

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

VINICIUS MARETTO

**INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM
ACETATO DE HISTRELINA EM ÉGUAS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Fevereiro de 2020

VINICIUS MARETTO

**INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM
ACETATO DE HISTRELINA EM ÉGUAS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Produção e Reprodução Animal.

ORIENTADORA: Dr^a. CÉLIA RAQUEL QUIRINO

COORIENTADOR: Dr. LUÍS FONSECA MATOS

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Fevereiro de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

M326

Maretto, Vinicius.

Influência do diâmetro folicular na indução da ovulação com acetato de histrelina em éguas da raça Pônei Brasileiro / Vinicius Maretto. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

81 f. : il.

Bibliografia: 27 - 35.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientadora: Celia Raquel Quirino.

Coorientador: Luis Fonseca Matos.

1. ultrassonografia Doppler. 2. mini-horse. 3. acetato de histrelina. 4. vascularização luteal. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

VINICIUS MARETTO

**INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM
ÉGUAS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Produção e Reprodução Animal.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato Travassos Beltrame - UNESC

Dr. José Frederico Stragiotti Silva – UENF

Dr. Luís Fonseca Matos – UENF (Coorientador)

Dra. Célia Raquel Quirino - UENF (Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Jorge Luiz Maretto e Rita de Fátima Moreira Maretto, que foram sempre meus grandes e incondicionais apoiadores. À minha namorada Winny Caldas Moreno Tavares, por todo amor, atenção, incentivo e apoio em todos momentos. Vocês são e sempre serão minha base. A vocês, eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e pelo caminho percorrido até aqui. Que em Sua graça, nunca permitiu que os obstáculos fossem maior que a vontade de vencê-los.

À meus pais, pelo apoio e incentivo empregados a mim durante esta caminhada, que nunca mediram esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos.

À minha namorada Winny, por todo amor, companheirismo, paciência e incentivo destinados a mim. Por dividir comigo momentos tão difíceis enfrentados nessa caminhada, e por toda ajuda prestada durante o desenvolvimento das atividades.

À minha orientadora Célia Raquel Quirino, por me aceitar como seu aluno já no mestrado, por todo incentivo e contribuição para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Luís Fonseca Matos, pela oportunidade e confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos dirigidos a mim durante os últimos quatro anos, essenciais para meu crescimento profissional.

Aos amigos Aylton, Jacymara, Jordana e Nara, por toda contribuição com as atividades desenvolvidas no presente trabalho.

Ao professor Reginaldo Fontes, pela amizade e conselhos a mim direcionados durante este período.

Aos amigos Jefferson Thadeu, Marcos e Natália, pelos conhecimentos compartilhados, além da amizade e apoio.

Aos proprietários Ângelo Sales da Silveira e José Maurício Ferreira, pela confiança depositada em meu trabalho e por disponibilizarem seus animais para realização dos nossos estudos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro” e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu realizar este curso.

RESUMO

A indução da ovulação é frequentemente utilizada na rotina reprodutiva de equinos. Raças eqüinas miniaturas, como o Pônei Brasileiro, apresentam um folículo pré-ovulatório menor que raças de grande porte, não sendo descrito na literatura o diâmetro mínimo indicado para a indução da ovulação nestes animais. Em um primeiro estudo, objetivou-se avaliar a resposta à indução da ovulação em diferentes diâmetros foliculares. Em um segundo estudo, objetivou-se avaliar a influência do diâmetro folicular no momento da indução nas características morfológicas e vasculares do corpo lúteo formado. Para ambos os estudos, foram acompanhados 33 ovulações de 20 éguas da raça Pônei Brasileiro. No primeiro estudo, após a detecção via ultrassonografia de um folículo dominante, os animais foram divididos em três grupos: G25 (indução da ovulação com folículo de 25mm), G30 (indução da ovulação com folículo de 30 mm), G35 (indução da ovulação com folículo de 35mm) e GC (ovulação espontânea). As induções foram realizadas com a aplicação de 0,25mg de acetato de histrelina por via intramuscular. As éguas foram avaliadas por ultrassonografia transretal a cada 6 horas, durante 48 horas. Avaliou-se o diâmetro inicial folicular no momento da indução da ovulação (DI), diâmetro máximo folicular (DM), diâmetro médio folicular, o intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), o intervalo de tempo do surgimento da banda anecóica até a ovulação (TSB-OV), intervalo de tempo do surgimento de alteração do formato folicular até a ovulação (TAF-OV), grau de edema uterino no momento da indução da ovulação, área de vascularização do folículo dominante (AV), taxa de ovulação (TXOV), porcentagem de prenhez (PP) e porcentagem de prenhez por ovulação (PPO). No segundo estudo, foi acompanhado o desenvolvimento dos corpos lúteos até o sétimo dia pós ovulação por ultrassonografia modo-B e modo Power flow diariamente, sendo avaliados o diâmetro, a ecogenicidade e a área de vascularização luteal. Para ambos estudos, foi realizada análise de variância das variáveis testando o efeito de grupo, sendo as médias comparadas através do teste SNK. As taxas de ovulação, porcentagem de prenhez e grau de edema uterino no momento da indução da ovulação foram avaliados através do teste qui-quadrado. O DI apresentou diferença entre os grupos de tratamento ($P < 0,05$), mas não diferiu entre G35 e GC ($34,87 \pm 0,21$ vs $34,74 \pm 0,13$). Foi observada diferença entre todos os grupos (G25, G30, G35 e GC) para DM ($27,71 \pm 1,42$; $31,86 \pm 0,74$; $35,48 \pm 0,54$ e $37,38 \pm 0,46$) e DMd ($26,43 \pm 1,3$; $30,7 \pm 1,13$; $35,56 \pm 0,9$ e $36,51 \pm 0,5$), respectivamente ($P < 0,05$). O GC ($84,0 \pm 21,63$) apresentou diferença no TAI-OV em relação aos demais grupos (G25, $33,0 \pm 10,4$; G30, $36,85 \pm 8,7$ e G35, $35,14 \pm 8,07$) ($P < 0,05$). Não houve diferença ($P > 0,05$) para TSB-OV (G25, $16,5 \pm 10,4$; G30, $19,71 \pm 4,53$; G35, $17,14 \pm 2,26$ e GC, $24,0 \pm 0$) e TAF-OV (G25, $12,0 \pm 4,8$; G30, $10,28 \pm 4,54$; G35, $12,0 \pm 4,9$ e GC, $12,0 \pm 0$). A AV apresentou diferença entre GC ($0,94 \pm 0,43$) e os demais grupos (G25, $0,72 \pm 0,31$; G30, $0,72 \pm 0,4$ e G35, $0,63 \pm 0,4b$) ($P < 0,05$). A TXOV apresentou diferença entre o grupo G25 (40%) e demais grupos G30 (70%), G35 (70%) e GC (100%) ($P < 0,05$). A porcentagem de prenhez apresentou diferença entre G25 (10%) e os demais grupos (G30, 50%; G35, 40% e GC, 66,67%) ($P < 0,05$), bem como porcentagem de prenhez por ovulação (G25, 25%; G30, 71,43%; G35, 57,14% e GC, 66,67%). Foi observada uma alta correlação entre DI e DM (0,97), o grau de edema no momento da indução, TXOV e PP apresentaram correlação média com DI (0,45; 0,3 e 0,42, respectivamente). O diâmetro médio do CL (23,64 mm) apresentou correlação positiva de média magnitude (0,32) com o tamanho folicular do

grupo, a média da ecogenicidade do corpo lúteo foi de 22,73 pixels e a da área de vascularização luteal foi de 2,10 mm². A taxa de prenhez por ovulação foi de 25% para G25, de 71,43% para G30, de 57,14% para G35 e de 66,67% para GC. Foi encontrada forte correlação positiva para o diâmetro folicular e o diâmetro do corpo lúteo; enquanto para diâmetro folicular e ecogenicidade foi encontrado correlação média negativa. Para diâmetro folicular e área de vascularização do corpo lúteo, foi encontrada correlação média. Conclui-se que 1) folículos com diâmetro ≥ 30 mm foram eficientes quando submetidos à indução da ovulação em éguas da raça Pônei Brasileiro, apresentando taxas de ovulação e prenhez satisfatórias e; 2) o diâmetro folicular no momento da indução da ovulação influencia significativamente os parâmetros morfofuncionais do CL de éguas da raça Pônei Brasileiro.

Palavras-chave: ultrassonografia Doppler, mini-horse, acetato de histrelina, vascularização luteal.

ABSTRACT

Induction of ovulation is often used in the reproductive routine of horses. Miniature equine breeds, such as the Pônei Brasileiro, have a smaller preovulatory follicle than large breeds, and the minimum diameter indicated for inducing ovulation in these animals is not described in the literature. In a first study, the objective was to evaluate the response to ovulation induction in different follicular diameters. In a second study, the objective was to evaluate the influence of the follicular diameter at the time of induction on the morphological and vascular characteristics of the formed corpus luteum. For both studies, 33 ovulations of 20 mares of the Pônei Brasileiro breed were followed. In the first study, after ultrasound detection of a dominant follicle, the animals were divided into three groups: G25 (ovulation induction with a 25 mm follicle), G30 (ovulation induction with a 30 mm follicle), G35 (ovulation induction with 35mm follicle) and GC (spontaneous ovulation). The inductions were performed with the application of 0.25 mg of histrelin acetate intramuscularly. Mares were evaluated by transrectal ultrasound every 6 hours for 48 hours. The initial follicular diameter at the time of ovulation induction (DI), maximum follicular diameter (DM), average follicular diameter, the time interval from application of the inducer to ovulation (TAI-OV), the time interval of appearance of the anechoic band until ovulation (TSB-OV), time interval from the appearance of changes in the follicular shape to ovulation (TAF-OV), degree of uterine edema at the time of ovulation induction, the area of vascularization of the dominant follicle (AV), ovulation rate (TXOV), pregnancy percentage (PP) and percentage of pregnancy by ovulation (PPO). In the second study, the development of the corpus luteum was monitored until the seventh day after ovulation using B-mode ultrasonography and Power flow mode daily, being evaluated the diameter, echogenicity and area of luteal vascularization. For both studies, analysis of variance of the variables was performed, testing the group effect, with the means being compared using the SNK test. Ovulation rates, percentage of pregnancy and degree of uterine edema at the time of ovulation induction were assessed using the chi-square test. The DI showed a difference between the treatment groups ($P < 0.05$), but it did not differ between G35 and CG ($34,87 \pm 0,21$ vs $34,74 \pm 0,13$). A difference was observed between all groups (G25, G30, G35 and GC) for DM ($27,71 \pm 1,42$; $31,86 \pm 0,74$; $35,48 \pm 0,54$ and $37,38 \pm 0,46$) and DMd ($26,43 \pm 1,3$; $30,7 \pm 1,13$; $35,56 \pm 0,9$ and $36,51 \pm 0,5$), respectively ($P < 0.05$). The CG ($84,0 \pm 21,63$) showed a difference in the TAI-OV in relation to the other groups (G25, $33,0 \pm 10,4$; G30, $36,85 \pm 8,7$ and G35, $35,14 \pm 8,07$) ($P < 0.05$). There was no difference ($P > 0.05$) for TSB-OV (G25, $16,5 \pm 10,4$; G30, $19,71 \pm 4,53$; G35, $17,14 \pm 2,26$ and GC, $24,0 \pm 0$) and TAF-OV (G25, $12,0 \pm 4,8$; G30, $10,28 \pm 4,54$; G35, $12,0 \pm 4,9$ and GC, $12,0 \pm 0$). The VA showed a difference between CG ($0,94 \pm 0,43$) and the other groups (G25, $0,72 \pm 0,31$; G30, $0,72 \pm 0,4$ and G35, $0,63 \pm 0,4$) ($P < 0.05$). TXOV showed a difference between the G25 group (40%) and the other G30 groups (70%), G35 (70%) and CG (100%) ($P < 0.05$). The percentage of pregnancy showed a difference between G25 (10%) and the other groups (G30, 50%; G35, 40% and CG, 66.67%) ($P < 0.05$), as well as percentage of pregnancy by ovulation (G25, 25%; G30, 71.43%; G35, 57.14% and CG, 66.67%). A high correlation was observed between DI and DM (0.97), the degree of edema at the time of induction, TXOV and PP showed a medium correlation with DI (0.45; 0.3 and 0.42, respectively). The mean diameter of the CL (23.64 mm) showed a positive correlation of medium magnitude (0.32) with the follicular size of the group, the mean

echogenicity of the corpus luteum was 22,73 pixels and that of the area of luteal vascularization was 2,10 mm². The pregnancy rate by ovulation was 25% for G25, 71,43% for G30, 57,14% for G35 and 66,67% for CG. A strong positive correlation was found for follicular diameter and corpus luteum diameter; while for follicular diameter and echogenicity, a negative mean correlation was found. For follicular diameter and vascular area of the corpus luteum, a medium correlation was found. It is concluded that 1) follicles with diameter ≥ 30 mm were efficient when subjected to ovulation induction in Brazilian Pony mares, presenting satisfactory ovulation and pregnancy rates and; 2) the follicular diameter at the moment of ovulation induction significantly influences the morphofunctional parameters of the CL of Brazilian Pony mares.

Keywords: Doppler ultrasound, mini-horse, histrelin acetate, luteal vascularization.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Fig.1, Artigo 1. A- imagem ultrassonográfica modo Power Flow de folículo dominante de égua da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida. B- imagem da vascularização de folículo dominante de égua da raça Pônei Brasileiro processada no software ImageJ® para mensuração da área de vascularização. 43
Figura 2	Fig.2, Artigo 1. Média do diâmetro folicular de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida 48, 42, 36, 30, 24, 18, 12 e 6 horas antes da constatação da ovulação, onde: G25= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 25mm de diâmetro; G30= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 30mm de diâmetro; G35= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 35mm de diâmetro; GC= grupo controle, éguas que tiveram sua ovulação acompanhada naturalmente, sem indução. 47
Figura 3	Fig.3, Artigo 1. Média da área da vascularização folicular de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida 48, 42, 36, 30, 24, 18, 12 e 6 horas antes da constatação da ovulação, onde: G25= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 25mm de diâmetro; G30= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 30mm de diâmetro; G35= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 35mm de diâmetro; GC= grupo controle, éguas que tiveram sua ovulação acompanhada naturalmente, sem indução. 48
Figura 4	Fig.1, Artigo 2. A- imagem ultrassonográfica modo Power flow de CL de égua da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida. B- imagem da vascularização luteal de égua da raça Pônei Brasileiro processada no software ImageJ para mensuração da área de vascularização. 70

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Tab. 1, Artigo 1. Média e respectivo desvio padrão para diâmetro inicial folicular no momento da indução da ovulação (DI), diâmetro máximo folicular (DM), diâmetro médio folicular (DMd), intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV) e intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação (TAF-OV) para os grupos G25, G30, G35 e controle de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida em diferentes diâmetros foliculares..	45
Tabela 2 Tab. 2, Artigo 1. Média e respectivo desvio padrão para área de vascularização do folículo dominante (AV), grau de edema uterino no momento da indução da ovulação (ED), taxa de ovulação (TXOV), porcentagem de prenhez (PP) e porcentagem de prenhez por ovulação (PPO) para os grupos G25, G30, G35 e controle de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida em diferentes diâmetros foliculares.	46
Tabela 3 Tab. 3, Artigo 1. Correlação entre diâmetro folicular inicial (DI) e diâmetro máximo folicular (DM), intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV), intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação (TAF-OV), grau de edema uterino no momento da indução da ovulação (ED), taxa de ovulação (TXOV) e porcentual de prenhez por grupo (PP) de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida em diferentes diâmetros foliculares.	48
Tabela 4 Tab. 1, Artigo 2. Média e desvio padrão de diâmetro médio do corpo lúteo (DM), ecogenicidade do corpo lúteo (ECO) e área de vascularização luteal (AV) de éguas da raça Pônei Brasileiro submetidas à indução de ovulação com diferentes diâmetro foliculares.	72
Tabela 5 Tab. 2, Artigo 2. Correlação entre o os grupos de tratamento com as variáveis diâmetro médio do corpo lúteo (DM), ecogenicidade do corpo lúteo (ECO) e área de vascularização luteal (AV) de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida com diferentes diâmetros foliculares.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AV	Área de vascularização do folículo dominante
CL	Corpo lúteo
DI	Diâmetro inicial folicular no momento da indução da ovulação
DM	Diâmetro máximo folicular
DMd	Diâmetro médio folicular
E2	Estrógeno
ECO	Ecogenicidade do corpo lúteo
ED	Grau de edema uterino no momento da indução da ovulação
EDV	Velocidade de pico diastólico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistividade
LH	Hormônio luteinizante
P4	Progesterona
PGF2α	Prostaglandina F2 α

PP	Porcentagem de prenhez
PPO	Porcentagem de prenhez por ovulação
PSV	Velocidade de pico sistólico
TAF-OV	Intervalo de tempo do surgimento da alteração de formato do folículo dominante até a ovulação
TAI-OV	Intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação
TSB-OV	Intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação
TXOV	Taxa de ovulação
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas.....	10
Lista de abreviações.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
<u>CAPÍTULO 1</u>	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Ciclo estral em éguas.....	18
3.2 Indução da ovulação.....	20
3.3 Ultrassonografia.....	21
3.4 Avaliação folicular e luteal através da ultrassonografia em equinos.....	24
3.5 Referências.....	27
<u>CAPÍTULO 2</u>	36
Indução da ovulação com acetato de histrelina em éguas da raça Pônei Brasileiro com diferentes diâmetros foliculares.....	37
<u>CAPÍTULO 3</u>	62
Formação e perfusão vascular do corpo lúteo de éguas da raça Pônei Brasileiro submetidas à indução da ovulação com acetato de histrelina ...	63
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A criação e comercialização de equinos merece papel de destaque no cenário do agronegócio, movimentando milhões de reais ao ano. O crescimento da equideocultura, principalmente aos animais destinados à prática da equitação, reforça a importância do sucesso reprodutivo desta espécie (MARIZ, 2009). No Brasil, a criação de animais como os mini Pôneis, principalmente os pôneis da Raça Brasileira, tem sido popularizada, com boa aceitação do mercado, sendo destinados, principalmente, para a equitação com crianças e equoterapia (RUA *et al.*, 2017).

Diversas diferenças reprodutivas foram relatadas em pôneis quando comparados à raças de grande porte. Éguas miniaturas apresentam um intervalo interovulatório maior, menor número de folículos por onda ovulatória (GASTAL *et al.*, 2008; GINTHER *et al.*, 2008; CLAES *et al.*, 2017), menor número de ovulações duplas (CLAES *et al.*, 2017), menor taxa de crescimento folicular e menor diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório (BERGFELT; GINTHER, 1996; GASTAL *et al.*, 2008).

Apesar do conhecimento dos aspectos reprodutivos relacionados à ovulação em éguas de grande porte, tanto em ovulações naturais como induzidas, pouco se sabe sobre esses aspectos em raças miniaturas (GASTAL *et al.*, 2008). Apesar da representatividade econômica da raça Pônei Brasileiro no mercado equestre nacional, são escassos os dados encontrados referentes à indução de ovulação nestes animais, necessitando, desta forma, estudos relacionados à esta técnica, levando em consideração as particularidades desta raça.

A indução de ovulação é uma técnica amplamente utilizada na reprodução equina para que melhores índices reprodutivos sejam atingidos (GRECO, 2016). Éguas apresentam uma fisiologia reprodutiva singular, com grande variação na duração do estro e no intervalo entre o seu início e a ovulação (GINTHER *et al.*, 1972), o que dificulta o emprego de biotécnicas reprodutivas. Para driblar tal obstáculo, existem relatos da utilização de agentes indutores da ovulação há aproximadamente cinco décadas (LOY; HUGHES, 1966), sendo que esta técnica vem sendo utilizada com frequência até os dias atuais (LINDHOLM *et al.*, 2011; VOGÉ *et al.*, 2012; KISER *et al.*, 2013; CANUTO *et al.*, 2018). O uso destes fármacos permite que a grande

maioria das éguas ovule de forma sincronizada, dentro de um período pré-determinado (LINDHOLM *et al.*, 2011).

Algumas alterações morfológicas da parede do folículo pré-ovulatório podem auxiliar na determinação do momento da ovulação, como a perda do formato esférico do folículo, associado à diminuição do edema uterino, aumento da ecogenicidade da granulosa e o aumento da espessura das camadas da teca. Além disso, a vascularização da parede do folículo pré-ovulatório é máxima 24 horas antes da ovulação, sendo que uma diminuição abrupta da perfusão sanguínea folicular ocorre nas quatro últimas horas que antecedem a ovulação (GASTAL *et al.*, 2008).

O conhecimento do desenvolvimento folicular e das mudanças estruturais que ocorrem no folículo pré-ovulatório, assim como a compreensão das alterações vasculares que ocorrem com o mesmo ressaltam, respectivamente, a importância da utilização da ultrassonografia convencional e Doppler nos programas de reprodução equina (GINTHER, 2007; FERREIRA; MEIRA, 2011; GASTAL; GASTAL, 2012). Por serem técnicas não invasivas, podem ser utilizadas repetidamente, sem gerar danos à saúde dos animais submetidos ao tratamento (CARVALHO *et al.*, 2008).

Além disso, a ultrassonografia Doppler pode ser usada com sucesso para avaliar a perfusão vascular do corpo lúteo, sendo um preditor de alta confiabilidade de sua capacidade funcional (GINTHER *et al.*, 2007; BROGAN *et al.*, 2016), uma vez que a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do CL equino estão intimamente correlacionadas (GINTHER, 2008; CASTRO *et al.*, 2016).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a indução da ovulação em éguas da raça Pônei Brasileiro com acetato de histrelina, pressupondo-se diferentes diâmetros foliculares no momento da indução.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

1. Avaliar a influência do diâmetro do folículo dominante na resposta à indução da ovulação com acetato de histrelina em éguas da raça Pônei Brasileiro.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a hemodinâmica e a resposta ovulatória de folículos dominantes de éguas pônei com ovulação induzida;
2. Determinar o intervalo da indução à ovulação e as mudanças morfológicas e vasculares dos folículos pré-ovulatórios;
3. Avaliar a formação e funcionalidade do corpo lúteo através da ultrassonografia Doppler após a indução da ovulação.

CAPÍTULO 1.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ciclo estral em éguas

Os equinos são animais considerados monovulatórios poliéstricos sazonais. A estação reprodutiva ocorre do início da primavera até o final do verão, sendo a atividade reprodutiva estimulada principalmente pelo aumento do comprimento do dia. Além do fotoperíodo, fatores como nutrição, condição corporal e temperatura ambiental têm efeito sobre a atividade reprodutiva sazonal. Portanto, algumas éguas podem apresentar ciclo fértil durante todo o ano, tornando-se poliéstricas anuais, caso encontre condições favoráveis para isto (HAFEZ; HAFEZ, 2004; SAMPER, 2008; DAVID, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

O ciclo estral é definido como o período de uma ovulação até a ovulação subsequente. Em éguas, este ciclo é composto de uma fase folicular, ou estro, e uma fase luteínica, ou diestro. O intervalo entre duas ovulações consecutivas é de 18 a 22 dias, considerando 21 dias como a média. O estro geralmente possui duração de 6 dias, enquanto o diestro normalmente dura 15 dias, podendo variar entre 12 a 18 dias. Essas fases são caracterizadas por modificações internas dos órgãos sexuais e do sistema glandular, assim como alterações comportamentais baseadas nos níveis de estrógeno (E2) e progesterona (P4) (SAMPER, 2008; FERREIRA, 2009; CLAES *et al.*, 2017).

O crescimento folicular durante o ciclo estral depende da concentração circulante do hormônio folículo estimulante (FSH), enquanto a seleção e subsequente dominância folicular estão associadas com a diminuição do FSH e aumento do hormônio luteinizante (LH). Em éguas, ao contrário da maioria das espécies domésticas em que a ovulação ocorre 24 a 40 horas após um pico ovulatório de LH, a ovulação é observada quando os níveis de LH ainda estão aumentando. Portanto, o pico de LH ocorre ao redor de 48 horas após a ovulação (GINTHER *et al.*, 2008; GINTHER, 2019).

Os folículos se desenvolvem na espécie equina em forma de ondas de crescimento (BASHIR *et al.*, 2016). As ondas foliculares podem ser divididas em ondas maiores e menores (GINTHER, 1992; GINTHER, 2019). As ondas maiores são caracterizadas por folículos dominantes, enquanto as ondas menores não possuem

folículos que alcançam a fase de dominância (GINTHER, 2000). As ondas maiores foram divididas em ondas primárias, cujo folículo dominante se desenvolve e ovula durante o estro; e ondas secundárias, onde um folículo se torna dominante durante o diestro e não ovula. Em pôneis, geralmente desenvolve-se somente uma onda maior já no final do diestro, ocorrendo a ovulação durante o estro subsequente (GINTHER, 2000; GASTAL *et al.*, 2008; CLAES *et al.*, 2017).

O indicador mais usado para estimar a ovulação em éguas é o maior diâmetro de um folículo pré-ovulatório, podendo variar de acordo com o porte, raça e localidade do animal (GINTHER, 1995). Em éguas miniatura, o maior diâmetro médio foi de $37,3 \pm 0,7$ mm (GASTAL *et al.*, 2008).

Na égua, apenas um folículo dominante por onda ovulatória desenvolve-se, a partir do processo de divergência (GASTAL, 2009; BASHIR *et al.*, 2016), que ocorre em folículos ≥ 25 mm em raças de grande porte (ACOSTA *et al.*, 2004) e 19 mm em éguas miniaturas (GASTAL *et al.*, 2008). A incidência de ovulações múltiplas varia consideravelmente entre raças. Em pôneis, a incidência de duplas ovulações é ausente ou muito baixa (GASTAL *et al.*, 2008; GINTHER *et al.*, 2008; CLAES *et al.*, 2017).

O corpo lúteo é responsável pela secreção de P4 (BERGFELT; ADAMS, 2007), sendo que a concentração máxima de P4 é atingida por volta do sexto dia do ciclo (BLANCHARD *et al.*, 2003; CLAES *et al.*, 2017). Quando não há concepção, a duração do corpo lúteo depende da produção e liberação, pelo endométrio, de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) entre os dias 13 e 16 pós ovulação, independentemente da raça (GASTAL *et al.*, 2008; GINTHER *et al.*, 2008).

Em éguas, durante a fase de estro, ocorre o desenvolvimento de um edema endometrial. O aumento do edema das dobras endometriais durante o estro é indicativo da elevação de estradiol circulante e presença de um folículo ≥ 25 mm, resultando em uma mudança na avaliação do escore endometrial (GINTHER; PIERSON, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 2019). O primeiro aumento do escore da ecotextura está associado com o início da luteólise e regressão final do CL, baseado na queda das concentrações plasmáticas de P4, e o pico do edema endometrial ocorre junto com o aumento de estradiol (GASTAL *et al.*, 2008). Após isto, o índice de edema

atinge um platô, e regride dois dias antes da ovulação em éguas (GINTHER; PIERSON, 1984) e quatro dias antes em pôneis (GASTAL *et al.*, 2008). Após a ovulação, o edema uterino não deve persistir por mais de 36 horas, em uma situação fisiológica (SAMPER *et al.*, 2007).

Ao exame ultrassonográfico em Modo-B, em um corte transversal do corno uterino, o edema endometrial apresenta-se claramente em forma de estrela (roda de automóvel), com partes alternadamente anecoicas até hipoeoicas de baixa intensidade, representando a secreção endometrial e tabiques ecogênicos que correspondem às pregas endometriais (ANDRADE MOURA; MERKT, 1996).

3.2 Indução da ovulação

A indução de ovulação é a segunda intervenção mais comumente realizada no manejo reprodutivo de equinos, ficando atrás apenas da inseminação artificial (SAMPER, 2008; CANUTO *et al.*, 2018; OBERHAUS *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019). Fisiologicamente, as éguas apresentam um tempo muito variável na duração do estro e no intervalo até a ovulação. Por esse motivo, a utilização de indutores de ovulação vem se tornando cada vez mais frequente (BEREZOWSKY *et al.*, 2004; SAMPER, 2008; PIETRANI *et al.*, 2019). A ovulação programada facilita o manejo reprodutivo, principalmente quando se utiliza sêmen congelado ou de baixa fertilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

Na espécie equina, a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e os análogos sintéticos do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) são os indutores de ovulação mais utilizados (GINTHER, 1990; KISER *et al.*, 2013; CANUTO *et al.*, 2018; OLIVEIRA NETO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

O hCG é um hormônio proteico que possui a capacidade de se ligar aos receptores do LH (GINTHER *et al.*, 2009). Os folículos passam a ser responsivos ao hCG quando atingem diâmetro igual ou superior a 35 mm em raças grandes e 33 mm em pôneis (WEBEL *et al.*, 1977). A administração de hCG pode ser realizada por via intravenosa ou intramuscular (BERGFELT, 2000). Apesar de sua eficácia como indutor da ovulação, quando aplicado repetidamente, o hCG estimula a formação de anticorpos, o que reduz sua eficácia em tratamentos subsequentes (GINTHER *et al.*, 2009; CANUTO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Os análogos do GnRH induzem a ovulação, geralmente, em até dois dias após sua aplicação (KISER *et al.*, 2013). O GnRH natural (gonadorrelina) e os seus análogos induzem e sincronizam a ovulação ao estimularem a liberação de LH endógeno (BARRIER-BATUT *et al.*, 2001; OLIVEIRA NETO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019). Devido a sua curta meia-vida e potência, o uso da gonadorrelina não se traduziu em resultados interessantes na espécie equina, sendo necessárias aplicações repetidas de GnRH por dois a três dias, duas a três vezes ao dia, para induzir e sincronizar a ovulação (SAMPER, 2008).

Aproximadamente 2000 análogos de GnRH já foram sintetizados, com potência e eficácia variáveis. A deslorelina, um dos análogos do GnRH mais utilizados, possui uma potência 100 vezes maior que o GnRH (PADULA, 2005). O tratamento com formulações injetáveis de acetato de deslorelina estimulam uma rápida elevação nas concentrações plasmáticas de LH, um pico plasmático com sete a oito horas após a administração (BOAKARI, 2014).

Da mesma forma que o hCG, o acetato de deslorelina foi empregado de forma satisfatória como indutor de ovulação (SQUIRES *et al.*, 2003).

A histrelina é um análogo sintético do GnRH, aproximadamente 50% mais potente que a deslorelina. Possui capacidade de induzir e sincronizar ovulações em equinos nas doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg por via intramuscular (IM) (VOGE *et al.*, 2012; KISER *et al.*, 2013), da mesma forma que a deslorelina e o hCG (VOGE *et al.*, 2012). Estudos desenvolvidos comparando dosagens de 0,5 e 0,25 mg de histrelina observaram não haver diferença significativa para indução da ovulação em um período de 48 horas (LINDHOLM *et al.*, 2011; VOGÉ *et al.*, 2012; KISER *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Devido sua maior potência, a histrelina tem a capacidade de induzir a ovulação com eficiência mesmo no início da estação de monta, quando as concentrações plasmáticas de LH são sabidamente menores (GASTAL *et al.*, 2007).

3.3 Ultrassonografia

Após o primeiro uso na medicina veterinária para a avaliação de órgãos reprodutivos de éguas (PALMER; DRIANCOURT, 1980), a ultrassonografia (US) tem

sido uma ferramenta indispensável nos diagnósticos terapêuticos e nas pesquisas de animais de grande e pequeno porte (GOLDSTEIN, 2006; GINTHER, 2014).

Trata-se de um exame não-invasivo ou minimamente invasivo, não apresenta efeitos nocivos, apresenta resultados em tempo real e é um exame relativamente simples de ser realizado. A US transretal modo-B tem revolucionado o diagnóstico e a monitorização de eventos reprodutivos, não sendo usado somente para identificar e medir estruturas, mas também para ser associado a eventos reprodutivos (GINTHER, 1995).

A utilização da US em modo-B é uma ferramenta muito útil para se determinar em qual fase do ciclo estral a égua se encontra. A avaliação da ecotextura uterina é um dos sinais mais utilizados e mais facilmente visualizados para avaliação do ciclo reprodutivo nas éguas (GINTHER, 2014). O útero durante o período de estro sofre ação de estrogênio e, conseqüentemente, desenvolvimento das glândulas endometriais. Nesta fase, é possível observar presença de edema uterino através da ultrassonografia, no qual se apresenta de maneira semelhante a uma roda de carroça (MOREL, 2003; GINTHER, 2014). Durante o período de diestro, em virtude dos altos níveis de P4 produzidos pelo corpo lúteo, o útero apresenta-se com uma forma arredondada a ovalada, homogênea e em tons de cinza de intensidade intermediária (SAMPER, 2007).

A observação dos folículos perante à ultrassonografia é possível pela visualização de uma estrutura arredondada a ovalada (podendo variar de forma dependendo do seu grau de desenvolvimento), anecóico devido a presença de líquido folicular em seu antro. O corpo lúteo apresenta-se como uma estrutura arredondada, de ecogenicidade semelhante ao estroma ovariano (BERGFELT; ADAMS, 2007), sendo que esta ecogenicidade pode variar de acordo com a fase do diestro em que a égua se encontra (GINTHER; UTT, 2004).

A US Doppler associada à US convencional é um método relativamente recente na medicina veterinária. Ela fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos. O Doppler possibilita determinar a presença, a direção e o tipo de fluxo sanguíneo (CARVALHO

et al., 2008), sendo utilizado em várias áreas da medicina, como na cardiologia, neurologia e ginecologia (GHORI; KELVIN, 2007).

O princípio da US Doppler baseia-se na movimentação das células sanguíneas em relação ao transdutor, de forma que as alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representadas por imagens com cores e tonalidades específicas (GINTHER, 2007; GINTHER, 2014).

Nos animais de grande porte, a utilização da US Doppler é indicada pela via transretal, sendo utilizada para avaliação do sistema reprodutivo (FERREIRA *et al.*, 2011). Essa tecnologia é efetiva e útil para a avaliação *in vivo*, possibilitando uma acurácia no diagnóstico de patologias, monitoração dos eventos reprodutivos e no estudo da capilaridade das estruturas, assim como dos órgãos do sistema reprodutor (GINTHER; UTT, 2004; BAILEY *et al.*, 2012; GINTHER, 2014; ISHAK *et al.*, 2017), podendo prever condições futuras dos eventos reprodutivos (GINTHER, 2007).

A US Doppler apresenta dois modos de ação distintos: modo Espectral ou Pulsado e modo Color flow/Power flow (GINTHER; UTT, 2004). No modo espectral a variação de velocidade do fluxo sanguíneo é representada por um gráfico em forma de onda, onde podem ser observados os indicadores de perfusão tecidual pico sistólico (PSV), pico diastólico (EDV) e fluxo de maior velocidade (TAMV). A razão das três velocidades medidas, PSV, EDV e TAMV, são utilizadas para se chegar ao índice de resistividade e pulsatilidade (IR e IP).

No modo Color-flow, a velocidade do fluxo sanguíneo pode ser visualizada pela intensidade dos *pixels* (pontos) coloridos, a partir do escuro para o claro, sendo que a cor escura indica baixa velocidade e a clara alta velocidade. A direção do fluxo sanguíneo em direção à sonda é quem determina a coloração (GINTHER; UTT, 2004). No modo Power flow observa-se apenas uma cor, no qual podem ser detectados vasos pequenos e/ou com fluxo muito lento, sendo adequado para medir variações precoces no fluxo sanguíneo e vasos com fluxo de baixa intensidade (GINTHER, 2007; NIETO-OLMEDO *et al.*, 2020). É importante ressaltar que a vascularização é graduada pela intensidade, quantidade e tamanho dos pixels coloridos (GINTHER, 2007).

A US Doppler já foi utilizada para a detecção das alterações do fluxo sanguíneo durante o ciclo estral (CANESIN, 2013), gestação (BOLLWEIN *et al.*, 2003), em éguas receptoras cíclicas (IGNÁCIO, 2013), para detecção de mudanças vasculares associadas com o desvio folicular (ACOSTA *et al.*, 2004), com o folículo pré-ovulatório (GASTAL *et al.*, 2007), placentite (BAILEY *et al.*, 2012), entre outros.

A US Doppler colorido começou a ser usada para avaliar a vascularização da parede folicular em éguas em 2004 (GASTAL; GASTAL, 2012). Os primeiros estudos com recurso à US Doppler baseavam-se em informações obtidas nas grandes artérias, responsáveis pela vascularização sanguínea do trato reprodutor da fêmea. Contudo, estudos mais recentes têm demonstrado a utilidade do exame US Doppler diretamente na estrutura alvo, como por exemplo, o endométrio, a parede folicular ou o corpo lúteo, e em vasos menores (SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008; GINTHER *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2011; ISHAK *et al.*, 2017; HASSAN *et al.*, 2019).

Atualmente, a US Doppler é um dos métodos mais confiáveis para avaliar o fluxo sanguíneo do CL durante o diestro (HASSAN *et al.*, 2019) e também após a administração de tratamentos hormonais (CASTRO *et al.*, 2016), o que permite um conhecimento mais profundo da fisiopatologia reprodutiva de uma égua (CAMPOS, 2017).

3.4 Avaliação folicular e luteal através da ultrassonografia em equinos

Após o processo de seleção, os folículos equinos crescem a uma taxa de 2,5 a 3,0mm ao dia, sendo que, após a indução até a ovulação, essa taxa de crescimento apresenta uma queda importante (GASTAL *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Paralelamente à redução do crescimento, ocorre a diminuição da tensão da parede do folículo, o que gera uma alteração no formato, perdendo sua forma esférica e se tornando irregular (MCKINNON *et al.*, 1988). Estas mudanças conformacionais estão associadas ao processo de migração do folículo para a fossa de ovulação (ULIANI, 2012).

A ovulação pode ser considerada um processo inflamatório, que gera uma dilatação considerável de capilares na teca em éguas (KERBAN *et al.*, 1999). A formação de uma banda anecóica na área entre as camadas da teca aumentou

diariamente e progressivamente no período de três a um dia antes da ovulação, atingindo 100% da circunferência folicular no período pré-ovulatório (GASTAL *et al.*, 2006).

A camada de células da granulosa apresenta um aumento no número de células e preenchimento dos espaços intracelulares por uma substância mucoide cerca de 24 horas antes da ovulação. Devido a isto, é observado no período pré-ovulatório um espessamento da camada da granulosa e um aumento contínuo de sua ecogenicidade com a aproximação do momento da ovulação (SAMPER *et al.*, 2007).

O edema endometrial surge no início da fase estrogênica do ciclo e aumenta progressivamente durante os primeiros dias do estro. Porém, quando se atinge o período de 48 - 24 horas que antecedem a ovulação, tem-se uma redução dos níveis do edema endometrial (SAMPER *et al.*, 2007).

Usualmente, o acompanhamento do desenvolvimento folicular em éguas é feito por meio da US convencional (GASTAL *et al.*, 1998). A US Doppler oferece uma alternativa para a avaliação do desenvolvimento e potencial ovulatório de folículos dominantes, identificando mudanças na hemodinâmica ovariana durante o desenvolvimento folicular (GINTHER, 2007; FERREIRA; MEIRA, 2011; GINTHER, 2014).

Durante o desenvolvimento folicular, um aumento progressivo da vascularização a partir da divergência folicular ocorre apenas em futuros folículos ovulatórios, enquanto que os folículos anovulatórios possuem baixa vascularização (GASTAL *et al.*, 1999; ACOSTA *et al.*, 2004). A avaliação pela US Doppler do fluxo sanguíneo folicular tem sido usada como método eficaz para prever a viabilidade folicular, já que identifica mudanças no padrão de vascularização do futuro folículo dominante antes mesmo do desvio folicular (ACOSTA *et al.*, 2004; GASTAL *et al.*, 2006; GINTHER, 2007; GINTHER, 2014).

Em equinos, uma maior vascularização do folículo pré-ovulatório está associado a um maior diâmetro folicular, a maiores taxas de maturação do oócito e maior qualidade dos mesmos (GASTAL; GASTAL, 2012), aumentando os índices de prenhez em éguas que apresentam maior grau de vascularização folicular (SILVA *et al.*, 2006; GINTHER, 2014). A vascularização folicular em éguas é máxima 24 horas

antes da ovulação, e uma diminuição abrupta da perfusão sanguínea folicular ocorre durante as quatro últimas horas que antecedem a ovulação (GASTAL *et al.*, 2006; GINTHER, 2007; GINTHER, 2014), tornando a ultrassonografia Doppler, desta forma, uma ferramenta importante para a determinação da proximidade da ovulação (ACOSTA *et al.*, 2004).

Após a ovulação, o novo corpo lúteo (CL) se desenvolve rapidamente a partir da ruptura da parede do folículo. O CL é responsável pela secreção de progesterona, sendo que os níveis séricos da mesma são correlacionados com sua vascularização (GINTHER *et al.*, 2007; GINTHER, 2014; CASTRO, 2017; GINTHER, 2019).

Após o esvaziamento folicular, a perfusão sanguínea do CL aumenta progressivamente até envolver praticamente toda sua circunferência no sexto dia pós-ovulação. Durante este período, a progesterona também aumenta progressivamente. Entre o 8º e o 14º dia do ciclo estral, o perfil sérico de P4 e perfusão vascular luteal apresentam valores máximos. Já durante a luteólise, o fluxo sanguíneo do CL diminui, fenômeno acompanhado pela diminuição na concentração de P4 (GINTHER, 2014; ISHAK *et al.*, 2017; GINTHER, 2019).

3.5 Referências

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

ANDRADE MOURA, J.C.; MERKT, H.A. **Ultrassonografia na Reprodução Equina**. 2.ed, Salvador, 1996. 161p.

BAILEY, C.S.; HEITZMAN, J.M.; BUCHANAN, C.N.; BARE, C.A.; SPER, R.B.; BORST, L.B.; MACPHERSON, M.; ARCHIBALD, K.; WHITACRE, M. B-mode and Doppler ultrasonography in pony mares with experimentally induced ascending placentitis. **Equine Veterinary Journal**, v.44, Supl.43, p.88-94, 2012.

BARRIER-BATTUT, I.; LE POUTRE, N.; TROCHERIE, E.; HECHT, S.; GRANDCHAMP DES RAUX, A.; NICAISE, J.L.; VÉRIN, X.; BERTRAND, J.; FIÉNI, F.; HOIER, R.; RENAULT, A.; EGRON, L.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J.F. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. **Theriogenology**, v.55, p.1679-1695, 2001.

BASHIR, S.T.; ISHAK, G.M.; GASTAL, M.O.; ROSER, J.F.; GASTAL, E.L. Changes in intrafollicular concentrations of free IGF-1, activin A, inhibin A, VEGF, estradiol, and prolactin before ovulation in mares. **Theriogenology**, v.85, p.1491-1498, 2016.

BLANCHARD, T.L.; DICKSON, D.V.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction**. St. Louis: Mosby, p. 11, 2003.

BEREZOWSKY, C.J.; STITICK, K.C.; WENDT, D.J. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.6, p.231-233, 2004.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.16, p.66-72, 1996.

BERGFELT, D.R. Estrous synchronization mare. In: **Equine breeding management an artificial insemination**. 2.ed Philadelphia, p.195-228, 2000.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Current Therapy in Equine Reproduction. **Saunders Elsevier**, p.1-13, 2007.

BLANCHARD, T.L.; DICKSON, D.V.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction**. St. Louis: Mosby, p.11, 2003.

BOAKARI, Y.L. **Efeito da hCG ou deslorelina sobre a hemodinâmica folicular e perfil endógeno de LH em éguas cíclicas**. 2014. 62f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BOLLWEIN, H.; SOWADE, C.; STOLLA, R. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. **Theriogenology**, v. 60, p.607-616, 2003.

BROGAN, P. T.; HENNING, H.; STOUT, T. A. E.; RUIJTER-VILLANI, M. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 22 – 27, 2016.

CAMPOS, M.J.A.P.M. **Utilização de Doppler na avaliação hemodinâmica ovárica de éguas pura raça espanhola – estudo piloto**. 2017. Dissertação de Mestrado (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.

CANESIN, H.S. **Caracterização da hemodinâmica uterina de éguas durante o ciclo estral**. Botucatu/SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2013. 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013.

CANUTO, L.E.F.; OLIVEIRA, S.N.; CAVALERO, T.M.S.; SCHEENREN, V.F.C.; RODRIGUES, L.T.; SOUSA, F.E.M.R.; RICCETTO, L.C.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F.O. Induction of Ovulation With Histrelin Acetate in Brazilian Northeastern Jennies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p.121, 2018.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.872-879, 2008.

CASTRO, T.; OLIVEIRA, F.A.; SIDDIQUIM, M.A.; BALDRIGHI, J.M.; WOLF, C.A.; GINTHER, O.J. Stimulation of LH, FSH and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. **Theriogenology**, v.85, p.740-746, 2016.

CASTRO, T. **Fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de LH e FSH após administração de gnrh durante a fase luteal em éguas**. 2017. 61f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. UFES. Alegre.

CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ROSER, J.F.; WOODWARD, E.M.; DAVOLLI, G.M.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. **Theriogenology**, v.97, p.34-40, 2017.

DAVID, F.F.A. **Fotoperíodo artificial no verão pode evitar anestro estacional na égua?** 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2010.

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

FERREIRA, A.I.T. **Reprodução equina**. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Porto, Porto, 2009.

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

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Potential use of doppler ultrasound in equine embryo transfer programs. **Ciência Rural**, v.41, p.1063-1069, 2011.

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

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

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

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; NEVES, A.P.; PETRUCCI, B.P.L.; MATTOS, R.C.; GINTHER, O.J. Miniature Ponies: Similarities and differences from larger breeds in follicles and hormones during the estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 508 - 517, 2008.

GASTAL, E.L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction**, v.6, p.144-158, 2009.

GASTAL, E.; GASTAL, M. Clinical use of B-mode and color-Doppler ultrasonography to evaluate preovulatory follicle status in mares, **Carbondale**, p.359–369, 2012.

GHORI, A.K.; KELVIN, C.C. **The medical Doppler in hand surgery**: Its scientific basis, applications, and the history of its namesake, Christian Johann Doppler. *J Hand Surg*, v.32A, p.1595 - 1599, 2007.

GINTHER, O.J.; WHITMORE, H.L.; SQUIRES, E.L. Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects of season and nursing. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, p.1935-1939, 1972.

GINTHER, O.J.; GARCIA, M.C.; BERGFELT, D.R. Embryonic loss in mares: Pregnancy rate, length of interovulatory intervals and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. **Theriogenology**, v.24, n.4, p.409-417, 1985.

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

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.311-320, 1990.

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

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

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

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

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction**. Cross Plains: Equiservices Publishing. v.4, 258p, 2007.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; NEVES, A.P.; MATTOS, R.C.; PETRUCCI, B.P.L.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Miniature ponies: Endocrinology of the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.386-390, 2008.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; DUARTE, L. F.; BEG, M. A. Follicle suppression of circulating follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone before versus after emergence of the ovulatory wave in mares. **Theriogenology**, v.72, p.445-452, 2009.

GINTHER, O.J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v.81, p.112-125, 2014.

GINTHER, O.J. Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus luteum in monovulatory heifers, mares, and women. **Theriogenology**, v.128, p.31-39, 2019.

GOLDSTEIN, J. R. Ultrasound-guided peripheral venous access. **Israeli Journal of Emergency Medicine**, v.6, n.4, p.46-52, 2006.

GRECO, G. M. **Eficiência de diferentes agentes indutores da ovulação e associações sobre as características uterinas, ovarianas e concentrações plasmáticas de LH em éguas**. 2016. Tese de doutorado (Doutorado em Biotecnologia Animal). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu.

HAFEZ E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. ed. 7. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HASSAN, M.; ARSHAD, U.; BILAL, M.; SATTAR, A.; AVAIS, M.; BOLLWEIN, H.; AHMAD, N. Luteal blood flow measured by doppler ultrasonography during the first three weeks after artificial insemination in pregnant and non-pregnant bos indicus dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**. v.65, n.1, p.29-36, 2019.

IGNÁCIO, F.S. **Avaliação funcional de estruturas luteais formadas após aspiração folicular em éguas**. Botucatu/SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013.

ISHAK, G.M.; BASHIR, S.T.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, bloodflow, and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v.187, p.1-122, 2017.

KERBAN, A.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Characterization of cellular and vascular changes in the equine follicles during hCG-induced ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.115-123, 1999.

KISER, A.M.; SUDDERTH, A.K.; BRINSKO, S.P.; BURNS, P.J.; DOUGLAS, R.H.; BLANCHARD, T.L. Comparison of efficacy of two dose rates of histrelin for inducing ovulation in broodmares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.820-822, 2013.

LINDHOLM, A.R.G.; FERRIS, R.A.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, p.312-313, 2011.

LOY, R.G.; HUGHES, J.P. The effects of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare. **Cornell Vet**, v.56, p.41- 50, 1966.

MARIZ, T.M.A.; ANJOS, A.G.; FLOR, J.M.; FLOR, L.M.A.M.; LIMA, C.B.; GIVISIEZ, P.E.N.; AZEVEDO, P.S. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; COOK, V.M. Equine embryo transfer: a review. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.10, p.343-355, 1988.

MOREL, M.C.G.D. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. CABI Publishing, 2. ed. London. 2003.

NIETO-OLMEDO, P.; MARTÍN-CANO; GAITSKELL-PHILLIPS, G.; ORTIZ-RODRÍGUEZ, J.M.; PEÑA, F.J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C. Power Doppler can detect the presence of 7e8 day conceptuses priortoflushing in an equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.145, p.1-9, 2020.

OBERHAUS, E.L.; THOMPSON JR, D.L.; FOSTER, B.A.; PINTO, C.R. Effects of combined estradiol-sulpiride treatment and follicle ablation on vernal transition in mares: evaluation of plasma and follicular fluid hormones and luteinizing hormone receptor gene expression. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.64, p.69-76, 2018.

OLIVEIRA, S.N.; CANUTO, L.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, P.; FONSECA, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; PAPA, F. Histrelin acetate-induced ovulation in Brazilian Northeastern jennies (*Equus asinus*) with different follicle diameters. **Theriogenology**, v.136, p.95-100, 2019.

OLIVEIRA NETO, I.V.; CANISSO, I.F.; SEGABINAZZI, L.G.; DELL'AQUA, C.P.F.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR, J.A. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science**, v.190, p.81-92, 2018.

PADULA, A.M. GnRH analogues-agonists and antagonists. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.115-126, 2005.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.13, p.206-216, 1980.

PIETRANI, M.; LOSINNO, L.; ARANGO, J.C. Effect of the interval from prostaglandin f2alpha treatment to ovulation on reproductive efficiency rates in a commercial equine embryo transfer program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.78, p.123-126, 2019.

ROMANO, R.M. **Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas**. 2013. 88f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RUA, M.A.S.; QUIRINO, C.R.; BARTHOLAZZI JUNIOR, A.; SANTORO, P.N. VEGA, W.H.O.; MATOS, L.F. Características seminais de garanhões Pôneis da raça Brasileira. **Revista electrónica de veterinária**. v.18, n.01, 2017.

SAMPER, J.C.; ESTRADA, A.J.; MCKINNON, A.O. **Insemination with frozen semen**. In: Rudolph P, Gower J. (Ed.). Current therapy in equine reproduction. Saunders Elsevier, p. 285-288, 2007.

SAMPER, J.C. Induction of estrous and ovulation: why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v.70, p.445-447, 2008.

SANTOS, D.A.A.; OLIVEIRA, M.B.; FERREIRA, H.N. GnRH agonista (Acetato de histrelina) na múltipla ovulação em égua. **PUBVET**, v.13, n.4, a.319, p.1-6, 2019.

SILVA, L.A. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v.72, p.755-761, 2005.

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

SILVA, M.S.J.; LIMA, R.S.; SILVA, M.J.S.; LUCENA, J.E.C.; CARNEIRO, G.F.; NASCIMENTO, G.; JOBIM, C.C. Avaliação comportamental de éguas estabuladas em período reprodutivo. **Revista Ciência Agronômica**, v.14, n.1, p.46-54, 2015.

SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. **AAEP Proceedings**, v.49, p.353-355, 2003.

ULIANI, R.C. **Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-B e doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação**. 2012. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VALERA, M.; ESTEVES, L.; OOMAY, M.M.; MOLINA, A.; La raça equina autóctone puro sangue lusitano: Estudo genético dos parâmetros reprodutivos de importância nos esquemas de conservação e melhoramento. **Archivos de Zootecnia**, v.49, n.186, p.147-156, 2000.

VOGE, J.L.; SUDDERTH, A.K.; BRINSKO, S.P.; BURNS, P.J.; BLANCHARD, T.L. Comparison of efficacy of two dose rates of histrelin to human chorionic gonadotropin for inducing ovulation in broodmares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.208-210, 2012.

WEBEL, S.K.; FRANKLIN, V.; HARLAND, B.; DZIUK, P.J. Fertility, ovulation and maturation of eggs in mares injected with hCG. **Journal Reproduction and Fertility**, v.51, p.337-341, 1977.

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM ACETATO DE HISTRELINA EM ÉGUAS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO COM DIFERENTES DIÂMETROS FOLICULARES

Resumo

Entre as raças de equinos distribuídas mundialmente, temos um grupo de raças pequenas, genericamente denominados como pôneis, sendo as mais conhecidas a raça Shetland e, no Brasil, as raças Piquira e Pônei Brasileiro. Apesar da técnica da indução da ovulação em éguas de raças de grande porte ser um procedimento extensamente utilizado, poucos estudos têm sido realizados sobre esse procedimento em éguas pôneis. O objetivo do presente estudo foi induzir a ovulação de folículos com diferentes diâmetros e avaliar as alterações morfológicas e vasculares destas estruturas em éguas da raça Pônei Brasileiro. Foram avaliadas 30 induções da ovulação e 3 ovulações espontâneas de um total de 20 éguas da raça Pônei Brasileiro, criadas no município de Campos dos Goytacazes-RJ. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de tratamento em função do diâmetro do maior folículo no momento da indução da ovulação: G25 (indução da ovulação com folículo de 25mm), G30 (indução da ovulação com folículo de 30mm), G35 (indução da ovulação com folículo de 35mm) e GC (grupo controle - ovulação espontânea). Os animais foram avaliados por ultrassonografia a cada 6 horas a partir da aplicação do indutor da ovulação, até a detecção da ovulação ou por 48 horas para os animais que não ovularam. Foram avaliados os efeitos do diâmetro inicial do maior folículo no momento da indução da ovulação (DI) sobre o diâmetro máximo folicular (DM), diâmetro médio folicular (DMd), intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV), intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a

ovulação (TAF-OV), área de vascularização do folículo dominante (AV), grau de edema uterino no momento da indução da ovulação, taxa de ovulação (TXOV), porcentagem de prenhez (PP) e porcentagem de prenhez por ovulação (PPO). O DI apresentou diferença entre os grupos de tratamento ($P < 0,05$), mas não diferiu entre G35 e GC ($34,87 \pm 0,21$ vs $34,74 \pm 0,13$) ($P > 0,05$). Foi observada diferença ($P < 0,05$) entre todos os grupos (G25, G30, G35 e GC) para DM ($27,71 \pm 1,42$; $31,86 \pm 0,74$; $35,48 \pm 0,54$ e $37,38 \pm 0,46$) e DMd ($26,43 \pm 1,3$; $30,7 \pm 1,13$; $35,56 \pm 0,9$ e $36,51 \pm 0,5$), respectivamente. O GC ($84,0 \pm 21,63$) apresentou diferença no TAI-OV em relação aos demais grupos (G25, $33,0 \pm 10,4$; G30, $36,85 \pm 8,7$ e G35, $35,14 \pm 8,07$) ($P < 0,05$). Não houve diferença ($P > 0,05$) para TSB-OV (G25, $16,5 \pm 10,4$; G30, $19,71 \pm 4,53$; G35, $17,14 \pm 2,26$ e GC, $24,0 \pm 0$) e TAF-OV (G25, $12,0 \pm 4,8$; G30, $10,28 \pm 4,54$; G35, $12,0 \pm 4,9$ e GC, $12,0 \pm 0$). A AV apresentou diferença entre GC ($0,94 \pm 0,43$) e os demais grupos (G25, $0,72 \pm 0,31$; G30, $0,72 \pm 0,4$ e G35, $0,63 \pm 0,4b$) ($P < 0,05$). A TXOV apresentou diferença entre o grupo G25 (40%) e demais grupos G30 (70%), G35 (70%) e GC (100%) ($P < 0,05$). A porcentagem de prenhez apresentou diferença entre G25 (10%) e os demais grupos (G30, 50%; G35, 40% e GC, 66,67%) ($P < 0,05$), bem como porcentagem de prenhez por ovulação (G25, 25%; G30, 71,43%; G35, 57,14% e GC, 66,67%). Foi observada uma alta correlação entre DI e DM (0,97), enquanto o grau de edema no momento da indução, TXOV e PP apresentaram correlação média com DI (0,45; 0,3 e 0,42, respectivamente). Conclui-se que éguas da raça Pônei Brasileiro apresentando folículos com diâmetro ≥ 30 mm foram responsivas à indução com acetato de histrelina, apresentando taxa de ovulação e porcentagem de prenhez satisfatórias.

Palavras-chave: ultrassonografia Doppler; acetato de histrelina; GnRH; equino.

1. Introdução

Diversas diferenças reprodutivas foram relatadas em pôneis em relação à raças de grande porte. Éguas miniaturas apresentam um intervalo ovulatório maior, menor número de folículos por onda ovulatória [1–3], menor número de ovulações duplas [3], taxa de crescimento folicular 0,5 mm/dia menor que raças de grande porte e diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório cerca de 3,6 a 5,0 mm menor [1,4].

Apesar do conhecimento dos aspectos reprodutivos relacionados à ovulação em éguas de grande porte, tanto em ovulações naturais como induzidas, pouco se sabe sobre esses aspectos em raças miniaturas [1,5]. Apesar do destaque no mercado equestre nacional, os conhecimentos referentes à indução de ovulação nestes animais ainda são escassos, necessitando, desta forma, mais estudos sobre esta técnica, levando em consideração suas particularidades.

O conhecimento do desenvolvimento folicular e das mudanças estruturais que ocorrem no folículo pré-ovulatório, assim como a compreensão das alterações vasculares que ocorrem com o mesmo ressaltam, respectivamente, a importância da utilização da ultrassonografia convencional e Doppler nos programas de reprodução equina [6–8]. Por serem técnicas não invasivas, podem ser utilizadas repetidamente, sem gerar danos à saúde dos animais avaliados [9].

A indução da ovulação vem sendo utilizada com frequência, destacando-se como uma das principais biotécnicas aplicadas à reprodução equina [10–14]. O uso de agentes indutores da ovulação permite que a grande maioria das éguas ovule de forma sincronizada, dentro de um período pré-determinado [10], o que facilita o manejo reprodutivo, possibilitando reduzir o número de coberturas, otimizar o uso de garanhões e facilitar a sincronização entre doadoras e receptoras em programas de

transferência de embriões [15]. Além disso, devido ao número reduzido de inseminações por ciclo, viabiliza o uso de sêmen de menor fertilidade, como sêmen resfriado e congelado, já que as inseminações poderão ser realizadas em um momento próximo à ovulação [14].

O objetivo do presente estudo foi induzir a ovulação de folículos com diferentes diâmetros e avaliar as alterações morfológicas e vasculares destas estruturas em éguas da raça Pônei Brasileiro.

2. Materiais e Métodos

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA/UENF) com o número de protocolo 402.

2.1 Animais

Foram utilizadas 20 éguas da raça Pônei Brasileiro, adultas, com idades entre 4 e 9 anos, não gestantes, provenientes do município de Campos dos Goytacazes, RJ (Latitude: -21.7545, Longitude: -41.3244 21° 45' 16" Sul, 41° 19' 28" Oeste). Os animais passaram previamente por uma avaliação ainda na propriedade de origem e foram utilizados somente aqueles que apresentaram-se cíclicas, com presença de folículo ≥ 20 mm de diâmetro e sem alterações reprodutivas.

As éguas selecionadas foram alojadas no setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" (UENF), sendo mantidas sob luz natural, em piquetes com alimentação à base de feno de tyfton (*Cynodon dactylon*), sal mineral e água *ad libitum*. O experimento foi realizado durante duas estações reprodutivas,

compreendendo os períodos de outubro de 2018 a março de 2019 e outubro a dezembro de 2019.

2.2 Grupos de tratamento

Após chegarem no local de desenvolvimento do experimento, os animais foram alocados em um dos três grupos de tratamento à medida que o maior folículo alcançava o diâmetro definido para a indução da ovulação em cada grupo (25, 30 ou 35mm para os grupos G25, G30 e G35, respectivamente), sendo que cada grupo foi composto por 10 animais. A indução da ovulação foi realizada pela aplicação de 0,25mg de acetado de histrelina (Strelin[®]; Botupharma[®]) por via intramuscular. Posteriormente, as éguas foram inseminadas com sêmen a fresco de fertilidade comprovada 24 horas após a indução.

Após a indução da ovulação nos grupos de tratamento, os animais foram avaliados por ultrassonografia convencional e Power Flow a cada 6 horas, para observação do tempo percorrido até o momento da detecção da ovulação e avaliação das mudanças estruturais e hemodinâmicas sofridas pelo folículo pré-ovulatório. Os animais que não ovularam depois de transcorridas 48 horas da indução da ovulação foram considerados não responsivos ao tratamento.

Três animais apresentando folículo de 25mm foram selecionados e alocados no Grupo Controle (GC; n=3), sendo avaliados diariamente por ultrassonografia, até a observação de um folículo dominante de 35mm, para então serem submetidos a uma aplicação de 1mL de solução salina por via intramuscular.

2.3 Avaliação ultrassonográfica

As imagens ultrassonográficas dos folículos foram realizadas por um único operador, com auxílio de um ultrassom portátil (Z6 VetMindray®), equipado com modo-B (escala de cinza) e Power Flow, com transdutor linear multifrequencial de banda larga, utilizando frequência de 5,0 MHz. Todas as configurações de imagem foram padronizadas previamente e mantidas constantes durante todo o experimento. Para o modo Power Flow foi utilizado frequência de 5,3 MHz, ganho 36, filtro de parede 106 e PRF 1.0 k.

O maior folículo foi escaneado utilizando o modo-B para avaliação da morfologia e ecogenicidade das camadas da granulosa e teca. O diâmetro folicular foi avaliado através de imagens estáticas, obtidas no ponto de diâmetro máximo do antro folicular, sendo mensurado através da média entre maior e menor diâmetro, realizadas de forma perpendicular entre si. Foram avaliados o diâmetro inicial do maior folículo no momento da indução da ovulação (DI), o diâmetro máximo folicular (DM) e o diâmetro médio folicular (DMd). Foi avaliado ainda o intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), o intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV) e intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação (TAF-OV).

A avaliação da área de vascularização do folículo dominante (AV) foi realizada através do modo Power Flow (Figura 1). As imagens foram obtidas no ponto de diâmetro máximo, registrando-se três imagens da vascularização folicular em cada exame, sendo estas imagens arquivadas para serem analisadas posteriormente. As imagens foram processadas através do programa ImageJ1.31® (National Institutes of Health®, Bethesda, MD). Foi realizada a padronização da escala da imagem ultrassonográfica, selecionando a área com presença de vascularização pela

ferramenta de seleção retangular. A área de seleção foi salva pela função *roi manager* e a parte externa da seleção foi apagada através da opção *clear outside*. Foi necessário a edição das imagens em *color threshold*, com o objetivo de transformar toda a área de vascularização em cor branca e as regiões não vascularizadas em preto sendo que, posteriormente, o formato da imagem foi modificado de RGB para 8 bits. A imagem foi configurada para binária e avaliada pela função *analyze particles* para determinação, em mm², da área de vascularização (AV). As três imagens obtidas em cada exame foram analisadas, sendo que a determinação da AV foi dada por uma média do valor obtido para as imagens de cada exame.

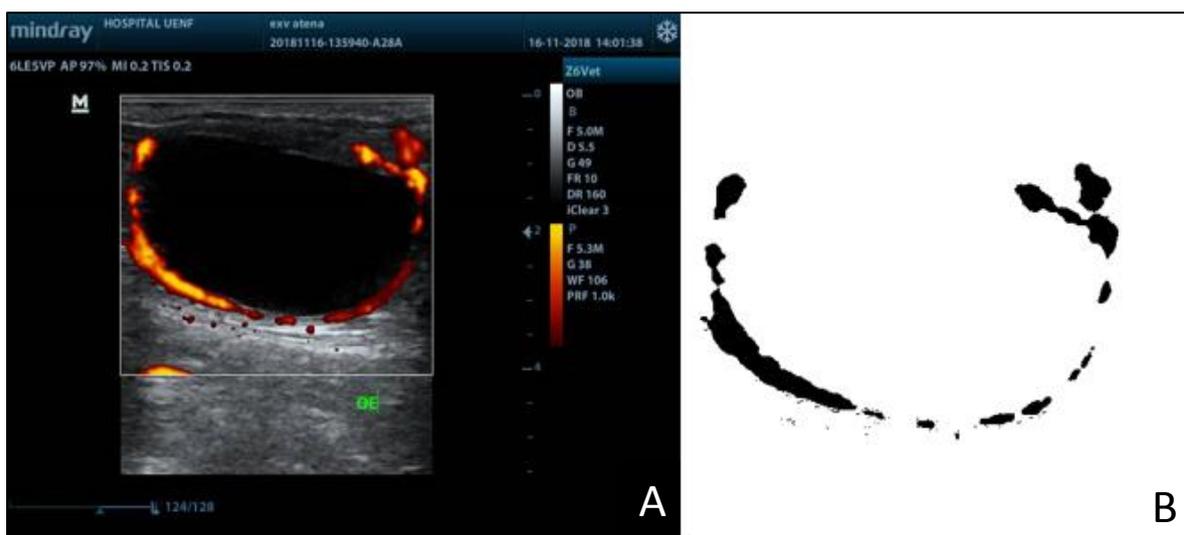


Figura 1. A- imagem ultrassonográfica modo Power Flow de folículo dominante de égua da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida. B- imagem da vascularização de folículo dominante de égua da raça Pônei Brasileiro processada no software ImageJ® para mensuração da área de vascularização.

A avaliação do grau de edema uterino foi realizada no momento da indução da ovulação, sendo classificado visualmente em uma escala de 0 a 3, onde 0 corresponde à ecotextura de diestro e 3 ao nível máximo de edema endometrial.

A porcentagem de prenhez por grupo (PP) e porcentagem de prenhez por ovulação (PPO) foi calculada a partir do diagnóstico de gestação realizado no 12º dia

pós-ovulação, sendo PP calculada a partir do número de animais gestantes em relação ao número total de animais de cada grupo, enquanto PPO foi calculada a partir do número de animais gestantes em relação ao número de animais que ovularam em cada grupo.

2.4 Análise estatística

Para o diâmetro inicial do maior folículo no momento da indução da ovulação (DI), o diâmetro máximo folicular (DM), o diâmetro médio folicular (DMd), o intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), o intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV), o intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação (TAF-OV) e a área de vascularização do folículo dominante (AV), foi realizada análise de variância testando o efeito de grupo, sendo as médias comparadas através do teste SNK a nível de 5% de probabilidade. A taxa de ovulação, a porcentagem de prenhez (PP) e porcentagem de prenhez por ovulação (PPO) foram avaliadas através do teste qui-quadrado. Foi realizada ainda a correlação de Pearson. Foi utilizado o software SAS, versão 9.4.

3. Resultados

As médias e desvio padrão para diâmetro inicial do maior folículo no momento da indução da ovulação, diâmetro máximo folicular, diâmetro médio folicular, intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação, intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação e intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Média e respectivo desvio padrão para diâmetro inicial folicular no momento da indução da ovulação (DI), diâmetro máximo folicular (DM), diâmetro médio folicular (DMd), intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV) e intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação (TAF-OV) para os grupos G25, G30, G35 e controle de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida em diferentes diâmetros foliculares.

	DI (mm)	DM (mm)	DMd (mm)	TAI-OV (h)	TSB-OV (h)	TAF-OV (h)
G25	25,22±0,39 ^c	27,71±1,42 ^d	26,43±1,3 ^d	33,0±10,4 ^b	16,5±10,4 ^a	12,0±4,8 ^a
G30	29,88±0,5 ^b	31,86±0,74 ^c	30,7±1,13 ^c	36,85±8,7 ^b	19,71±4,53 ^a	10,28±4,54 ^a
G35	34,87±0,21 ^a	35,48±0,54 ^b	35,56±0,9 ^b	35,14±8,07 ^b	17,14±2,26 ^a	12,0±4,9 ^a
GC	34,74±0,13 ^a	37,38±0,46 ^a	36,51±0,5 ^a	84,0±21,63 ^a	24,0±0 ^a	12,0±0 ^a

G25= éguas com ovulação induzida com folículos de 25mm de diâmetro; G30= éguas com ovulação induzida com folículos de 30mm de diâmetro; G35= éguas com ovulação induzida com folículos de 35mm de diâmetro; GC= éguas com ovulação natural, não submetidas à indução. Médias da mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste SNK a nível de 5% de probabilidade.

Para o diâmetro folicular inicial no momento da indução, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre as médias dos grupos GC e G35, sendo observada diferença ($P<0,05$) entre G25 e G30, G25 e G35, G25 e GC, G30 e G35 e G30 e GC. Para diâmetro máximo folicular e diâmetro médio folicular foi observada diferença entre todos os grupos ($P<0,05$).

O intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação apresentou diferença entre o grupo GC e os grupos G25, G30 e G35 ($P<0,05$). O intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação e o intervalo de tempo do surgimento

de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre os grupos avaliados.

As médias e desvio padrão para a área de vascularização folicular, grau de edema uterino no momento da indução da ovulação, a taxa de ovulação, a porcentagem de prenhez e a porcentagem de prenhez por grupo estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Média e respectivo desvio padrão para área de vascularização do folículo dominante (AV), grau de edema uterino no momento da indução da ovulação (ED), taxa de ovulação (TXOV), porcentagem de prenhez (PP) e porcentagem de prenhez por ovulação (PPO) para os grupos G25, G30, G35 e controle de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida em diferentes diâmetros foliculares.

	AV (mm ²)	ED	TXOV (%)	PP (%)	PPO (%)
G25	0,72±0,31 ^b	2,2±0,42 ^b	40 ^c	10 ^b	25 ^b
G30	0,72±0,4 ^b	2,6±0,51 ^{ab}	70 ^b	50 ^a	71,43 ^a
G35	0,63±0,4 ^b	2,7±0,48 ^{ab}	70 ^b	40 ^a	57,14 ^a
GC	0,94±0,43 ^a	3±0 ^a	100 ^a	66,67 ^a	66,67 ^a

G25= éguas com ovulação induzida com folículos de 25mm de diâmetro; G30= éguas com ovulação induzida com folículos de 30mm de diâmetro; G35= éguas com ovulação induzida com folículos de 35mm de diâmetro; GC= éguas com ovulação natural, não submetidas à indução. Médias da mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste SNK a nível de 5% de probabilidade ou pelo teste de qui-quadrado.

A área de vascularização folicular apresentou diferença entre GC e os demais grupos ($P<0,05$).

O grau de edema uterino no momento da indução da ovulação apresentou diferença entre GC e G25.

Para a taxa de ovulação, foi observada diferença entre os grupos G25 e demais grupos e entre GC e G30 e G35 ($P < 0,05$), não apresentando diferença entre G30 e G35 ($P > 0,05$).

A porcentagem de prenhez apresentou diferença entre G25 e demais grupos ($P < 0,05$). A porcentagem de prenhez por ovulação apresentou diferença entre o grupo G25 e os demais grupos ($P < 0,05$).

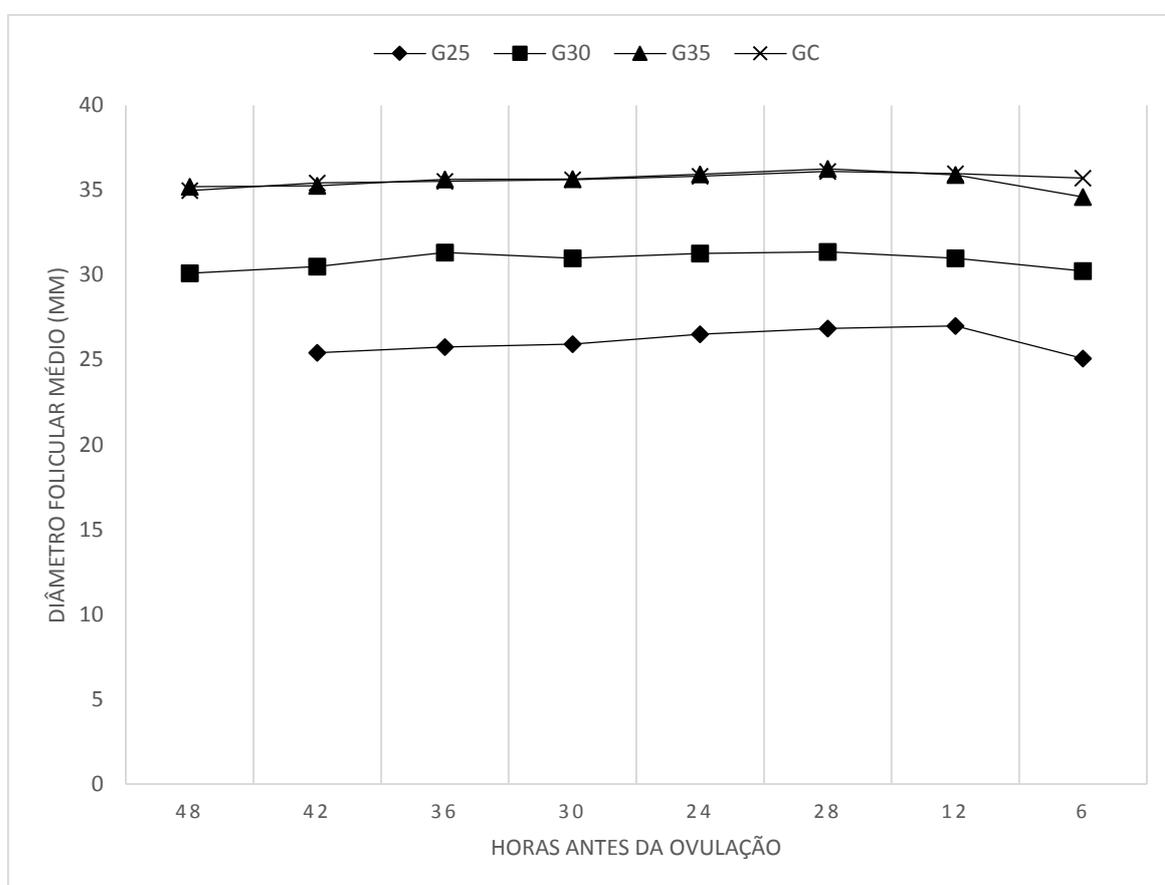


Figura 2. Média do diâmetro folicular de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida 48, 42, 36, 30, 24, 18, 12 e 6 horas antes da constatação da ovulação, onde: G25= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 25mm de diâmetro; G30= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 30mm de diâmetro; G35= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 35mm de diâmetro; GC= grupo controle, éguas que tiveram sua ovulação acompanhada naturalmente, sem indução.

Observou-se em todos os grupos uma pequena redução no diâmetro folicular (Figura 2) e na área de vascularização folicular (Figura 3) cerca de 6 horas antes da ovulação. Contudo, não houve diferença estatística entre os momentos avaliados.

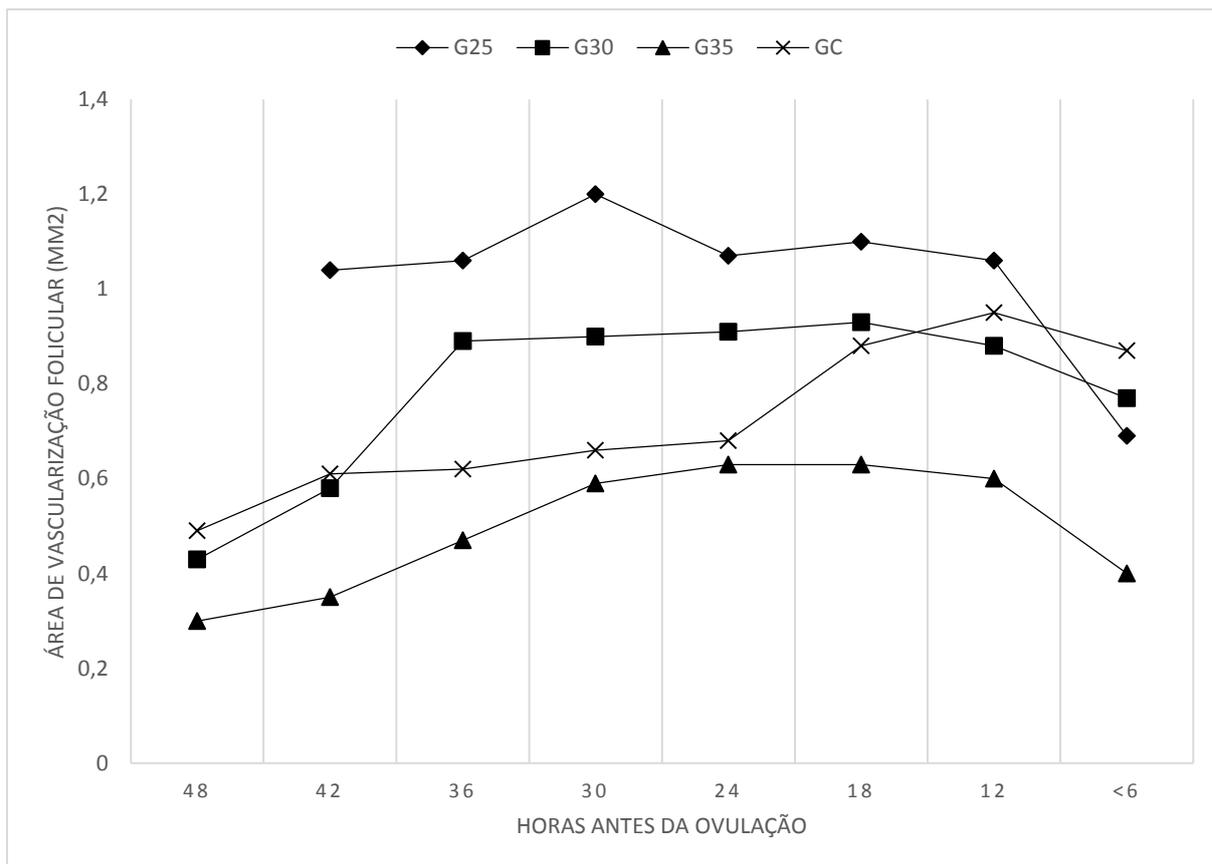


Figura 3. Média da área da vascularização folicular de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida 48, 42, 36, 30, 24, 18, 12 e 6 horas antes da constatação da ovulação, onde: G25= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 25mm de diâmetro; G30= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 30mm de diâmetro; G35= éguas que tiveram sua ovulação induzida com folículo medindo 35mm de diâmetro; GC= grupo controle, éguas que tiveram sua ovulação acompanhada naturalmente, sem indução.

Na tabela 3 observa-se alta correlação entre diâmetro folicular inicial e diâmetro máximo folicular, enquanto o grau de edema uterino, taxa de ovulação e porcentagem de prenhez por ovulação obtiveram correlação média com diâmetro folicular inicial. Foram encontradas correlações próximas de zero entre diâmetro folicular inicial e intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação, intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação e o intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação.

Tabela 3. Correlação entre diâmetro folicular inicial (DI) e diâmetro máximo folicular (DM), intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação (TAI-OV), intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação (TSB-OV), intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação (TAF-OV), grau de edema uterino no momento da indução da ovulação (ED), taxa de ovulação (TXOV) e porcentual de prenhez por grupo (PP) de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida em diferentes diâmetros foliculares.

Variável	Correlação
DM	0,97**
TAI-OV	0,03
TSB-OV	-0,1
TAF-OV	0,07
ED	0,45*
TXOV	0,3*
PP	0,22*

*P<0,05; **P<0,01.

4. Discussão

O diâmetro inicial do maior folículo no momento da indução da ovulação não apresentou diferença entre G35 (34,87mm) e GC (34,74mm), uma vez que os animais do GC tiveram seu acompanhamento iniciado no mesmo diâmetro folicular (35mm). As diferenças observadas entre os demais grupos reforçam o objetivo do estudo, que é a indução da ovulação de folículos com diâmetros significativamente diferentes.

Uma vez que a indução da ovulação foi realizada com diâmetro inicial do folículo dominante no momento da indução da ovulação diferentes entre os grupos, já era esperado que estes apresentassem diferença entre si para diâmetro máximo folicular e diâmetro médio folicular. No entanto, apesar de G35 e GC apresentarem o mesmo diâmetro inicial do folículo dominante no momento da indução da ovulação, observou-se diferença no diâmetro máximo folicular e diâmetro médio folicular. Estudos anteriores demonstram que, após o desvio folicular, o folículo dominante cresce cerca de 3mm por dia, e mantém este crescimento até 2 dias antes da ovulação [16,17]. Após a indução da ovulação, essa taxa de crescimento apresenta uma queda importante [8,18]. Desta forma, os animais do G35 tiveram o padrão de crescimento folicular alterado devido à indução, reduzindo sua taxa de crescimento, enquanto os folículos dos animais do GC continuaram seu crescimento até a ovulação espontânea, o que explica a diferença.

Ainda em relação ao diâmetro folicular máximo, o valor de 37,38mm encontrado no GC no presente estudo está de acordo com o resultado relatado em outro estudo conduzido com éguas pôneis miniaturas, que foi de 37,3mm para ovulações naturais [5]. Outros estudos também afirmam observar um menor diâmetro máximo folicular para estes animais [1,4,5].

O intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação foi diferente entre GC e os outros grupos de tratamento devido a não submissão destes animais à indução. O intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação dos animais submetidos à indução nos diferentes grupos observados neste estudo foi semelhante a estudos anteriores que demonstram o efeito indutor da histrelina entre 24-48 horas pós-indução [10,12–14]. A ausência de diferença para intervalo de tempo da aplicação do

indutor até a ovulação entre os grupos com ovulação induzida já era esperado, uma vez que esta característica não está diretamente relacionada ao diâmetro folicular no momento da indução da ovulação, mas possivelmente a outros fatores endócrinos ligados ao animal.

O intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação e intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação são mudanças morfológicas inerentes a folículos próximos da ovulação [18,19]. Por ser considerada um processo inflamatório, a ovulação gera uma dilatação considerável de capilares na teca em éguas [20]. Devido ao edema, há um acúmulo de fluidos nos espaços intercelulares [19,20], formando a banda anecóica entre as camadas da teca [18,19]. Estudos demonstram um aumento diário e progressivo da área atingida pela banda anecóica no período de três a um dia antes da ovulação, podendo atingir até 100% da circunferência folicular no período pré-ovulatório [18]. Similar aos resultados deste trabalho, Gastal *et al* (2006) [18] demonstraram, ao comparar éguas com ovulação espontânea e induzida com hCG, não haver diferença no intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação para ambos. No entanto, estes autores [18] demonstram um tempo de surgimento da banda cerca de 36 horas antes da ovulação, divergindo com os resultados encontrados. A diferença entre agentes indutores pode ter influenciado tal característica, uma vez que a histrelina é mais potente que o hCG, promovendo uma ovulação mais rápida, o que contribuiu para a redução do espaço de tempo entre o aparecimento da banda anecóica e a ovulação. Além disto, não é descrito na literatura o intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação para éguas miniatura com ovulação natural, o que torna necessário mais estudos a respeito deste fenômeno.

Assim como o intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação, as médias do intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação também não diferiu entre os grupos, uma vez que se trata de uma característica vinculada à proximidade da ovulação, e não com o diâmetro folicular. Essa alteração de forma ocorre devido uma diminuição da tensão da parede do folículo, deixando seu formato esférico e assumindo um caráter alongado ou irregular [21]. Estudos demonstram que a maioria dos folículos que apresentam essa característica alteram seu formato entre 4 e 8 horas antes da ovulação [19,22], semelhante ao tempo encontrado no presente estudo (10 a 12 horas).

As médias para área de vascularização folicular apresentaram diferença entre GC e demais grupos, resultado semelhante ao encontrado por Gastal *et al* (2006), onde foi comparada a vascularização de folículos com ovulação espontânea e folículos induzidos por hCG [18]. Apesar do diâmetro folicular diferir entre os grupos de tratamento, a área de vascularização folicular não se diferiu devido à indução, que encurtou seu tempo de desenvolvimento. Os folículos do GC podem ter apresentado maior vascularização devido ao maior crescimento, já que folículos maiores tendem a ser mais vascularizados [7,23] devido a uma maior angiogênese na fase final do crescimento folicular.

A taxa de ovulação em GC (100%) foi superior às taxas dos demais grupos, uma vez que este foi acompanhado até a ocorrência espontânea da mesma. G25 (40%) obteve uma taxa de ovulação menor que os demais (70%), o que indica a ineficiência destes folículos em responder ao tratamento indutor, corroborando com estudos conduzidos em jumentas, que indicam uma baixa responsividade de folículos entre 25 a 28mm à indução de ovulação com acetato de histrelina [14]. Esse comportamento

deve-se, principalmente, à falta de receptores de LH nas células da granulosa, gerando um desenvolvimento insuficiente e, conseqüentemente, menor responsividade às gonadotrofinas exógenas durante esse período [24,25].

Folículos maiores e bem vascularizados estão relacionados com maiores taxas de prenhez em éguas por gerarem oócitos de melhor qualidade [6,8,26]. Tal fato pode estar relacionado a G25 apresentar porcentagem de prenhez por grupo e porcentagem de prenhez por animal ovulado significativamente menor que os demais grupos. Em um estudo conduzido com jumentas, folículos de menor diâmetro (25-28mm) também apresentaram menor percentual de prenhez [14].

As diferenças reprodutivas em pôneis quando comparadas às raças de grande porte [1-3,5], principalmente relacionadas ao diâmetro folicular [1,4,5], reforçam a necessidade de estudos em equinos miniatura. O fato das taxas de ovulação em G30 e G35 não serem diferentes, bem como a porcentagem de prenhez entre G30, G35 e GC (71,42%, 57,14% e 66,67%) também não serem diferentes reforçam a eficiência do tratamento de indução quando induzidos folículos com 30mm de diâmetro em animais da raça Pônei Brasileiro, indicando uma possível redução no diâmetro mínimo recomendado para a indução, que é de 35mm para raças de grande porte [27].

Em todos os grupos, foi possível observar uma discreta redução no diâmetro (Figura 2) e na área de vascularização folicular (Figura 3) cerca de 6 horas antes da ovulação. Estudos anteriores também encontraram uma redução no diâmetro folicular quatro horas antes da ovulação em éguas com ovulação espontânea bem como em éguas induzidas com hCG [18]. Também ocorreu uma diminuição abrupta da vascularização folicular durante as quatro últimas horas que antecedem a ovulação [6,18,23], corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Apesar

das reduções neste estudo serem mais discretas do que nos estudos citados, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$).

A alta correlação observada entre diâmetro folicular inicial no momento da indução da ovulação e diâmetro máximo folicular se deve, principalmente, à continuidade no desenvolvimento folicular durante o tratamento. Há uma mudança no padrão de crescimento após a indução da ovulação, porém o folículo não cessa seu crescimento, apesar deste ser reduzido [8,18].

As correlações próximas de zero entre diâmetro inicial folicular no momento da indução da ovulação e intervalo de tempo da aplicação do indutor até a ovulação, intervalo de tempo do surgimento de banda anecóica até a ovulação e intervalo de tempo do surgimento de alteração de formato do folículo dominante até a ovulação reforçam o fato destas características não estarem ligadas ao diâmetro folicular no momento da indução, e sim, à proximidade com a ovulação. Tal fato pode ser confirmado pelas médias destas características não se diferirem entre os grupos no presente estudo. Contudo, não foram encontrados outros estudos que correlacionem tais características com diferentes diâmetros foliculares, necessitando de mais estudos a respeito.

O edema endometrial desenvolve-se em éguas no período de estro devido à elevação na concentração sérica de estrógenos [14,28], que, por sua vez, possuem correlação positiva com o diâmetro folicular [29]. Porém, a utilização de indutores da ovulação podem influenciar tal característica [30]. No presente estudo esperava-se uma alta correlação entre o grau de edema endometrial e o diâmetro folicular no momento da indução da ovulação, uma vez que foram utilizados diferentes diâmetros foliculares no momento da indução. No entanto, a utilização do acetado de histrelina

pode ter contribuído para alterar os padrões fisiológicos de secreção de estrógeno, o que pode ter influenciado o desenvolvimento do edema endometrial.

Uma correlação média foi encontrada entre DI e taxa de ovulação. Folículos com diâmetro de 25mm apresentaram em éguas da raça Pônei Brasileiro um baixo potencial de ovulação, pois a maior parte das éguas ainda apresentam, neste diâmetro, folículos imaturos e incapazes de ovular. Resultado semelhante foi encontrado em jumentas, também com ovulação induzida por acetato de histrelina [14]. Por ser um análogo do GnRH, a histrelina atua no hipotálamo, estimulando a liberação endógena de LH [10,12–14,31]. No entanto, folículos menores possuem menos receptores para LH [24,25], o que gera uma baixa resposta destes à indução. Contudo, neste trabalho, foi observado que alguns folículos de menor diâmetro foram capazes de ovular e gerar gestações.

Folículos maiores e mais bem vascularizados afetam positivamente as taxas de prenhez em éguas [8] e vacas [32], uma vez que relacionam-se positivamente com o tamanho e a qualidade do futuro corpo lúteo [32,33]. No entanto, a taxa de prenhez pode ser afetada por inúmeros fatores [34], o que contribui para uma menor correlação entre as características foliculares e a taxa de prenhez.

Observou-se uma correlação média entre o diâmetro inicial no momento da indução da ovulação e as porcentagens de prenhez. No entanto, sabe-se que as taxas de prenhez podem ser afetadas por inúmeros fatores, incluindo nutrição, fatores ambientais, qualidade seminal e ambiente uterino [34], influenciando esta variável.

5. Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que em éguas da raça Pônei Brasileiro, folículos ≥ 30 mm mostram-se eficientes quando submetidos à indução da ovulação, obtendo taxas de ovulação e prenhez semelhantes à folículos ≥ 35 mm, preconizado para éguas de grande porte.

Conflito de interesses

Não há conflito de interesses que possa ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

Contribuições dos autores

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradecemos aos criadores Angelo Sales da Silveira e José Maurício dos Santos Ferreira pela disponibilização de seus animais para o estudo.

Referências

- [1] Gastal EL, Neves AP, Mattos RC, Petrucci BPL, Gastal MO, Ginther OJ. Miniature ponies: 1. Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development* 2008;20:376–85. <https://doi.org/10.1071/RD07164>.
- [2] Ginther OJ, Beg MA, Neves AP, Mattos RC, Petrucci BPL, Gastal MO, et al. Miniature ponies: 2. Endocrinology of the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development* 2008;20:386–90. <https://doi.org/10.1071/RD07165>.
- [3] Claes A, Ball BA, Scoggin KE, Roser JF, Woodward EM, Davolli GM, et al. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. *Theriogenology* 2017;97:34–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.019>.
- [4] Bergfelt DR, Ginther OJ. Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. *Journal of Equine Veterinary Science* 1996;16:66–72. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(96\)80158-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(96)80158-4).
- [5] Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Neves AP, Petrucci BPL, Mattos RC, et al. Miniature Ponies: Similarities and Differences from Larger Breeds in Follicles and Hormones during the Estrous Cycle. *Journal of Equine Veterinary Science* 2008;28:508–17. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.07.021>.
- [6] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Effect of prostaglandin F₂ α on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domestic Animal Endocrinology* 2007;32:315–28. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.04.006>.

- [7] Ferreira JC, de Meira C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. *Ciencia Rural* 2011;41:1063–9. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000600023>.
- [8] Silva LA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Animal reproduction* 2006;3:339–46.
- [9] Carvalho CF, Chammas MC, Cerri GG. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. *Ciência Rural* 2008;38:872–9. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782008000300047>.
- [10] Lindholm ARG, Ferris RA, Scofield DB, McCue PM. Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 2011;31:312–3. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.03.144>.
- [11] Voge JL, Kendrick Sudderth A, Brinsko SP, Burns PJ, Blanchard TL. Comparison of Efficacy of Two Dose Rates of Histrelin to Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012;32:208–10. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.09.065>.
- [12] Kiser AM, Sudderth AK, Brinsko SP, Burns PJ, Douglas RH, Blanchard TL. Comparison of efficacy of two dose rates of histrelin for inducing ovulation in broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013;33:820–2. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.12.007>.
- [13] Canuto LEF, Oliveira SN, Cavaleiro TMS, Scheeren VFC, Rodrigues LT, Sousa FEMR, et al. Induction of Ovulation With Histrelin Acetate in Brazilian Northeastern Jennies. *Journal of Equine Veterinary Science* 2018;66:121.

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.165>.

- [14] de Oliveira SN, Canuto L, Segabinazzi LGTM, Dell'Aqua Junior JA, Papa P, Fonseca M, et al. Histrelin acetate-induced ovulation in Brazilian Northeastern jennies (*Equus asinus*) with different follicle diameters. *Theriogenology* 2019;136:95–100. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.037>.
- [15] Greco GM. *Da Ovulação E Associações Sobre As Características* 2016.
- [16] Ginther OJ. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses*. Madison: 1995.
- [17] Jacob JCF. *Dinâmica ovárica e endócrina de éguas em diferentes idades*. Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- [18] Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 2006;131:699–709. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01011>.
- [19] Uliani RC. *Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-B e Doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação*. Universidade Estadual Paulista, 2012.
- [20] Kerban A, Doré M, Sirois J. Characterization of cellular and vascular changes in equine follicles during hCG-induced ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999;117:115–23. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170115>.

- [21] McKinnon AO., Squires EL., Pickett BW. Equine Reproductive Ultrasonography. Fort Collins; 1988.
- [22] Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Serrated granulosa and other discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 2006;26:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2005.12.005>.
- [23] Ginther OJ. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology* 2014;81:112–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.007>.
- [24] Ginther OJ, Beg MA, Gastal MO, Gastal EL. Follicle dynamics and selection in mares. *Anim Reprod*, v 2004;11:45–63.
- [25] Gurgel JRC, Viana CHC, Perez EGA, Nichi M. Dinâmica folicular em éguas : aspectos intrafoliculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2008;32:122–32.
- [26] Siddiqui M, Gastal E, Gastal M, Beg M, Ginther O. Effect of hCG in the presence of hCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. *Reproduction in Domestic Animals* 2009;44:474–9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01133.x>.
- [27] Oberhaus EL, Thompson DL, Foster BA, Pinto CR. Effects of Combined Estradiol-Sulpiride Treatment and Follicle Ablation on Vernal Transition in Mares: Evaluation of Plasma and Follicular Fluid Hormones and Luteinizing Hormone Receptor Gene Expression. *Journal of Equine Veterinary Science* 2018;64:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.02.020>.
- [28] Ginther OJ, Pierson RA. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. *Theriogenology*

1984;21:471–83. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90409-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90409-6).

- [29] Esteller-Vico A, Liu IKM, Vaughan B, Steffey EP, Brosnan RJ. Effects of estradiol on uterine perfusion in anesthetized cyclic mares affected with uterine vascular elastosis. *Animal Reproduction Science* 2016;164:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.012>.
- [30] Samper JC. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology* 2008;70:445–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.040>.
- [31] Aparecido D, Santos A. GnRH agonista (Acetato de histrelina) na múltipla ovulação em égua GnRH agonist (Histrelin acetate) on multiple ovulation in mare 2019:1–6.
- [32] De Tarso SGS, Gastal GDA, Bashir ST, Gastal MO, Apgar GA, Gastal EL. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reproduction, Fertility and Development* 2017;29:448–57. <https://doi.org/10.1071/RD15223>.
- [33] Ishak GM, Bashir ST, Gastal MO, Gastal EL. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science* 2017;187:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.09.003>.
- [34] Sena LM, Clara N, Almeida ÍC De, Santos JD, Martins CB. Principais causas de perdas gestacionais na espécie equina : Revisão Leading causes of pregnancy loss in the equine species : Review 2016:933–45.

CAPÍTULO 3.

Formação e perfusão vascular do corpo lúteo de éguas da raça Pônei Brasileiro submetidas à indução da ovulação com acetato de histrelina

Formation and vascular perfusion of the corpus luteum of Pônei Brasileiro mares submitted to ovulation induction with histrelin acetate

Resumo

O corpo lúteo (CL) é a estrutura responsável pela secreção de progesterona e, portanto, responsável pela manutenção inicial da gestação em equinos. Existe uma íntima relação entre as características morfológicas e funcionais, uma vez que é descrita uma alta correlação entre a vascularização e a função secretora do CL. O objetivo do presente estudo foi comparar o diâmetro, a ecogenicidade e a perfusão vascular do corpo lúteo de éguas da raça Pônei Brasileiro submetidas à indução da ovulação com acetato de histrelina em diferentes diâmetros foliculares. Foram avaliadas 30 induções da ovulação e 3 ovulações naturais e os respectivos corpos lúteos formados em éguas da raça Pônei Brasileiro provenientes do município de Campos dos Goytacazes-RJ. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos em função do diâmetro do folículo dominante no momento da indução da ovulação: G25 (indução da ovulação com folículo dominante de 25mm), G30 (indução da ovulação com folículo dominante de 30mm), G35 (indução da ovulação com folículo dominante de 35mm) e GC (acompanhamento da ovulação espontânea). Todos os animais foram inseminados com sêmen a fresco, uma única vez, 24 horas após a indução da ovulação. Os corpos lúteos formados após a ovulação induzida ou natural foram avaliados por ultrassonografia modo-B e modo Doppler durante 7 dias, medindo-se o diâmetro médio do corpo lúteo, a ecogenicidade e área de vascularização luteal. A taxa de gestação foi avaliada 12 dias após a ovulação através de ultrassonografia modo-B. O diâmetro médio do corpo lúteo formado foi maior para os grupos com maior diâmetro folicular, não havendo diferença entre G30, G35 e GC ($P>0,05$). O grupo G25 ($24,29\pm 4,07$) apresentou

maior ecogenicidade que os demais grupos (G30, $22,60 \pm 2,84$; G35, $23,67 \pm 4,61$ e GC, $22,65 \pm 2,75$) ($P < 0,05$). O GC ($2,65 \pm 0,53$) apresentou maior área de vascularização luteal que os grupos de tratamento (G25, $1,79 \pm 0,74$; G30, $1,99 \pm 0,62$ e G35, $1,97 \pm 0,72$) ($P < 0,05$). O grupo G25 (25%) apresentou diferença ($P < 0,05$) na taxa de prenhez por ovulação em relação aos demais grupos (G30, 71,43%; G35, 57,14% e GC, 66,67%). Foi encontrada correlação positiva alta entre diâmetro folicular no momento da indução e diâmetro médio do corpo lúteo; correlação negativa média entre diâmetro folicular à indução e ecogenicidade do CL e correlação positiva média entre diâmetro folicular à indução e área de vascularização do corpo lúteo. O diâmetro folicular no momento da indução da ovulação influencia significativamente os parâmetros morfofuncionais do CL de éguas da raça Pônei Brasileiro.

Palavras-chave: corpo lúteo, vascularização luteal, ultrassonografia, ultrassonografia Doppler.

Abstract

The corpus luteum (CL) is the structure responsible for the secretion of progesterone and, therefore, responsible for the initial maintenance of pregnancy in horses. There is an intimate relationship between morphological and functional characteristics, since a high correlation between vascularization and the secretory function of CL is described. The aim of the present study was to compare the diameter, echogenicity and vascular perfusion of the corpus luteum of mares of the Pônei Brasileiro mares submitted to ovulation induction with histrelin acetate in different follicular diameters. Thirty ovulation inductions and 3 natural ovulations and the respective corpus luteum formed in Pônei Brasileiro mares from the municipality of Campos dos Goytacazes-RJ were evaluated. The animals were randomly divided into 4 groups according to the diameter of the dominant follicle at the time of ovulation induction: G25 (ovulation induction with 25mm dominant follicle), G30 (ovulation induction with 30mm dominant follicle), G35 (induction of ovulation with a 35mm dominant follicle) and GC

(spontaneous ovulation monitoring). All animals were inseminated with fresh semen, only once, 24 hours after ovulation induction. The corpora lutea formed after induced or natural ovulation were evaluated by B-mode ultrasonography and Doppler mode for 7 days, measuring the average diameter of the corpus luteum, echogenicity and area of luteal vascularization. The pregnancy rate was assessed 12 days after ovulation using B-mode ultrasound. The average diameter of the formed corpus luteum was greater for groups with a larger follicular diameter, with no difference between G30, G35 and GC ($P > 0.05$). The G25 group ($24,29 \pm 4,07$) showed greater echogenicity than the other groups (G30, $22,60 \pm 2,84$; G35, $23,67 \pm 4,61$ and CG, $22,65 \pm 2,75$) ($P < 0.05$). The CG ($2,65 \pm 0,53$) showed a greater area of luteal vascularization than the treatment groups (G25, $1,79 \pm 0,74$; G30, $1,99 \pm 0,62$ and G35, $1,97 \pm 0,72$) ($P < 0.05$). The G25 group (25%) showed a difference ($P < 0.05$) in the pregnancy rate by ovulation in relation to the other groups (G30, 71,43%; G35, 57,4% and CG, 66,67%). A high positive correlation was found between follicular diameter at the time of induction and the average diameter of the corpus luteum; mean negative correlation between follicular diameter at induction and echogenicity of CL and mean positive correlation between follicular diameter at induction and vascularization area of the corpus luteum. The follicular diameter at the time of ovulation induction significantly influences the morphofunctional parameters of the CL of Brazilian Pony mares.

Keywords: corpus luteum, luteal vascularization, ultrasound, Doppler ultrasound.

Introdução

O corpo lúteo (CL) é uma estrutura dinâmica, de funcionalidade curta e transitória, de aproximadamente 14 dias, que demanda rápido desenvolvimento de um extenso sistema vascular, chegando a ser um dos tecidos mais vascularizados do corpo (GINTHER, 2007; LÜTTGENAUET et al., 2011).

Após o esvaziamento folicular, a perfusão sanguínea do corpo lúteo aumenta progressivamente até envolver praticamente toda sua circunferência no sexto dia pós-ovulação. Durante este período, a progesterona também aumenta progressivamente. Entre o 8º e o 14º dia do ciclo estral, o perfil sérico de progesterona e perfusão vascular luteal apresentam valores máximos, enquanto durante a luteólise, a vascularização do corpo lúteo diminui, fenômeno acompanhado pela diminuição na concentração de progesterona (GINTHER, 2014; ISHAK et al., 2017; GINTHER, 2019).

Estudos demonstram uma baixa correlação entre as características morfológicas e funcionais do corpo lúteo (ISHAK et al., 2017), não sendo encontradas correlações entre sua área e produção de progesterona (ARRUDA et al., 2001) ou entre seu diâmetro e alterações nos índice de pulsatilidade da artéria ovariana (BOLLWEIN et al., 2002). No entanto, é descrito uma íntima relação entre a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do corpo lúteo equino (GINTHER, 2008; CASTRO et al., 2016). Mais recentemente, foi relatada uma correlação entre o diâmetro e a vascularização do folículo pré-ovulatório com o diâmetro e a vascularização do corpo lúteo gerado, logo, quanto maior o folículo, maior e mais vascularizado seria o novo corpo lúteo (ISHAK et al., 2017).

Em equinos, o fator de necrose tumoral (TNF α) e o óxido nítrico (NO) podem estimular a produção de fatores angiogênicos (FERREIRA-DIAS et al., 2011). Estes fatores alteram a resistência vascular ovariana, promovendo maior aporte sanguíneo ao corpo lúteo em formação (BOLLWEIN et al., 2002). Diante disso, o processo de neovascularização do CL não estaria ligado às suas dimensões, já que não foram observadas correlações entre sua área e produção de progesterona (ARRUDA et al., 2001) ou entre seu diâmetro e alterações nos índice de pulsatilidade da artéria ovariana (BOLLWEIN et al., 2002). As características referentes ao folículo que sofreu a ovulação também promoveriam pouca influência sobre a

neovascularização, uma vez que não atuam na liberação dos fatores angiogênicos supracitados (FERREIRA-DIAS et al., 2011).

A ultrassonografia Doppler associada à ultrassonografia modo-B é um método relativamente recente na medicina veterinária. Ela fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos (CARVALHO et al., 2008). Por ser um método confiável e não invasivo, a ultrassonografia Doppler colorido oferece uma abordagem segura para avaliar a perfusão vascular do CL, sendo um preditor de alta confiabilidade de sua capacidade funcional (GINTHER et al., 2007; BROGAN et al., 2016).

O objetivo do presente estudo foi comparar o diâmetro médio, a ecogenicidade e a perfusão vascular do corpo lúteo de éguas da raça Pônei Brasileiro submetidas à indução da ovulação com acetato de histrelina em diferentes diâmetros foliculares.

Materiais e Métodos

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA/UENF) com o número de protocolo 402.

Animais

Foram utilizadas 20 éguas da raça Pônei Brasileiro, adultas, com idades entre 4 e 9 anos, não gestantes, pertencentes a dois criatórios do município de Campos dos Goytacazes, RJ (Latitude: -21.7545, Longitude: -41.3244 21° 45' 16" Sul, 41° 19' 28" Oeste). Os animais foram previamente avaliados, sendo utilizados somente aqueles que apresentaram-se cíclicas e sem alterações reprodutivas.

As éguas selecionadas foram alojadas no setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, sendo mantidas sob luz natural, em piquetes com alimentação

à base de feno de tyfton (*Cynodon dactylon*), sal mineral e água *ad libitum*. O experimento foi realizado durante duas estações reprodutivas, compreendendo os períodos de outubro/2018 a março/2019 e outubro a dezembro/2019.

Grupos de tratamento

Com o objetivo de comparar a influência do diâmetro do folículo dominante no momento da indução da ovulação nas características morfofuncionais do corpo lúteo formado, foram montados três grupos de tratamento com 10 animais, à medida em que o folículo dominante alcançava o diâmetro definido para a indução da ovulação em cada grupo (25, 30 ou 35mm). A indução da ovulação foi realizada pela aplicação de 0,25mg de acetado de histrelina (Strelin®; Botupharma®) por via intramuscular.

Após a indução da ovulação nos grupos de tratamento, os animais foram avaliados por ultrassonografia modo-B e modo Doppler a cada 6 horas, para observação do tempo percorrido até o momento da detecção da ovulação e avaliação das mudanças estruturais e hemodinâmicas sofridas pelo folículo pré-ovulatório antes da ovulação. Os animais que não ovularam depois de transcorridas 48 horas da indução da ovulação foram considerados não responsivos ao tratamento.

Três animais apresentando folículo dominante de 25mm foram selecionados e alocados no Grupo Controle (GC; n=3), sendo avaliados diariamente por ultrassonografia, até a observação de um folículo dominante de 35mm, para então serem submetidos a uma aplicação de 1mL de solução salina por via intramuscular.

Avaliações ultrassonográficas

As imagens ultrassonográficas foram realizadas por um único operador, com auxílio de um ultrassom portátil (Z6 VetMindray®), equipado com modo-B (escala de cinza) e Doppler

colorido, com transdutor linear multifrequencial de banda larga, utilizando frequência de 5,0 MHz. Para o modo Power Flow foi utilizado frequência de 5,3 MHz, ganho 36, filtro de parede 106 e PRF 1.0k. Todas as configurações de imagem foram padronizadas previamente e mantidas constantes durante todo o experimento.

Após a indução da ovulação nos grupos de tratamento, os animais foram avaliados a cada 6 horas, para determinar a ocorrência da ovulação. Os animais que não ovularam depois de transcorridas 48 horas da indução da ovulação foram considerados não responsivos ao tratamento, sendo, então, retirados do estudo. Os animais do GC foram avaliados a cada 6 horas a partir do momento da visualização de um folículo dominante de 35mm de diâmetro, até observação da ovulação.

A partir da detecção da ovulação, cada corpo lúteo foi avaliado utilizando ultrassonografia convencional para avaliação morfológica durante 7 dias. O diâmetro médio do corpo lúteo foi avaliado através de imagens estáticas, obtidas no ponto de diâmetro máximo, sendo mensurado através da média entre altura e largura, realizadas de forma perpendicular entre si.

Além do diâmetro, foi avaliada a ecogenicidade do corpo lúteo através da contagem de pixels, realizada pelo programa ImageJ1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD). O software foi utilizado para calcular a intensidade / área de pixel analisada. A faixa total de intensidade de pixel foi de zero a 255, onde zero foi atribuído a um pixel totalmente preto (anecóico) e 255 foi atribuído a um pixel totalmente branco (hiperecóico). Assim, três áreas de 1mm² foram selecionadas aleatoriamente em cada imagem, e obtida a média destes valores para determinar a ecogenicidade (RIBEIRO et al., 2017).

A avaliação da perfusão sanguínea do corpo lúteo foi realizada através do modo Power Flow. As imagens foram obtidas no ponto de diâmetro máximo, registrando-se três imagens da vascularização luteal (Figura 1) em cada exame, sendo estas imagens arquivadas para serem

analisadas posteriormente. Para o processamento das imagens, foi utilizado o programa ImageJ1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD), realizando a padronização da escala da imagem ultrassonográfica. A seleção da área com presença de vascularização foi feita pela ferramenta de seleção retangular. A área de seleção foi salva pela função *roi manager* e a parte externa da seleção foi apagada através da opção *clear outside*. Com o objetivo de transformar toda a área de vascularização em cor preta e as regiões não vascularizadas em cor branca, foi realizada a edição das imagens em *color threshold*, sendo que, posteriormente, o formato da imagem foi modificado de RGB para 8 bits. A imagem foi configurada para binária e avaliada pela função *analyze particles* para determinação, em mm², da área de vascularização. Para aumentar a confiabilidade, as três imagens obtidas em cada exame foram analisadas, sendo que a determinação da área de vascularização foi dada por uma média do valor obtido para as imagens de cada exame.

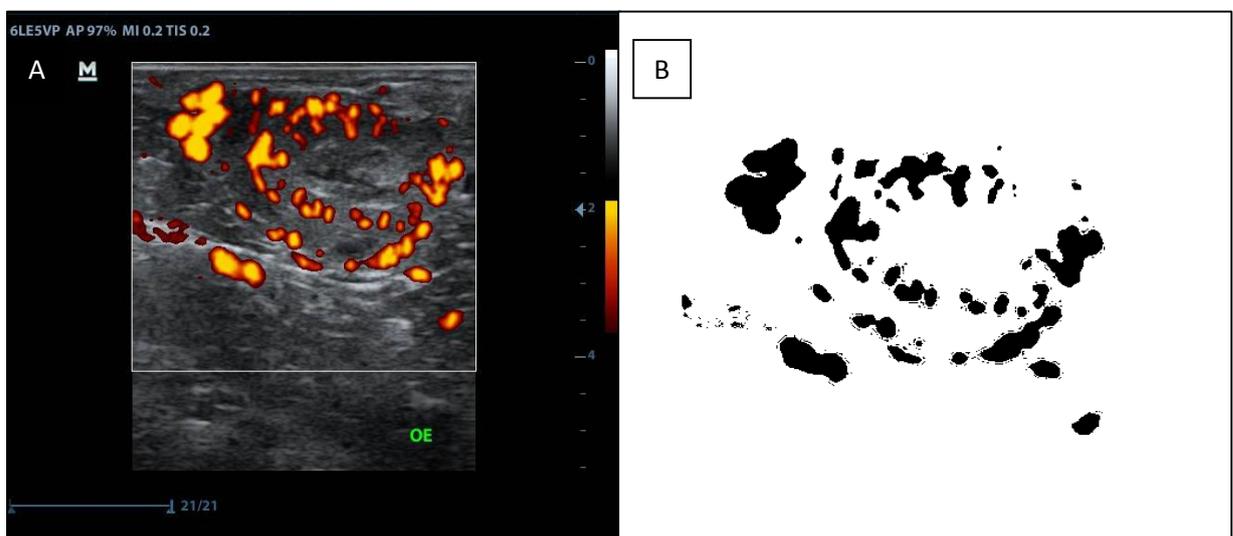


Figura 1. A- imagem ultrassonográfica modo Power flow de corpo lúteo de égua da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida por acetato de histrelina. B- imagem da vascularização luteal de égua da raça Pônei Brasileiro processada no software ImageJ para mensuração da área de vascularização.

A taxa de prenhez por ovulação foi avaliada no 12º dia após a ovulação, através de ultrassonografia convencional, por via transretal, identificando-se a vesícula embrionária.

Inseminações

As inseminações foram realizadas com sêmen a fresco de dois garanhões com fertilidade comprovada 24 horas após a indução da ovulação. Para os animais do GC, as inseminações foram realizadas a cada 48 horas, após a visualização de um folículo dominante de 35mm.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância das variáveis testando o efeito de grupo, sendo as médias comparadas através do teste SNK ao nível de 5% de probabilidade. A taxa de prenhez por ovulação foi avaliada através do teste qui-quadrado. Foi calculada correlação de Pearson para verificar a relação dos diferentes grupos com as variáveis analisadas (SAS, versão 9.4).

Resultados

Foi observada diferença na taxa de ovulação entre os grupos, sendo que o grupo G25 apresentou a menor taxa (40%), os grupos G30 e G35 apresentaram de 70% de ovulação e o GC, 100%.

Os resultados referentes às características morfológicas e vasculares do CL estão descritos na Tabela 1.

Para diâmetro médio do corpo lúteo, observou-se diferença ($P < 0,05$) nas médias entre os grupos GC, G30 e G25; G 25 e G35, sendo que o grupo G35 não se diferenciou entre G30 e GC. Em relação à ecogenicidade do corpo lúteo, o grupo G25 se diferenciou dos grupos G30, G35 e GC. Na área de vascularização luteal, o grupo GC se diferenciou dos grupos G25, G30 e G35 ($P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas dentro do mesmo grupo para nenhuma das variáveis estudadas ($P > 0,05$).

O diâmetro médio do CL apresentou correlação positiva de média magnitude (0,32) com o tamanho folicular do grupo, sugerindo que quanto maior o diâmetro folicular no momento da

indução, maior o diâmetro do CL formado. A ecogenicidade apresentou correlação negativa média com o grupo de tratamento (-0,23), enquanto a área de vascularização apresentou correlação positiva média (0,25) (Tabela 2).

Tabela 1: Média \pm desvio padrão de diâmetro médio do corpo lúteo (DM), ecogenicidade do corpo lúteo (ECO) e área de vascularização luteal (AV) de éguas da raça Pônei Brasileiro submetidas à indução de ovulação com acetato de histrelina em diferentes diâmetro foliculares.

Grupo	DM (mm)	ECO (pixels)	AV (mm ²)
G25	21,24 \pm 3,05 ^c	24,29 \pm 4,07 ^a	1,79 \pm 0,74 ^b
G30	24,41 \pm 3,30 ^b	22,60 \pm 2,84 ^b	1,99 \pm 0,62 ^b
G35	23,67 \pm 2,61 ^{ab}	21,90 \pm 2,51 ^b	1,97 \pm 0,72 ^b
GC	25,25 \pm 2,75 ^a	22,15 \pm 2,89 ^b	2,65 \pm 0,53 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam pelo teste SNK a nível de 5% de probabilidade.

Para a taxa de prenhez por ovulação, o G25 apresentou resultado mais baixo (25%), não havendo diferença entre G30, G35 e GC ($P > 0,05$), que apresentaram respectivamente valores de 71,43%, 57,14% e 66,67%.

Tabela 2: Correlação entre os grupos de tratamento com as variáveis diâmetro médio do corpo lúteo(DM), ecogenicidade do corpo lúteo (ECO) e área de vascularização luteal (AV) de éguas da raça Pônei Brasileiro com ovulação induzida com diferentes diâmetros foliculares.

Característica	Correlação
DM	0,32**
ECO	-0,23*
AV	0,25*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Discussões

O presente estudo fornece pela primeira vez informações sobre a indução da ovulação com diferentes diâmetros foliculares e seus possíveis efeitos sobre a formação do futuro CL em equinos da raça Pônei Brasileiro. Diferenças reprodutivas foram relatadas em raças miniaturas quando comparadas à raças de grande porte de equinos (GASTAL et al., 2008; GINTHER et al., 2008), porém, estudos em raças de pôneis ainda são escassos.

TARSO et al (2017) forneceram evidências de um efeito positivo do diâmetro folicular no diâmetro do CL em vacas, enquanto ISHAK et al (2017) descreveram pela primeira vez os efeitos do folículo pré-ovulatório sob características do futuro corpo lúteo em éguas. Estes autores relatam uma correlação positiva entre o diâmetro folicular e luteal, bem como posterior capacidade de produção de progesterona pelo corpo lúteo. Corroborando com estes autores, o presente estudo também encontrou correlações positivas entre o diâmetro do folículo dominante no momento da indução da ovulação e o diâmetro do corpo lúteo, uma vez que folículos menores geraram médias de diâmetro médio dos corpos lúteos inferiores, uma vez que folículos menores geraram corpos lúteos de menor diâmetro.

Folículos induzidos com 30mm também apresentaram menores médias de diâmetro médio do CL quando comparados à folículos induzidos com 35mm e que tiveram ovulação espontânea. No entanto, a redução em seu diâmetro possivelmente não afetou sua qualidade, já que a taxa de prenhez para este grupo foi satisfatória.

Segundo RODRIGUES et al (2014), o tamanho do CL não está correlacionado com sua ecogenicidade. Segundo GINTHER et al (2008), o LH atua sobre as células em processo de luteinização, estimulando sua condensação, o que aumenta a ecogenicidade do corpo lúteo. Logo após à ovulação, o espaço ocupado previamente pelo folículo é invadido por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune (SANGHA et al., 2002), células endoteliais,

células da teca interna e células da granulosa, que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia (BERTAN, 2006), dando origem ao corpo lúteo. Folículos com diâmetro de 25mm que ovularam após a indução, apresentaram menor antro folicular e, possivelmente, após o processo de luteinização, estas células tiveram um menor espaço para se arranjar, o que contribuiu para sua maior condensação e, conseqüentemente, apresentarem maior ecogenicidade.

Foi observada correlação negativa de baixa magnitude entre os grupos e a ecogenicidade do corpo lúteo. RODRIGUES et al (2014), estudando a formação do corpo lúteo em éguas de grande porte, não observaram correlações entre estas características. Mais estudos para se relacionar a influência do diâmetro folicular na ecogenicidade do corpo lúteo em éguas pôneis são necessários.

A área de vascularização do corpo lúteo correlaciona-se positivamente com sua função secretora de progesterona (GINTHER, 2014; CASTRO et al 2016; GINTHER, 2019), o que reforça a importância de corpos lúteos bem vascularizados para a manutenção da gestação.

Segundo GINTHER (2019), folículos maiores possuem maior grau de vascularização, gerando corpos lúteos também mais vascularizados. GASTAL et al (2006), relatam que a indução da ovulação interfere na vascularização do corpo lúteo, por induzir um aumento prematuro da vascularização do folículo pela liberação endógena de LH. Tal fato pode ter contribuído para que não houvesse diferença na vascularização do corpo lúteo entre os grupos de tratamento apesar de apresentarem diferente diâmetro do folículo dominante no momento da indução.

De forma interessante observamos que a indução com acetato de histrelina de folículos dominantes com diâmetro entre 30 e 35mm apesar de encurtar o crescimento do folículo ao reduzir o tempo para a ovulação, não interferiu negativamente nas taxas de prenhez. Semelhante ao encontrado neste estudo, OLIVEIRA et al (2019) observaram que em jumentas com

ovulação induzida por acetato de histrelina com folículos de 29-32mm apresentaram taxa de prenhez próximas daqueles com diâmetro entre 33-36mm.

Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que o diâmetro do folículo dominante no momento a indução da ovulação em éguas da raça Pônei Brasileiro influencia no tamanho, na ecogenicidade e na vascularização do corpo lúteo formado. Folículos dominantes com diâmetro médio a partir de 30mm são responsivos à indução da ovulação, gerando corpos lúteos com tamanho e vascularização adequados, sem comprometimento da taxa de prenhez em relação à folículos de diâmetro de 35mm, preconizados para raças de grande porte.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Aos criadores Angelo Sales da Silveira e José Maurício dos Santos Ferreira, pela disponibilização dos animais.

Comitê de Ética e Biossegurança

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA/UENF) com o número de protocolo 402.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os patrocinadores fundadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo; na coleta, análise ou interpretação de dados; na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

Contribuições dos autores

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Referências

ARRUDA, R.P. et al. Existem relações entre o tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.5, p.233-239, 2001. Available from: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962001000500007&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1590/S1413-95962001000500007.

BERTAN, C.M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.824-840, 2006. Available from: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26563>>. Accessed: Jan. 28, 2020. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26563.

BROGAN, P.T. et al. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v.166, p.22-27, 2016. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.010>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.12.010.

BOLLWEIN, H. et al. Luteal blood flow during cycle in mares. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.2043-2051, 2002. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00705-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00705-7)>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00705-7.

CARVALHO, C.F. et al. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.872-879, 2008. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008000300047&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Jan. 28, 2020. doi: dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300047.

CASTRO, T. et al. Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. **Theriogenology**, v.85, n.4, p.740-746, 2016. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.019>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.10.019.

FERREIRA-DIAS, G. et al. Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E₂ secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v.40, n.1, p.1–9, 2011. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724010000822?via%3Dihub>>.

Accessed: Jan. 28, 2020. doi: 10.1016/j.domaniend.2010.08.001.

GASTAL, E.L. et al. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v.131, p.699-709, 2006. Available from: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/131/4/1310699.xml>>.

Accessed: Jan. 28, 2020. doi: <https://doi.org/10.1530/rep.1.01011>.

GASTAL, E.L. et al. Miniature Ponies: Similarities and differences from larger breeds in follicles and hormones during the estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.9, p. 508-517, 2008. Available from: <<https://www.researchgate.net/publication/248869037>>.

Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/j.jevs.2008.07.021.

GINTHER, O.J. et al. Effect of prostaglandin F₂alpha on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.315-328, 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.04.006>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/j.domaniend.2006.04.006.

GINTHER, O.J. et al. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after

luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, n.6 p. 684-693, 2008. Available from: <<https://doi.org/10.1071/RD08077>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1071/rd08077.

GINTHER, O.J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v.81, n.1, p.112-125, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.007>>. Accessed: Jan. 23, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.007.

GINTHER, O.J. Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus luteum in monovulatory heifers, mares, and women. **Theriogenology**, v.128, p.31-39, 2019. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.019>>. Accessed: Jan. 23, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.019.

ISHAK, G.M. et al. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, bloodflow, and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v.187, p.1-12, 2017. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.09.003>>. Accessed: Jan. 17, 2020. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.09.003.

LÜTTGENAU, J. et al. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.125, n.1-4, p.20-29, 2011. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.002>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.002.

OLIVEIRA, S.N. et al. Histrelin acetate-induced ovulation in Brazilian Northeastern jennies (*Equus asinus*) with different follicle diameters. **Theriogenology**, v.136, p.95-100, 2019. Available from: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18310471?via%3Dihub>>.

Accessed: Jan. 29, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.037.

RODRIGUES, T.G. et al. Uso da eCG para formação do corpo lúteo equino e produção de progesterona. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v.5, n.1, p.56-70, 2014. Available from: <<https://www.actabiomedica.com.br/index.php/acta/article/view/78/51>>. Accessed: Jan. 22, 2020.

RIBEIRO, M.S. et al. Biometry and ultrasound evaluation of testicles and accessory glands in Santa Ines rams. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.46, n.4, p.317-323, 2017. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982017000400317&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Jan. 17, 2020. doi: dx.doi.org/10.1590/s1806-92902017000400007.

SANGHA, G.K. et al. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.43, p.53-64, 2002. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/248444523_Biology_of_corpus_luteum_in_small_ruminants>. Accessed: Jan. 28, 2020

TARSO, S.G.S. et al. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p.448-457, 2017. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1071/RD15223>>. Accessed: Jan. 22, 2020. doi: 10.1071/RD15223.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu-nos concluir que a indução da ovulação em éguas da raça Pônei Brasileiro pode ser realizada com sucesso utilizando folículos de 30mm de diâmetro, com taxas de ovulação satisfatórias.

Apesar das divergências encontradas em suas características morfológicas, a qualidade do CL não foi influenciada quando utilizados folículos do diâmetro supracitado para indução da ovulação, uma vez que estes produziram taxa de prenhez satisfatória. No entanto, estudos envolvendo dosagens de progesterona ainda se fazem necessários para confirmar esta suposição.

Baseados em estudos anteriores, corroboramos com a afirmativa de que diversas diferenças reprodutivas são observadas entre equinos miniatura e raças de grande porte. No entanto, estudos sobre tais particularidades ainda são escassos na literatura, fazendo-se necessários mais estudos à respeito da reprodução de equinos miniatura, como a raça Pônei Brasileiro.