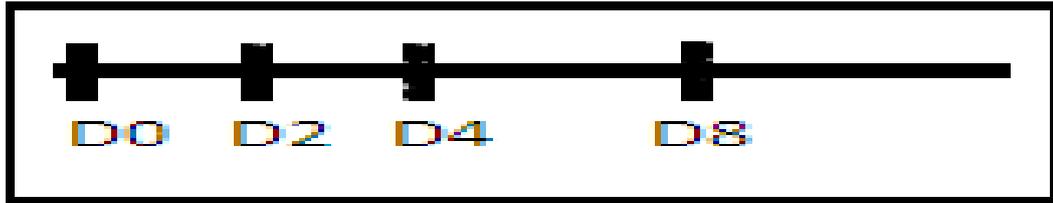


Figura 3- Esquema de dias para coleta das amostras do experimento, sendo D0, o dia da ovulação da égua monitorada.

3.3 - COLETA DOS DADOS

Os dados experimentais foram coletados em éguas cíclicas, durante a estação de monta (primavera – verão) de 2011/2012 e 2012/2013.

3.3.1 - EXAME CLÍNICO DOS ÓRGÃOS REPRODUTIVO

As características do trato genital das éguas foram observadas por meio de palpação retal guiada por ultrassonografia. Anotando-se os parâmetros observados (qualidade de corpo lúteo, tônus uterino, abertura de cérvix e edema uterino) nos respectivos dias de coleta sanguínea e avaliação reprodutiva.

3.3.1.1 - OVÁRIOS, FOLÍCULOS E OVULAÇÃO

Os animais foram monitorados mediante ultrassonografia (US) de 48 em 48 horas, a partir da detecção de comportamento do cio e no momento em que a égua apresentou um folículo ≥ 35 mm e um edema uterino grau 3; este intervalo de exame passou a ser de 12 em 12 horas até a ovulação. O exame dos órgãos genitais foi executado no próprio brete de suplementação alimentar. O acompanhamento do trato reprodutivo, por meio de ultrassonografia, *Midray 2200vet* acoplado a um transdutor transretal linear de 5,0 MHz, auxiliou na avaliação da dinâmica folicular

até a ovulação e posterior observação das características dos órgãos reprodutivos, tais como: tamanho, morfoecogenicidade de corpo lúteo e dissipação de edema dos animais em estudo.

Os dados coletados das características do trato reprodutivo, preconizando a qualidade do corpo lúteo formado, foram cuidadosamente anotados, para fins de coleta de dados sobre o efeito da dose-resposta do fármaco administrado (eCG) e divisão dos tratamentos realizados.

3.3.1.2 - QUALIDADE DE CORPO LÚTEO

Com o intuito de acompanhar e monitorar a morfologia e a ecogenicidade do corpo lúteo do D0 ao D8, imagens ultrassonográficas realizadas dos animais foram capturadas e avaliadas. No 4º dia após a ovulação (D4), a imagem do corpo lúteo foi capturada e realizada a mensuração dos dois maiores diâmetros do CL; com a média dessas duas aferições, foi determinado o tamanho médio (mm) do corpo lúteo.

$$Tm_{CL} = D1_{CL} + D2_{CL} / 2$$

Com base nas pesquisas de Arruda et al. (2001) e Gorreti (2005) que demonstram, por meio da mensuração e escaneamento de corpos lúteos equinos, tabelas próprias para a classificação da morfoecogenicidade do tecido luteínico, as informações de morfoecogenicidade do corpo lúteo foram compiladas em uma escala de 1 a 4 (tabela 1), segundo o grau de ecogenicidade, facilitando o delineamento para tal característica.

Tabela 1- Morfoecogenicidade do corpo lúteo (escore 1 a 4)

Escore	Descrição
1	Pontos ecogênicos e anecoicos com visualização definida
2	Levemente ecogênico, pode ter centro anecoico ou trabeculado
3	Ecogênico podendo ter centro anecoico, mas com limites definidos
4	Hiperecogênico e forma definida

3.3.1.3 - TÔNUS UTERINO

Para o desenvolvimento da turgidez uterina na égua, está comprovada a necessidade de uma adequada produção de progesterona (KAMADA et al., 2013). A contratilidade uterina é determinada por meio de avaliação contínua do corpo uterino, visualizando uma secção longitudinal durante 1 minuto, com base nos movimentos de vai e vem dos pontos de reflexão do endométrio ou dos movimentos de onda observados na superfície ventral do corpo uterino (SILVA, 2003) A classificação do tônus uterino baseou-se na palpação do tecido uterino e com a complementação visual da imagem ecográfica do lúmen, conforme Rodrigues et al. (2009) que classificam o tônus uterino em uma escala de quatro diferentes graus:

- ✓ **Tônus 1-** Mínimo tônus verificado do anestro até o início da atividade cíclica. O formato e consistência do útero não são bem definidos ao exame de palpação retal.
- ✓ **Tônus 2-** O tônus proporcionado pela fase estrogênica do ciclo estral (estro), com útero de consistência macia e formato quase tubular. As contrações do útero ainda não são perceptíveis ao toque.
- ✓ **Tônus 3-** O tônus da fase progesterônica do ciclo estral (diestro). O útero apresenta formato tubular bem definido, com aumento do tônus e consistência. As contrações uterinas são perceptíveis.
- ✓ **Tônus 4-** Máximo tônus do início da prenhes, após o 13^o dia. As contrações uterinas são ainda mais perceptíveis. O útero mantém formato tubular e consistência mais firme.

3.3.1.4 - ABERTURA DA CÉRVIX

Quanto à cérvix, no mesmo exame do trato reprodutivo, foi verificada a abertura ou o seu fechamento.

Realizando a palpação por toque retal, as características da cérvix foram anotadas, sendo que, quando apresentava flacidez e mudança de formato ao toque, características resultantes de uma baixa tonicidade, verificava-se uma cérvix aberta. Por outro lado, quando a cérvix era apalpada e apresentava formato tubular e

consistência firme, evidenciava uma alta tonicidade, que configurava uma cérvix fechada, podendo ser resultado da ação de progesterona no diestro e/ou gestação.

Não foram utilizadas neste experimento, éguas monitoradas via palpação retal, com presença de folículos acima de 35 mm com fluido no lúmen uterino e/ou cérvix fechada.

3.3.1.5 - EDEMA UTERINO

A ecotextura uterina visualizada pela ultrassonografia foi classificada com base no grau de edema das pregas endometriais, utilizando-se uma escala de escore que variou de 0 (ausência de edema) a 3 (grau máximo de edema, pico da fase estrogênica). Desse modo, foram feitas a classificação e a seleção das éguas (n=50) para a análise da hipótese proposta: animais que em estro (um ou mais folículos ≥ 35 mm) apresentaram edema uterino grau 3 (fig. 4).

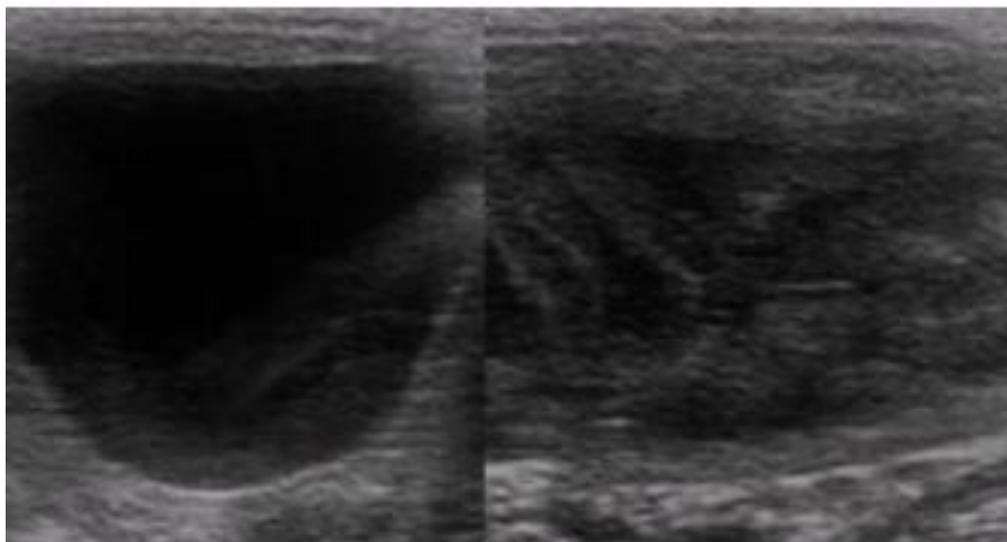


Figura 4 – Associação da dinâmica folicular e ecogenicidade uterina (Fonte: *Imagem US Midray 2200vet: autor*)

3.4. - AMOSTRA PARA DOSAGEM DE PROGESTERONA

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular, numa quantidade de 10 mL em tubos, para a coleta a vácuo, tampa vermelha, sem anticoagulante. Realizada a coleta da(s) amostra(s), o(s) tubo(s) foi (foram) acondicionado(s) em caixa isotérmica e, em seguida, transportado(s) para o Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal – LRMGA/CCTA/UENF – a fim de fazer a centrifugação da(s) amostra(s) e separação do soro em tubo Eppendorf®.

Os tubos Eppendorf® foram cuidadosamente identificados, lacrados e mantidos em freezer a -20°C . No momento em que todas as amostras foram colhidas, foi realizada a dosagem progesterônica, no Setor de Comportamento e Bem-estar Animal do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), pela técnica de radioimuneensaio (RIE) em fase sólida.

Para a coleta das amostras sanguíneas, preconizou-se a antissepsia do local (terço médio da veia jugular lado esquerdo) com algodão embebido em álcool a 70%, na direção do pelo. Após evaporação do álcool, a agulha foi introduzida na veia de um garrote. O êmbolo da seringa foi puxado lentamente, evitando-se a hemólise da amostra. Após a coleta, retirada a agulha e desfeito o garrote, o sangue foi transferido para um tubo a vácuo sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL.

O tubo, para posterior transporte ao LRMGA, foi acondicionado em caixa isotérmica (8°C a 2°C), não ultrapassando o tempo máximo de 2 horas. Chegadas as amostras ao laboratório, os tubos foram preparados para centrifugação (600g/10 minutos).

Após a centrifugação das amostras, o soro foi aliquoteado em tubo Eppendorf®, volume de 2 mL, sempre em duplos exemplares, identificados e congelados em freezer a -20°C , para posterior dosagem progesterônica.

3.4.1 - PROCEDIMENTO DO RADIOIMUNOENSAIO

As concentrações de progesterona das amostras de soro foram determinadas no Setor de Comportamento e Bem-estar Animal do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA). As concentrações de progesterona foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, sendo utilizado o conjunto diagnóstico comercial desenvolvido para dosagem hormonal de progesterona em soro humano (Immunotech® Beckman Coulter Laboratories, Marseille, France), já validado para progesterona plasmática na espécie bovina (ALAÇAM et al., 2009).

Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante.

No dia do ensaio, o conjunto diagnóstico comercial foi deixado em torno de 30 minutos em temperatura-ambiente antes do início do ensaio. As amostras sorológicas foram descongeladas em temperatura-ambiente.

Para a construção da curva de calibração, foram rotulados os tubos, seguindo os parâmetros do manual do fabricante do kit, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2- Descrição da rotulagem, para procedimento da dosagem de P₄ por radioimunoensaio, segundo fabricante do Kit.

Item	Descrição
1	4 tubos de polipropileno (não revestido com anticorpo) de 12 x 75 mm para as contagens totais (T) e ligações não específicas (NSB) em duplicada.
2	18 tubos revestidos com anticorpos de progesterona: dois tubos para P ₀ (ligação máxima com o anticorpo para a progesterona na ausência do padrão ou desconhecido) e dois tubos para cada calibrador (padrão) em ordem crescente correspondendo de Padrão 1 (P ₁ - 0,025 ng/ mL) a Padrão 8 (P ₈ - 45 ng/mL).
3	2 tubos foram utilizados no controle para o controle do ensaio de valor conhecido, fornecido pelo fabricante, e 2 tubos utilizados para o controle do <i>pool</i> das amostras.
4	75 tubos revestidos com anticorpos de progesterona para as amostras plasmáticas.

Após a rotulagem dos tubos como descrito acima, foram pipetados 50 µL do calibrador A nos tubos NSB e P₀; 50 µL dos calibradores remanescentes (padrões de P1 a P8); 50 µL dos controles; 50 µL do *pool* das amostras; e 50 µL das amostras.

Em todos os tubos, foram adicionados 0,5 mL de progesterona ¹²⁵I no espaço de 10 minutos, após pipetar os calibradores (padrões), controles e amostras. Os tubos foram agitados em *shaking* vertical, com velocidade de 200 rpm durante 1 hora, à temperatura-ambiente. Após este período, todo o líquido contido nos tubos foi aspirado através de uma bomba a vácuo, exceto o sobrenadante dos tubos T (contagens totais). A leitura foi realizada por meio do contador gama Wizard 2470.

Foram realizados três ensaios. O controle de qualidade do RIE foi realizado mediante o coeficiente de variação intraensaio, para cada ensaio, sendo de 0,82%, 0,75% e 0,59%; e o coeficiente de variação interensaio foi 0,63%. A sensibilidade mínima detectada para cada ensaio foi de 0,025 ng/mL, 0,08 ng/mL e 0,095 ng/mL. As concentrações de progesterona plasmáticas foram expressas em ng/mL.

3.5 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a metodologia da análise estatística do referido experimento, fez-se necessário a divisão de dois tratamentos: o tratamento I compreendia todos os animais com ovulação natural e o tratamento II compreendia todos animais com ovulação induzida por meio da administração de fármaco. Portanto, com a divisão de cada tratamento, obteve-se a presença de duas variáveis independentes.

Cada tratamento foi dividido em cinco unidades experimentais e/ou grupos, diferindo pela administração ou não de um fármaco em concentração e dias diferentes, em que a concentração de progesterona (P4), tônus uterino, ecogenicidade e tamanho do corpo lúteo (CL) foram as variáveis aleatórias contínuas avaliadas de cada indivíduo, dentro de cada unidade experimental, sendo realizada cinco repetições independentes para cada grupo estudado. Foram avaliados 50 animais para o estudo da hipótese proposta.

Os resultados que envolveram frequência foram apresentados em tabelas de frequência, com número absoluto e a proporção dos casos observados. As características de concentração de progesterona, tônus uterino, tamanho e a morfoecogenicidade dos corpos lúteos em função dos tratamentos e grupos por dia foram estudados por meio de análises de variância pelo método dos quadrados mínimos, enquanto comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey.

As análises de variância foram realizadas pelo aplicativo Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações obtidas com a avaliação dos tecidos e órgãos do sistema reprodutivo equino, por meio da ultrassonografia, foram compiladas, e os resultados de distribuição e frequência das características de ecogenicidade, morfoecometria dos corpos lúteos e tônus uterino das éguas avaliadas (n=50), no 4º dia após ovulação (D4), são apresentados nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

A partir da metodologia, criou-se uma escala de ecogenicidade para o corpo lúteo, variando de 1 a 4, e obedecendo ao delineamento experimental, para a classificação desta característica, pode-se observar que, na tabela 3, 54% (n=27) dos animais apresentaram morfoecogenicidade escore 4, uma tendência fisiológica, visto que, no D4, as células luteínicas do corpo lúteo já estão maduras e em máxima atividade funcional, fato observado e descrito por alguns pesquisadores (STOCCO et al., 2007; GINTHER et al., 2008; TAROUCO, 2012).

O exame ecográfico do corpo lúteo, aliado às características inerentes ao estágio de diestro do órgão reprodutivo, representa um meio utilizado na prática para indicar a atividade da glândula luteínica, apesar de a dosagem de progesterona ser um método mais preciso. Por isso, o exame ecográfico não é utilizado para uma avaliação rotineira, visto que, além de apresentar um custo elevado, a avaliação do corpo lúteo necessita ser prático e rápido, a fim de predizer uma possível receptora apta para ser inovulada e utilizada em programas de transferência de embriões equinos.

Fazendo o uso da ecografia colorida Doppler, Romano et al. (2012) e Ferreira (2013) concordam que a vascularização de folículos pré-ovulatórios não está relacionada com a posterior função secretora do corpo lúteo, afirmando que tanto os folículos pré-ovulatórios com alta vascularidade quanto os folículos com baixa vascularidade originam corpos lúteos funcionais e semelhantes. Com os resultados apresentados por estes pesquisadores, pode-se afirmar que a ultrassonografia representa um método eficiente e rápido para a detecção e avaliação do desenvolvimento, tanto de folículos quanto de corpos lúteos e que, no mesmo exame, são reconhecidos pelo tamanho, forma e características de morfoecogenicidade.

Observa-se que 30% (n=15) dos animais (Tab. 3) apresentaram morfoecogenicidade luteínica escore 3, o que também é condizente com o dia e fase da avaliação (D4), visto que as células destes animais, independentemente do grupo experimental a que pertençam, podem ainda estar em estágio final de maturação, o que não determina falha da funcionalidade da glândula luteínica, mas sim um atraso na maturação e condensação final.

A relação entre a ecogenicidade do CL e produção de P4 foi descrita por Arruda (2001) e Ginther et al. (2007a, 2008), revelando não existir diferença estatística entre a variação de ecogenicidade da glândula luteínica e a produção de P4. No presente estudo, com os resultados apresentados na tabela 3 e 7, confirmam-se as conclusões expostas pelos pesquisadores citados. Portanto, a ecogenicidade do corpo lúteo não tem correlação com a produção de P4, com a diferença de no máximo um ponto na escala de subdivisão (tabela 1). Isto significa que a ecogenicidade não influencia em baixa produção de P4.

Tabela 3- Avaliação com ultrassonografia dos animais no 4º dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo a morfoecogenicidade do corpo lúteo dentro de cada grupo.

Morfoecogenicidade do CL no 4º dia após a ovulação D4													
ME	n=50	Tratamento I					n TI=25	Tratamento II					n TII=25
		G I	G II	G III	G IV	G V		G I	G II	G III	G IV	G V	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8	-	-	1	1	1	3	1	1	1	1	1	5
3	15	2	2	2	1	2	9	1	1	2	1	1	6
4	27	3	3	2	3	2	13	3	3	2	3	3	14

Trat.I - G.I - ovulação natural, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2. **Trat.II** (éguas de ovulação induzida com 1mg/IM acetato deslorelina) - **G.I** - ovulação induzida, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2.

Verifica-se que a morfoecogenicidade escore 2, apresentada por 16% (n=8) dos animais, se distribui entre os tratamentos de forma homogênea, em que, no tratamento I, verificam-se três animais e, no tratamento II, um total de cinco animais. Tais resultados revelam os corpos lúteos com imagens pouco definidas e irregulares, sugerindo falha na formação e condensação das células luteínicas. O baixo escore na ecogenicidade luteínica, apresentada por estas oito éguas, não prediz uma baixa

produção de P4, visto que não foi observada tal diminuição hormonal nestes animais, e também se pode afirmar que, no dia da avaliação (D4) com US, as células luteínicas poderiam ter falhas na maturação e, por isso, ainda não apresentarem ecogenicidade máxima.

Analisando a tabela 3, é verificada uma distribuição homogênea no escore de ecogenicidade do CL dos animais avaliados. Verifica-se a ecogenicidade escore 3, em um total de nove animais para o tratamento I; seis animais para o tratamento II; já para o escore 4, a distribuição dos animais é bem próxima, sendo ordenadas 13 éguas no tratamento I e 14 éguas no tratamento II.

Portanto, observa-se que em relação à ecogenicidade luteínica, entre os dois tratamentos estudados, não houve diferença (sem ou com indução da ovulação). Nos grupos de cada tratamento, também não se observou grande dispersão dos resultados apresentados, mesmo com a realização de diferentes protocolos de administração da eCG (tab. 3). Não foram verificadas alterações na frequência de distribuição dos escores morfoecogênicos do corpo lúteo das éguas avaliadas.

No entanto, não houve presença de animais com escore 1 (Tab. 3), fato este que pode ser explicado pela pré-seleção dos animais avaliados, visto que, para diminuir as variáveis aleatórias analisadas, preconizou-se usar somente éguas na fase estral com folículo ≥ 35 mm, edema uterino grau 3 e ausência de fluido uterino, ou seja, éguas que, na avaliação ultrassonográfica minuciosa, estivessem morfofisiologicamente saudáveis em relação aos aspectos reprodutivos e à fase do ciclo estral.

A hipótese do incremento na ecogenicidade do corpo lúteo, dado pela maior condensação das células luteínicas, foi embasada pelos dados apresentados por pesquisadores, tais como, Murphy e Martinuk (1991) que revelaram, em seus estudos, que o fato de a subunidade β da molécula da eCG e do LH, por serem idênticas e codificadas por um único gene, aliado ao fato de os equinos, diferentemente de outras espécies (GINTHER et al., 2008; TAROUCO, 2012), apresentarem uma persistente elevação do LH até atingir o nível máximo 1 a 2 dias após a ovulação. Tal observação levou à hipótese de que a eCG pode fazer o papel do LH, aumentando a condensação das células luteínicas e estimulando maior atividade da glândula e, conseqüentemente, maior ecogenicidade do corpo lúteo.

Na tabela 4, são apresentados os tamanhos dos corpos lúteos de cada animal (n=50) do experimento. As dimensões do CL foram realizadas pela captura da

imagem do corpo lúteo, formado ao 4º dia após a ovulação, cujo tamanho foi calculado fazendo-se a média entre os dois maiores diâmetros da glândula luteínica mensurada.

A frequência de distribuição do tamanho do corpo lúteo variou de 16,3 a 24,1 mm entre os grupos e tratamentos avaliados, apresentando uma dispersão de 7,8 mm entre o maior tamanho médio e o menor corpo lúteo avaliado. Esta diferença mostra não haver correlação estatística significativa ($p < 0,05$) quanto ao tamanho do corpo lúteo, em função da ecogenicidade do CL e do tônus uterino (tab. 6).

Tabela 4 - Avaliação da ultrassonografia dos animais no 4º dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo o tamanho (mm) do corpo lúteo dentro de cada grupo analisado.

Animal n = 50	Tamanho (mm) do CL no 4º dia após a ovulação D4									
	Tratamento I					Tratamento II				
	G I	G II	G III	G IV	G V	G I	G II	G III	G IV	G V
1	20,8	20,4	20,2	20,3	24,1	16,3	19,3	18,8	18,5	22,3
2	19,4	21,7	19,8	17,8	20,2	21,3	18	19,5	19,3	19
3	18,7	17,2	19,2	19,4	19	18,4	20,4	21	20,3	20,4
4	20	19,8	18,9	18,6	18,9	21	21,7	19,8	17,6	20,2
5	23	18,6	23,3	21,1	17,9	21	18,6	20,3	21,4	19,7
Média	20,38	19,54	20,28	19,44	20,02	19,06	19,06	19,88	19,42	20,32

Trat.I - G.I - ovulação natural, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2. **Trat.II** (éguas de ovulação induzida com 1mg/IM acetato deslorelina) - **G.I** - ovulação induzida, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2.

Avaliando os resultados entre as médias de cada grupo dos dois tratamentos independentemente, encontra-se uma dispersão de 0,36 mm para o tratamento I, e 1,26 mm para o tratamento II, provavelmente, pelo fato de todos os animais do tratamento II terem sido manipulados com 1 mg de acetato de deslorelina (análogo do GnRH). Entretanto, não se pode afirmar que houve uma diferença significativa no tamanho do corpo lúteo, visto que o uso do acetato de deslorelina também não influencia na qualidade, tamanho do corpo lúteo e condensação das células luteínicas, sendo apenas um indutor da ovulação por estimular o *feedback* positivo na hipófise para produção do hormônio luteinizante.

Os resultados apresentados na tabela 5 demonstram o grau de tônus uterino dos animais em experimento, em que 84% (n=42) das éguas mostram tônus uterino grau 3, condizente com a fase de diestro influenciada pela produção de progesterona. Fato também demonstrado na tabela 6, em que, no D4, no momento da avaliação do tônus uterino, verifica-se uma concentração média de progesterona em torno de 7 ng/mL para toda população estudada. Também avaliando a tabela 5, verifica-se que 16% (n=8) das éguas permaneceram com tônus uterino grau 2, mesmo tônus da fase do estro e/ou recrutamento folicular até a ovulação. O elevado índice de animais com tônus uterino 3 deve-se ao fato de, quando ocorreu a pré-seleção aleatória dos animais (n=50), todos estarem em condições morfofuncionais do aparelho reprodutivo condizentes à fase do ciclo estral (HAFEZ 2004).

O tônus uterino 1 não foi verificado na população estudada (tab. 5), já que todas as éguas estavam ciclando e o tônus 1 é característico da fase fisiológica de anestro; também, não foi verificado tônus 4 nos animais estudados, por este tônus ser característico de prenhes precoce em equinos que começa a se desenvolver a partir do 15º dia após a ovulação.

Como um dos objetivos do trabalho é criar mais uma ferramenta para a utilização de éguas destinadas a receptoras de embrião e, com o apoio de pesquisas neste sentido, é importante afirmar que as receptoras necessitam ter um ciclo estral normal e ser livres de problemas reprodutivos (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; LOPES, 2002; SQUIRES et al., 2003, LOOSINO et al, 2006; RORIGUES et al., 2012). É de fundamental importância que as mesmas apresentem características de funcionalidade da glândula luteínica, detecção de um CL visível, produção de progesterona (Fig. 3), ausência de líquido intrauterino, cistos e dobras endometriais e tônus uterino (grau 3 – tab. 4). Tais características combinadas com o fechamento cervical, determinado pela palpação retal, tornam-se os principais critérios para a seleção da receptora na fase de diestro entre os dias 4 e 8 após a ovulação.

Comparando o tônus uterino entre os tratamentos, nos quais a diferenciação foi induzir ou não a ovulação, pode-se concluir que não houve diferença estatística no que se refere ao tônus uterino, já que os animais foram escolhidos aleatoriamente e ordenados mediante a ovulação que acontecia.

Observa-se, no grupo três (GIII) de ambos os tratamentos, uma maior dispersão na característica tônus uterino: no GIII do tratamento I, 40% (n=2) dos

animais apresentaram tônus uterino 2, já no GIII do tratamento II, 60% (n=3) tônus uterino III. Esta maior dispersão não tem relação com os tratamentos (indução x não indução) e os grupos experimentais envolvidos, uma vez que, para os outros parâmetros reprodutivos apresentados, todos os animais estudados dos diferentes grupos apresentam o mesmo comportamento. Os grupos manipulados com doses de eCG menores e os administrados com doses maiores de eCG não apresentam tal magnitude de dispersão. Tais observações são válidas para o momento de seleção de receptoras para a transferência de embrião equino, porque um tônus uterino de baixo escore pode estar aliado a uma deficiência na produção de progesterona e/ou à falta de receptores para este hormônio nas células endometriais (RODRIGUES et al., 2012).

Pode-se afirmar, mediante a análise das médias apresentadas na tabela 6 sobre os parâmetros reprodutivos avaliados, que também esta maior dispersão na tonicidade uterina do GIII de ambos os tratamentos não tem relação com a ecogenicidade e tamanho do corpo lúteo.

Tabela 5 - Avaliação uterina por meio da palpação retal dos animais no 4º dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo o tônus uterino dentro de cada grupo.

Tônus	n=50	Tônus uterino no 4º dia após a ovulação D4										
		Tratamento I					Tratamento II					
		G I	G II	G III	G IV	G V	G I	G II	G III	G IV	G V	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8	-	-	2	1	-	-	1	3	1	-	-
3	42	5	5	3	4	5	5	4	2	4	5	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Trat. I - G.I - ovulação natural, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2. **Trat.II** (éguas de ovulação induzida com 1mg/IM acetato deslorelina) - **G.I** - ovulação induzida, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2.

A relação entre a ecogenicidade luteínica, tônus uterino e tamanho do corpo lúteo pode ser visualizada na tabela 6, em que, para tais características, foram comparadas as médias entre os grupos para cada tratamento, não sendo observadas diferenças estatísticas na análise de variância ($p > 0,05$), teste Tuckey, das médias e entre os tratamentos para cada grupo.

As informações sobre a relação entre a ecotextura e a morfologia do corpo lúteo e a concentração plasmática de P4 são controversas. Pierson e Ginther (1985) citam que o tamanho e a ecogenicidade luteal podem refletir na produção de P4. Entretanto, Townson et al. (1989), Ferreira (2000), Nagy et al. (2004) e Castro (2005) verificaram que o tamanho do CL parece não ter efeito significativo sobre a concentração plasmática de P4, o que é observado, quando comparadas as tabelas 5 e 6, mostrando não haver diferenças estatísticas das variáveis analisadas na análise de variância ($p > 0,05$), teste Tuckey.

Tabela 6 – Análise estatística da ecogenicidade do CL, tônus uterino e tamanho do corpo lúteo, comparação das médias entre os grupos com igual manipulação farmacológica e tratamentos. Análise de variância para cada tratamento das características analisadas ($p \leq 0,05$).

Grupo	ECOG		TÔNUS		TAMANHO	
	Trat I	Trat II	Trat I	Trat II	Trat I	Trat II
Grupo I	3,60±0,24	3,40±0,40	3,00±0,00	3,00±0,00	20,38±0,74	19,60±0,98
Grupo II	3,60±0,24	3,60±0,24	3,00±0,00	2,80±0,20	19,54±0,77	19,60±0,66
Grupo III	3,20±0,37	3,20±0,37	2,60±0,24	2,40±0,24	20,28±0,79	19,88±0,37
Grupo IV	3,40±0,40	3,40±0,40	2,80±0,20	2,80±0,20	19,44±0,59	19,42±0,67
Grupo V	3,20±0,37	3,40±0,40	3,00±0,00	3,00±0,00	20,02±1,08	20,32±0,55
Média	3,40±0,14	3,40±0,15	2,88±0,07	2,80±0,08	19,93±0,34	19,76±0,28

Trat. I - G.I - ovulação natural, G.II – 250 UI eCG D0, G.III – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, G.IV – 500 UI eCG D0, G.V – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2. Trat.II (éguas de ovulação induzida com 1mg/IM acetato deslorelina) - G.I - ovulação induzida, G.II – 250 UI eCG D0, G.III – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, G.IV – 500 UI eCG D0, G.V – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2.

Diferentes níveis plasmáticos de progesterona, durante o diestro em éguas, têm sido reportados (FERREIRA, 2013), Nagy et al. (2004), em seu trabalho, completam esta afirmativa quando revelam também que as concentrações médias de P4 em éguas podem diferir pelas características inerentes ao indivíduo, como peso, idade, metabolismo e receptores para o hormônio, influenciando nas concentrações plasmáticas de progesterona. Bem como ovulações múltiplas, ou seja, éguas que apresentem mais de um corpo lúteo.

Arruda et al. (2001) afirmam que a concentração de progesterona aumenta significativamente após a ovulação e se estabiliza em torno do 4º dia. Segundo Nagy et al. (2004), o aumento da concentração de progesterona ocorre até o 5º dia após a ovulação e mantém um platô até a luteólise, fato este que pode ser visualizado na

figura 4, em que a concentração média de progesterona entre os animais (n=50) estudados cresce em maior ritmo até o D4 e, após este período, mantém um platô de concentração.

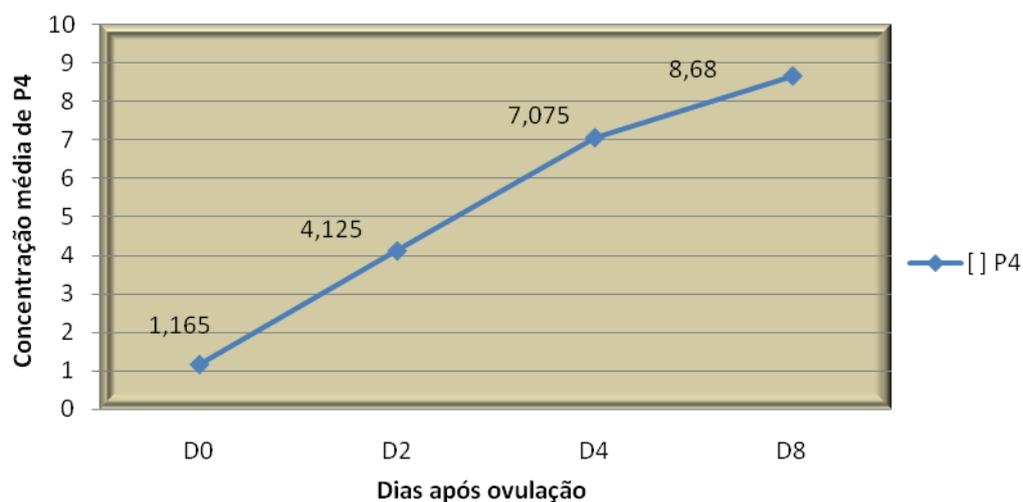


Figura 5 - Representação gráfica da concentração média de P4 de todas as éguas (n=50), nos dias de coleta amostrais, independentemente da administração farmacológica submetida.

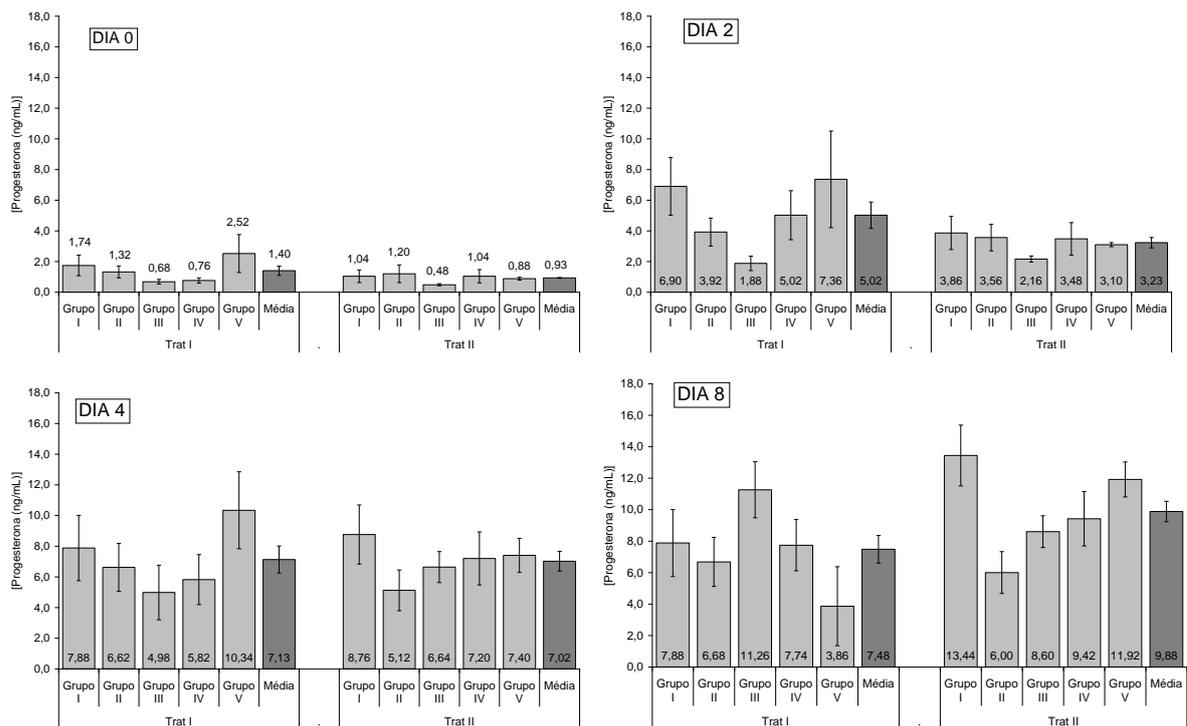
A concentração média de progesterona da população estudada, independentemente de tratamento ou grupo experimental, pode ser visualizada na figura 5. A afirmativa de que, mesmo com os diferentes grupos analisados e as variações na concentração dos fármacos (eCG) administrados nos diferentes grupos, os resultados obtidos estão de acordo com os dados apresentados por Caiado et al. (2005), em que os animais em diestro, com a manipulação farmacológica de um progestágeno, apresentam níveis de P4 acima de 4 ng/ml, 48 horas após o final dos sintomas de estro.

Vários autores revelam variadas concentrações de progesterona dentro de cada raça. Segundo Fathalla et al.(1998), trabalhando com éguas da raça BH, descreveram a média de progesterona da fase luteínica de 10,29 ng/ml. Já em éguas Puro Sangue Árabe, Lopate e Therelfall (1991) descreveram que os níveis máximos de progesterona durante o diestro são de $6,68 \pm 4,56$ ng/ml e, em éguas mestiças, de $6,56 \pm 1,83$ ng/ml, sendo aceitos como normais os níveis de 4,0 a 12,0 ng/ml para animais em diestro, e 9,0 a 30,0 ng/ml para animais entre 15 e 30 dias de gestação. Perkins et al. (1993) demonstraram uma secreção pulsátil de progesterona, revelando que a concentração média de progesterona foi de 7,26

ng/mL. Caiado (2005) encontrou níveis séricos médios de progesterona de 7,0 ng/mL em receptoras selecionadas para receberem embriões, entre os dias 4 e 8 após a ovulação.

Quando comparada a concentração de progesterona média entre os grupos estudados e relacionando-a entre os tratamentos I e II, pode-se afirmar, observando os dados apresentados na tabela 6, que as médias seguidas por letras diferentes representam diferenças de médias entre os tratamentos para um mesmo grupo e um mesmo dia. Portanto, realizando a análise do tratamento I, independentemente do tratamento II, não houve diferença entre os grupos de cada tratamento para nenhum dos dias (Fig. 6).

Figura 6 – Representação gráfica da concentração de progesterona nos dias 0, 2, 4 e 8 de acordo com o tratamento e grupos estudados.



Trat. I - G.I - ovulação natural, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2. **Trat.II** (éguas de ovulação induzida com 1mg/IM acetato deslorelina) - **G.I** - ovulação induzida, **G.II** – 250 UI eCG D0, **G.III** – 250 UI eCG D0 + 250 UI eCG D2, **G.IV** – 500 UI eCG D0, **G.V** – 500 UI eCG D0 + 500 UI eCG D2.

É importante observar que a indução da ovulação com análogo do GnRH não influenciou os níveis de P4 entre os tratamentos analisados, entretanto, no

tratamento II, quando realizada a indução da ovulação e a administração concomitante de 500 UI da eCG no D0 e 500 UI da eCG no D2, foi demonstrada uma diferença estatística, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste t de Student, entre as médias na concentração de P4 do grupo V para o D8 de cada tratamento analisado.

Talvez estas éguas tenham sido submetidas a um fenômeno cumulativo, dose dependente, já que se manifestaram no 8º dia (D8), neste trabalho, sob as maiores doses administradas de eCG.

Conforme consta na literatura os níveis de P4, no dia da ovulação, se assemelham com os encontrados na presente pesquisa, tanto para éguas com ovulação natural e como para as éguas induzidas à ovulação (acetato de deslorelina), cujos níveis entre elas não diferem estatisticamente.

No 2º dia (D2) após a ovulação, os níveis médios de P4 dosados no trabalho (Fig. 6) corroboram os resultados para o D2 encontrados na literatura consultada, que são em torno de 4 ng/mL. Para os grupos do tratamento I, em éguas com ovulação natural, verifica-se uma média (n=25) na concentração de P4 de $5,02 \pm 0,86$ ng/mL e, para os grupos do tratamento II, em que as ovulações foram induzidas com 1 mg de acetato de deslorelina, a concentração média de P4 foi de $3,23 \pm 0,34$ ng/mL, concentração esta um pouco abaixo da citada pela literatura e a encontrada no tratamento I, entretanto, como se trata de média amostral, esta diferença não representa relevância estatística.

No 4º dia (D4) após a ovulação, os níveis médios de P4, para o tratamento I, foram $7,13 \pm 0,88$ ng/mL e, para o tratamento II, foram $7,02 \pm 0,65$ ng/mL (Fig. 6), valores bem próximos, sendo tais resultados também encontrados por Caiado et al. (2005), que verificam um valor médio de 7 ng/mL em éguas destinadas a receptoras de embrião.

As concentrações médias de P4 no 8º dia (D8) entre as éguas não induzidas foram $7,48 \pm 1,34$ ng/mL e, para as induzidas, $9,88 \pm 0,89$ ng/mL. O valor um pouco mais elevado para as éguas induzidas ocorreu em função, principalmente, das dosagens de P4 encontradas no grupo V do 8º dia (D8), porém sem feito de significância estatística na análise dos tratamentos em conjunto, sem levar em consideração os grupos de forma independente.

5 - CONCLUSÃO

A relação entre a ecogenicidade luteínica, o tônus uterino e o tamanho do corpo lúteo pode ser usada para a seleção de receptoras de embrião equino, predizendo a funcionalidade da glândula luteínica e adequada produção de progesterona.

Sendo um estudo pioneiro na reprodução equina com a administração da eCG como agente luteotrófico, serão necessários mais estudos para teste e confirmação da hipótese.

6- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, A. P.; ANTCZAK, D. F. Ectopic transplanted of equine invasive trophoblast. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 753-763, 2001.

AGGARWAL, B. B.; FARME, S. W.; PAKOFF, H.; SEIDEL, J.R. G. E. Biochemical properties of equine chorionic gonadotrophin from different pools of pregnant mare sera. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 23-570, 1980.

AGGARWAL, B.; PAKOFF, H. Plasma clearance and tissue uptake of native and desialylated equine gonadotropins. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 2, p. 173-181, 1985.

AGGARWAL, B. B.; PAKOFF, H. Relationship of sialic acid residues to in vitro biological and immunological activities of equine gonadotropins. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 1082-1087, 1981.

ALAÇAM, E.; AY, S. S.; SABAN, E. The evaluation of various radioimmunoassay progesterone kits for different stage of reproductive period in the cow, sheep and bitch. **Journal Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 56, n. 1, p. 37-41, 2009.

ALEIXO, J. A. G.; DECHAMPS, J. C.; BORDIGON, V.; PIMENTEL, C. A.; MORAES, J. C. F. Gonadotrofina coriônica equina: Purificação caracterização e resposta ovariana em ovinos e suínos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 111-114, 1995.

ALEXANDER, S. L. E.; IRVINE, C. H. G. Control of onset of breeding season in the mare and its artificial regulation by progesterone treatment. **Journal Reprod. Fertil. Suppl.**, n. 44, p. 307-319, 1991.

ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Rumin. Res.**, v. 72, p. 33-37, 2007.

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, n. 4, p. 513-527, 2001a.

ALLEN, W. R. Luteal deficiency and mortality in the mare. **Reprod. Dom. Animal**, v. 36, p. 121-131, 2001b.

ALLEN, W. R. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotropin. **Journal of Endocrinology**, v. 43, p. 593-598, 1969.

ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. In: **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP)**. 2000. p. 338-354.

ALLEN, W. R.; ROWSON, L. E. A. Surgical and Non-surgical Egg Transfer in Horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 525-530, 1975.

ALLEN, W. R.; STEWARD, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal Reprod. Fertil.**, v. 62, p. 527-536, 1981.

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

ALLEN, W. R.; URWIN, V.; SIMPSON, D. J.; GREENWOOD, R. S.; CROWHURST, R. C.; ELLIS, D. R. Preliminary studies on the use of an oral progestagen to induce estrous and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares. **Equine Vet. J.**, v. 12, p. 141-145, 1980.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; STEWART, F.; OUSEY, J.; FOWDEN, A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. **Journal of endocrinology**, v. 172, n. 2, p. 237-246, 2002.

ALVARENGA, M. A.; FERREIRA, J. P. C.; MEIRA, C.; LUNA, S. P. L. e BURNS, P. J. Induction of luteolysis in mares utilizing a micro - dose of prostaglandin F2 alfa in sacral lumbar space. **J. Equine Vet. Sc.**, v. 18, n. 3, p. 167-169, 1998.

ALVARENGA, M. A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 8, p. 319–333, 2010. Suplemento 1.

ANDRADE MOURA, J. C. DIAGNÓSTICO POR IMAGEM NA REPRODUÇÃO EQUINA “CONTROLE DO ÚTERO” **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 161-170, 2012.

In: Palestra apresentada no VI CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Fortaleza, CE, Brasil, 27 a 29 de junho de 2012.

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; 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. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 233-239, 2001.

AYRES, G. R.; BERTAN, C. M.; ROSSA, L. A. F.; BINELLI, M.; CESAR, M. C.; RICHTZENHAIN, L. J. Extração e Purificação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) do plasma sanguíneo de égua prenhe por cromatografia de afinidade: emprego da resina Blue-Sepharose. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP/15º, 2007, São Paulo: **SIICUSP**, 2007, v. 1, p. 832-832.

BARBOSA, L. P.; BISCARDE, C. E. A.; DUTRA, P. A.; CARDOSO NETO, B. M.; SOUZA, D. O. Sincronização e inseminação artificial em sistemas de produção de caprinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 151-155, 2013.

BARRET, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding season in ewes. **Theriogenology**, v. 61, p. 311-327, 2004.

BARTLETT, A.; PAIN, S. J.; HUGHES, P. E.; STOTT, P.; VAN WETTERE, W. H. The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 114, p. 219-227, 2009.

BARTOLOME, J. A.; PEREZ WALLACE, S.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. The effect of administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) post artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 78, p. 1110 – 1116, 2012.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82, n. 83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo

fixo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3º, 2008, Londrina, PR, **Anuais...** Londrina, PR, 2008, v. 1, p. 146-167.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 29, p.305-317, 2005.

BERGFELT, D. R. Estrous synchronization in the mare. In: Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 195-228.

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

BERTAN, C. M.; BINELLI, M. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal Veterinary Resarch Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 691-702, 2000.

BOETA, M.; ZARCO, L. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, p. 531-532, 2005.

BONAFOS, L. D.; CARNEVALE, E. M.; SMITH, C. A. e GINTHER, O. J. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. **Theriogenology**, v. 42, p. 1247-1255, 1994.

BOWEN-SHAUVER, J. M.; TELLERIA, C. M. Luteal regression: a redefinition of the terms. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 24, p. 1-28, 2003.

BRYAN, M. A.; EMSLIE, R.; HEUER, C. Comparative efficacy of an 8-day Cue-Mate/estradiol benzoate program with or without inclusion of equine chorionic gonadotropin in anestorus dairy cows. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 20, p. 85, 2008.

BUTENANDT, A.; WESTPHAL, U.; COBLER, H. Uber einen abbau des stigmasterins zu corpus-luteum-worksamemstoffen, ein beitrag zur konstitution des corpus-luteum-hormons (vorlauf mitteil). **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v. 7, p. 1611-1616, 1934.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S. et al. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 12, n. 1-3, p. 11-15, 2005.

CAIADO J. R. C.; FONSECA F. A.; SILVA J. F. S.; FONTES R. S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Bras. Zootecnia**, v. 36, p. 360-368, 2007.

CAIXETA, E. S. et al. Desenvolvimento embrionário inicial equino—revisão Early equine embryonic development—a review. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 103, n. 565-566, p. 25-34, 2008.

CAMARGO, C. E. Fatores reprodutivos que interferem em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo. 2008. 76f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARNEVALE, E. M.; RAMIRES, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M.; VANDERWAL, L. D. K. & MCCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 965-979, 2000.

CASTRO, R. P. R. Influência de aspectos reprodutivos e hormonais de éguas doadoras e receptoras de embriões da raça campolina sobre a taxa de gestação e morte embrionária. Niterói, 2005. 70f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

CARVALHO, N. A. T. et al., Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 79, p. 423–428, 2013.

CHIRISTAKOS, S.; BAHL, O. P. Pregnant mare serum gonadotropin, purification and physicochemical, biological and immunological characterization. **The journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 254, p. 4253-4261, 1979.

CHOPINEAU, M.; MAUREL, M. C.; COMBARNOUS, Y.; DURAND, P. Topography of equine chorionic gonadotropin epitopes relative to the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor interactions sites. **Molecular and cellular Endocrinology**, v. 92, p. 229-239, 1993.

CNOP FILHO, F. P.; MATTA, M. F. R.; MATTA, C. G. F.; SÁNCHEZ, R. J. R.; ELIGIO, C. T.; RIEUMONT, J.; CRUZ, G. M.; VIANNA, S. A. B.; SILVA, J. F. S. Níveis sanguíneos de progesterona a partir de um implante subcutâneo de um carreador polimérico impregnado de P4. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 359-360, 2001.

COLE, H.; HART, G. H. The potency of blood serum mares in progressive stages of pregnancy effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology**, n. 93, p.7, 1930.

DAELS, P. F. Management of the Anestrus Mare through the Early Spring Transition Period, 2006. Keros - **Equine Embryo Transfer Center**, Passendale, Belgium.

DAVID, F. F.; BISOL, J. F. W.; EVANGELISTA, R. M.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; WOLF, C. A.; GREGORY, R. M.; JOBIM, M. I. M.; RODRIGO COSTA MATTOS, R. C.; Artificial photoperiod: it's influence on mare's autumn transition period and seasonal anestrus. **Pferdeheilkunde**, v. 27, n. 3, p. 277-280, 2011.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Front Biosci**, v. 7, p.1949-1978, 2002.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R.; BOROWISKI, K. S. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum - Review. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.1, p.89, 2003.

DE MESTRE, A. M.; ANTCZAK, D. F.; ALLEN, W. R. Equine chorionic gonadotropin (eCG). In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. Equine reproduction. 2^a ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2011. p. 1648-63.

DE MESTRE, A. M.; BACON, S. J.; COSTA, C. C.; LEADBEATER, J. C.; NORONHA, L. E.; STEWART, F.; ANTCZAK, D. F. Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles. **Placenta**, v. 29: p. 158-169, 2008.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂α production in the CL. **Mol Cell Endocrinol**, v. 191, p. 65-68, 2002.

DINGER, J. E.; NOILES, E. E.; BATES, M. J. L. Effect of progesterone impregnated vaginal sponges and PMSG administration on estrous synchronization in mares. **Theriogenology**, v. 16, p. 231–237, 1981.

DORNELES TORTORELLA, R.; FERREIRA, R.; TONELLOTTA DOS SANTOS, J.; SILVEIRA DE ANDRADE NETO, O.; BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.; & PEREIRA NEVES, J. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, n. 8, p. 1204–1209, 2013.

DRION, P. V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J. Y.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J. F. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 207-215, 2001.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **J. Reprod. Fertil.**, v. 35, 1987, Suppl: 221-8.

ERENO, R. L. Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular. 2008. 65p. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

FARINASSO, A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas. 2004. 60f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2004

FATHALLA, M.; YOUNIS, L.; JAWAD, N. Progesterone concentration and ovascan reading during the estrous cycle in Arabian mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, p. 326-328, 1998.

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

FLEURY, J. J.; PINTA, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, p. 26-38 2001.

FLEURY, J.; FLEURY, P.; DE SOUZA, F. A.; GILLEY, R. Preliminary evaluation of a Bio Release delivery system for the controlled release of Deslorelin (Des) for advancing ovulation in the mare: effects of dose. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, p. 501-2, 2003.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F. et al. Progesterone and behavioral features when estrous is induced in Alpine goats. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 366-373, 2008.

FRASER, H. M.; WULF, C. Angiogenesis in the corpus luteum - Review. **ReprodBiolEndocrinol.**, v. 1, p. 88(8p), 2003. doi: 10.1186/1477-7827-1-88.

FREITAS, V. J. F.; SALLES, M. G. F. Adaptation of eCG (equine chorionic gonadotrophin dose for estrus synchronization of dairy goats raised in Northeast Brazil: preliminary results. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE OF GOATS**, 7, 2000, Tours. Proceedings... Tours: Institut de L'Élevage and INRA, 2000, p. 465-466

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. I.; TORRES, C. A. A. e GINTER, O. J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, p. 989-999, 1998.

GASTAL, E. I.; GASTAL, M. O.; NOGUEIRA, G. P.; BERGFELT, D. R. e GINTER, O. J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentration and follicle desviation in mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 925-930, 2000.

GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G.; GARRET, J. E.; WETTEMANN, R. P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 16, p. 11-25, 1988.

GENÉ, L. A.; PONTES, E. O.; ROSSA, L. A. F.; MADUREIRA, E. H. Extração e Purificação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) do plasma sanguíneo de égua prenhe por cromatografia de afinidade: emprego de resina ConA-Sepharose. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP/15º**, 2007, São Paulo: **SIICUSP**, 2007, v. 1, p. 2822-2822.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mares. 3ª ed. **Equiservice**, p. 378, 1986.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2^a Ed. **Equiservices**: Madison, Wisconsin, p. 642, 1992

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **An. Rep. Sci.**, v. 60-61, p. 61-79, 2000.

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

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. **Domest. Anim. Endocrinol.**, 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. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 99, p. 213-220, 2007b.

GINTHER, O. J. et al. Miniature ponies: 2. **Endocrinology of oestrous cycle. Reproduction, Fertility and Development.**, v. 20, p. 386-390, 2008.

GONZALEZ, G.; CASTRO, B.; MASSALDI, H. Extraction of equine gonadotropin from pregnant mare plasma by adsorption on chromatographic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 1, p. 22-25, 1998.

GONZÁLEZ, F. H. D. Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária. 2002. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad>. Acesso em: 20 nov. 2013.

GOSPODAROWICZ, D.; PAPKOFF, H. A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotrophin. **Endocrinology**, v. 80, p. 699-702, 1967.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, D. H.; EVANS, J. W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, p. 119-152, 1972.

HUSEIN, M. Q.; ABABNEH, M. M. A new strategy for superior reproductive performance of ewes bred out-of-season utilizing progestagen supplement prior to withdrawal of intravaginal pessaries. **Theriogenology**, v.69, p.376-383, 2008.

JONES, L. M.; BOOTT, N. H. & MCDONALD, L. E. (1983). *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ, 4ªed.

HAFEZ, E. S. E. (2004). *Reprodução animal*. 7ªed. Ed. Manole. São Paulo. 509p.

HANDLER, S.; SCHONLIEB, H.; HOPPEN, O.; AURICH, C. Influence of reproductive stage at PRID™ insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 97, p. 382-393, 2007.

IRVINE, D. S.; DOWNEY, B. R.; PARKER, W. G.; SULLIVAN, J. J. Duration of oestrus and time of ovulation in mares treated with synthetic GnRH (AY-24,031). **J. Reprod. Fertil.**; v. 23 Suppl: 279-83, 1975.

KAMADA, A. M.; GAGLIOTTI I. P.; DOMINGOS, C.; JUNIOR, W. R. P. F.; COLA, S.; JARDINI, F. H. M.; BOCCIA, J. P.; CAVALCANTIP, V. Tratamento de folículo anovulatório persistente em égua: relato de caso. **Journal Health Sci. Inst.**, v. 31, p. 109-112, 2013.

KÄHN, W. *Veterinary reproductive ultrasonography*. 2.ed. London, Mosby-Wolfe. 1993, 256 p.

KRIDLI, R. T.; AL-KHETLIB, S. S. Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 75-85, 2006.

KUMARI, N. et al. Gonadotropin bioassays in the context of dual active pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) - Review. **International Journal of Bioassays**, v. 2, n. 2, p. 370-375, 2013.

LEGARDINIER, S.; POIRIER, J. C.; KLETT, D.; COMBARNOUS, Y. Stability and biological activities of heterodimeric and single-chain equine LH/chorionic gonadotropin variants. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 40, p. 185-198, 2008.

LEIGH, S. E. A.; STEWART, F. Partial cDNA sequence for the donkey chorionic gonadotrophin- β subunit suggests evolution from an ancestral LH- β gene. **Journal Molecular Endocrinology**, v. 4, p. 143-150, 1990.

LOSINNO, L. E.; ALVARENGA, M. A. (2006). Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 39-49, 2006.

LUNN, P.; VAGNONI, K. E.; GINTHER, O. J. The equine immune response to endometrial cups. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 34, p. 203-216, 1997.

LOPATE, C.; THERELFALL, W. R. Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the horse mare. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 583-590, 1991.

LOPES, E. P. Desmistificando a transferência de embriões. **Top 2000 Mangalarga Marchador**, v. 1, n. 1, p. 6, 2002.

LEGARDINIER, S.; CAHOREAU, C.; KLETT, D.; COMBARNOUS, Y. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. **Reproduction Nutrition development**, v. 45, p. 255-259, 2005.

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

LOPATE, C.; THERELFALL, W. R. Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the horse mare. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 583-590, 1991.

LUIS, J. H. C.; QUINTERO, A. Z. Función Del cuerpo lúteo y muerte embrionária em rumiantes. **Ciênc. Vet.**, v. 8, p. 1-28, 1998.

LUZ, M. R. Função luteal e luteólise em cadelas: aspectos morfofuncionais. 2004. 153f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2004.

MAIA, K. M. & BEZERRA, A. C. Controle do ciclo estral em caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 14-19, 2010.

MARTINAT-BOTTE, F.; VENTURI, E.; ROYER, E.; ELLEBOUDT, F.; FURSTOSS, V.; RIDREMONT, B.; DRIANCOURT, M. A. Selection of impubertal gilts by ultrasonography optimizes their oestrus, ovulatory and fertility responses following puberty induction by PG600. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 124, p. 132-137, 2011.

MCCUE, P. M. Superovulation. **Vet. Clin. North Amer. Equine Practice**. v. 12, n. 1, p.1-11, 1996.

MCCUE, P.; HUDSON, J. J.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 50, Denver, CO. **Proceedings...** Denver, CO: AAEP, 2004. p. 1492-1507

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C. e GRUBAUGH, W. Comparison of progesterone and progesterone+oestrogen and total and specific uterine proteins in pony mares. **Journal Reproductive Fertility**, v. 35, p. 335-342, 1987.

MCFARLANE, J. R.; CZEKALA, N. M.; PAPKOFF, H. Zebra chorionic gonadotropin: partial purification and characterization. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 5, p. 827-833, 1991.

MCKINNON, A. O. E.; SQUIRES, E. L. Morfologic assesment of the equine embryo. **J. Am. Vet.. Med. Ass.**, v. 192, n. 3, p. 401-406, 1988.

MCKINNON, A. O. Breeding and its technology - now and the future. **World Trotting Conf. Papers**, p.24, 1999. Disponível: <<http://www.harness.org.au/99wldcon/PMCKINN5.HTM>> Acesso em: 20/11/2013.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: SAMPER, J. F.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. (Ed). Current Therapy in equine reproduction. Philadelphia: W. B. Saunders, 2007. Cap. 51, p. 319 – 334.

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

McKINNON, A. O. e VOSS, J. L. Equine Reproduction. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, v. 1 (The mare), p. 639, 1992.

MELO, C. M. et al. Eficiência do acetato de deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. **Vet. e Zootec.**, v. 19, n. 3, p. 392-398, 2012.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M. et al. Day O Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicles improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1111-1117, 2007.

MIES FILHO, A.; ENDLER, J. O.; DUTRA, J. et al. Indução do estro ovulatório em ovelhas com o emprego de estímulos elétricos e/ou hormonais – nota prévia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, p. 229-238, 1989.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2alpha in corpus luteum function. **Rev. Reprod.**, v. 5, p. 1-5, 2000.

MILVAE, R. A.; HINCKLE, Y. S. T.; CARLON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1327-1349, 1996.

MOORE, J. R. W. T.; WARD, D. N. Pregnant mare serum gonadotropin: rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. **The Journal of biological Chemistry**, v. 255, p. 6923, 1980.

MURPHY, D. B.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

MURPHY, D. B. Equine chorionic gonadotrophin: an enigmatic but essential tool. **Anim. Reprod.**, v. 9, p. 223-230, 2012.

NAGY, P.; HUSZENICZA, G. Y.; REICZIGE, J.; JUHÁSZ, J.; KULCSÁR, M.; ABAVARY, K.; GUILLAUME, D. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 61, p. 203–214, 2004.

NISWENDER, G. O.; JUEGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol. Rev.**, v. 80, p. 1-29, 2000.

NOEL, B.; BISTER, J. L.; PIERQUIN, B. et al. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. **Theriogenology**, v. 41, p. 719-727, 1994.

PANZANI, D.; CRISCI, A.; ROTA, A. & CAMILLO, F. Effect of day of transfer and treatment administration on the recipient on pregnancy rates after equine embryo transfer. **Veterinary Research Communication**, v. 33, n. 1, p. 113-116, 2009.

PASHEN, R. L.; LACOMBES, F. A. E.; DARROW, M. D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Vet. Journal**, v. 15, p. 119-121, 1993.

PERKINS, N. R.; THRELFALL, W. R. e OTTOBRE, J. S. Pulsatile secretion of luteinizing hormone and progesterone in mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 11, p. 1929-1934, 1993.

PINNA, A. E.; QUEIROZ, F. J. R.; BURLAMAQUI, F. L. G.; GRECO, G. M.; PINHO, T. G.; BRANDÃO, F. Z. Taxa de gestação e mortalidade embrionária em éguas receptoras de embriões cíclicas e acíclicas tratadas com progesterona de longa duração. **Rev. Univ. Rural**, v. 27, p. 137-139, 2007.

PLOKTA, E. D.; WITHERSPOON, D. M.; GOETSCH, D. D. Peripheral plasma progesterone levels during the estrus cycle of the mare. **Federation Proceedings. Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 30, p. 419, 1971.

PLOKTA, E. D.; WITHERSPOON, D. M.; FOLEY, C. W. Luteal function in the mare as reflected by progesterone concentrations in peripheral blood plasma. **American Journal Veterinary Research**, v. 35, n. 5, p. 917-920, 1972.

RIESENBERG, S.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. Ultrasonic survey of follicular development following superovulation with a single application of pFSH, eCG or hMG in goats. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 83-93, 2001.

RIGOGGLIO, N. N.; FÁTIMA, L. A.; HANASSAKA, J. Y.; PINTO, G. L.; MACHADO, A. S. D.; GIMENES, L. U. et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v. 79, p. 673-679, 2013.

ROMANO, R. M.; FERREIRA, J. C.; CANESIN, H. S.; IGNÁCIO, F. S.; NOVAES FILHO, L. F.; BARROS, A. M. R.; MEIRA, C. Influence of hCG on the vascular perfusion of preovulatory follicle. **Anim. Reprod.**, v. 9, p. 975, 2012.

RIERA, F. L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. (Ed). Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p. 185-199.

ROSER, J. F.; KIEFER, B. L.; EVANS, J. W.; NEELY, D. P; PACHECO, C. A. The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injections in the cyclic mare. **J. Reprod. Fertil.**, v. 27, Suppl: 173-9, 1979.

ROSSA, L. A. F. Purificação da gonadotrofina coriônica equina, do plasma sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de afinidade. 2009. 78f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

RODRIGUES, T. G. Uso de progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação. **Acta Biomedica Brasiliensia**, Vol. 3, n. 1, 2012.

RODRIGUES, T. G.; CAIADO J. R. C.; FAUNDES B.; SILVA J. F. S.; Uso de progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação. 72f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – Uenf, Campos dos Goytacazes, 2009.

ROSSA, L. A. F. Purificação da gonadotrofina coriônica equina, do plasma sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de afinidade. 2009. 78f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 185-194. 2010.

SAMPER, J. C.; JENSEN, S.; SERGENAT, J. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 22, p. 320-3, 2002.

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

SAWALHA, M. N.; KRIDL, R. T.; JAWASREH, K. I.; MEZA-HERRERA, C. A. The use of melatonin and progesterone to initiate reproductive activity in prepuberal Awassi ewe lambs. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 43, p. 1345-1350, 2011.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum functions in cattle: an overview. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 39, p. 241-251, 2005.

SCHAMS, S.; MENZER, C. H.; SCHALLENBERGER, E.; HOFFMAN, B.; HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle, In: Control of Reproduction the Cow. **Commission of the European Communities**, Luxembourg, p. 25-80, 1978.

SHARP, D. C. (2000). The early fetal life on the equine conceptus. **An. Rep. Sci.**, v. 60-61, p. 679-689.

SILVA, L. A. 2003. Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos. **Tese** (Pós-graduação em Medicina Veterinária), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, Brasil, 145p, 2005.

SMITH, M. F.; MCINTOSH, E. V.; SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 1857-1872, 1994

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 10-21, 2009.

SOUZA, M. I. Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 220-225, 2013.

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

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

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current of status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91-104, 1998.

SQUIRES, E. L.; SHIDELER, R. K.; VOSS, J. L.; WEBEL, S. K. Clinical applications of progesterin in mares. **C. C. E. Practicing Vet.**, v. 5, p. 516-522, 1983.

STEWART, F.; THOMPSON, J. A.; LEIGH, S. A.; WARWICK, J. M. Nucleotide (cDNA) sequence encoding the horse gonadotrophin α -subunit. **Journal Endocrinology**, v. 115, p. 341-346, 1987.

STORMSHAK, F. Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum - Review. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 1, p. 92(6p), 2003.

STOUT, T. A. E.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R. Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 315-320, 1999.

STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; EVANS, J. W. Studies on the oestrus cycle of the mare. **Federation Proceedings**, v. 30, p. 419, 1971.

STOUFFER, R. L.; MARTINEZ-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A. Regulation and action of angiogenic factors in the ovary. **Arch. Med. Res.**, v. 32, p. 567-575, 2001.

SUGINO, H.; BOUSFIELD, G. R.; MOORE, W. T.; WARD, D. N. Structural studies on glycoprotein equine hormones. Amino acid sequence of equine lutropin beta-subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8610-8620, 1987.

TAROUCO, K. A. Fisiologia reprodutiva da égua. Estacionalidade Reprodutiva: A estacionalidade dos acasalamentos, na maioria das espécies, PUCRS. campus2. Disponível: <http://www.thompson/FISIOLOGIAREPRODUTIVADAEGUA>. 2012. Acesso: 05/11/2012

TESTA, A. C.; CARMO, M. T.; ALVARENGA, M. A. Perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião em anestro tratadas com progesterona de longa ação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 198, 2005.

TINAJERO, J. J. M.; FLORES, F. I.; OROZCO, L. S.; CASTILLO, C. G. G.; PRIEGO, G. M.; HERNÁNDEZ, G. T. Comportamiento reproductivo de ovejas Barbados Barriga Negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. **Rev. Cient. FCV-LUZ**, v. 17, p. 47-52, 2007.

THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. In: Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. Paris: INRA Editions, 2001. p. 479-504.

TOWNSON, D. H.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologie in mares. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 197-204, 1989.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; OBA, E.; SOUZA, M. I. L. Respuesta endocrina y ovárica a la sincronización del estro y de la ovulación utilizando CIDR y eCG en ovejas. **Vet. Zootec.**, v. 1, p. 9-17, 2007.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; SOUZA, M. I. L.; LOAIZA, A. M. Efecto de la sincronización del estro com prostaglandina-F2 α vs CIDR + 500 UI de eCG em ovejas Bergamacia durante el inicio de la fase luteal. **Revista Científica**, v. XVIII, n. 4, p. 368-373, 2008.

VERONESI, M. C.; BATTOCHIO, M.; FAUSTINI, M.; GANDINI, M.; CAIROLI, F. Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the Thoroughbred mares. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 25, p. 133-40, 2003.

VIDELA DORNA, I.; GONZALEZ, F.; BIANCHI, C.; ABA, M. A. Changes after insertion of intravaginal devices containing two different doses of progesterone in mares. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro, Brazil. **Abstracts**... Porto Seguro: CBRA, 2004

VIRMANI, M.; GUPTA, A. K.; GARG, S. K. Extraction, purification and characterization of equine chorionic gonadotrophin (ECG) from pregnant mare's serum. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1224-1228, 2003.

VIVO, R.; SANTISTEBAN, R.; TOVAR, P.; CASTEJON, M. F. Valores de progesterona en plasma de yeguas españolas y arabes durante el ciclo reproductor. **Archivos de Zootecnia**, Madrid, v. 35, n. 131, p. 59-67, 1986.

XIAO, C. W.; MURPHY, B. D.; SIROIS, J. Downregulation of oxytocininduced COX-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon- γ in bovine endometrial cells. **Biol. Reprod.**, v. 58, suppl.1, p. 325, 1998.

WEBEL, S. K. Estrous control in horses with a progestin. **Journal Animal Science**, v. 41, p. 385, 1975.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALEEN, W. R. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. **Placenta**, v. 22, p. 749-767, 2001.

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

WILDE, O. R.; DE LA VEJA, A. C.; CRUZ, M. L. Uso de un dispositivo intravaginal para el control del estro en yeguas. **Zootec. Trop.**, v. 20, p. 483-492, 2002.