

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS SUBMETIDAS A UM
PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE OVULAÇÃO CONTENDO
PROGESTERONA E ECG**

ANA CAROLINA BAHIA TEIXEIRA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG

2020

ANA CAROLINA BAHIA TEIXEIRA

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS SUBMETIDAS A UM
PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE OVULAÇÃO CONTENDO
PROGESTERONA E ECG**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Medicina Veterinária/Ciência Animal em Belo Horizonte, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Orientador^a: Letícia Zoccolaro Oliveira

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

***Ficha catalográfica

T266c Teixeira, Ana Carolina Bahia, 1995-
Características reprodutivas de éguas submetidas a um protocolo de indução de ovulação contendo progesterona e ECG /Ana Carolina Bahia Teixeira – 2020.

71p.: il.

Orientadora: Leticia Zoccolaro Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Éguas - Reprodução - Teses - 2 – Inseminação artificial - Teses - 3 – Reprodução animal - Teses -
I - Oliveira, Leticia Zoccolaro – II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária –
III – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINA BAHIA TEIXEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Reprodução Animal.

Aprovado(a) em 03 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Dr.(a). Leticia Zoccolaro Oliveira
Presidente - Orientador(a)

Prof(a). Dr.(a). Guilherme Ribeiro do Valle

Prof(a). Dr.(a). Marc Roger Jean Marie Henry



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir alcançar os objetivos propostos ao longo desta caminhada. A professora e orientadora Letícia Zoccolaro Oliveira pela orientação, apoio e confiança, se tornando além de mestre exemplo como profissional e ser humano. Agradeço sobretudo pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Um agradecimento especial a todos os professores e funcionários que me acompanharam durante o mestrado, que me ensinaram não apenas o conhecimento racional, mas a manifestação do caráter e afetividade, e à CAPES, por me conceder a bolsa de estudo.

Agradeço também a fazenda experimental PUC Minas, em nome principalmente do professor Guilherme Ribeiro Valle e Médico Veterinário Fabrício Alves Rezende, por todo suporte com os animais utilizados durante a execução do projeto. A Fabíola de Oliveira Paes Leme do laboratório de Patologia Clínica da UFMG por colaborar nas análises das pesquisas, além de todos os estagiários e amigos que me auxiliaram nesta caminhada.

Um Agradecimento sincero e muito especial a toda minha família, principalmente meus pais, Rogério e Denise, junto a minha irmã Mariana, que incentivaram nos dias difíceis e me fizeram acreditar nos meus sonhos. Ao meu namorado, José Andrés, que participou diretamente do projeto, me dando forças e auxílio no dia a dia, tornando não só meu ponto de apoio no processo experimental, mas meu parceiro de vida.

Enfim, a todos pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

*Conheço pessoas de ação que sempre serão de ação. Sabem por quê?
Eu lhes direi por quê. Porque sempre terminam aquilo que começam.
(autor desconhecido)*

Resumo

Medicamentos que objetivam induzir e sincronizar as ovulações são usualmente utilizados em éguas destinadas a inseminação artificial, doação ou recepção de embriões. Neste sentido, a progesterona (P4), por várias vias de administração são úteis para a sincronização do estro. Em bovinos, a administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) nos protocolos de P4 intravaginal tem sido recomendada pela ação no desenvolvimento dos folículos de vacas em anestro, melhorando o tamanho do folículo ovulatório (FO), área do corpo luteo (CL) e a taxa de gestação das mesmas. Em éguas, a ovulação fora da estação reprodutiva pode ocasionar regressão luteal precoce (RPCL), reduzindo desempenho reprodutivo. Podem estar relacionadas a RPCL a ovulação de folículos menores e/ou a deficiência na secreção de esteroides pelo folículo ovulatório (FO). Embora utilizada na reprodução de equinos em protocolos de superovulação, poucos trabalhos investigaram o efeito da eCG associado a indutores de ovulação (GnRH ou LH) nas características ovulatórias, o que poderia ser interessante principalmente para éguas fora da estação de reprodutiva. Nossa hipótese é que a sincronização ovulatória com implante intravaginal de P4 associada ao eCG possa melhorar o tamanho do folículo ovulatório (proporcionando maior produção de E2 pelo mesmo) e a qualidade do CL posteriormente formado (relacionando-se a uma maior produção de P4 pelo mesmo). Assim, este estudo tem por objetivo acompanhar o desenvolvimento folicular e avaliar o momento da ovulação, características do FO e do CL, bem como níveis séricos de P4 e E2, comparando a eficácia de dois protocolos de sincronização da ovulação a base de P4 intravaginal, associada ou não ao eCG, em éguas sincronizadas no período de transição estacional (ET) e durante a estação reprodutiva (ER). Foram utilizadas 15 éguas entre 03 e 08 anos de idade, mestiças, em boas condições corporais. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo hormonal a base de 1,9 g de P4 intravaginal (1,9 g; CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil), com o hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) como indutor de ovulação (1.750 UI; 0,7 ml; i.v.; Vetecor®, Hertape, Juatuba, Brasil) durante o período de transição estacional (primavera; período de irregularidade na ciclicidade) e durante a estação reprodutiva (verão; período de ciclicidade regular). Metade dos animais receberam aplicação intramuscular de 400 UI (2ml; i.m.; Novormon®, Zoetis, São Paulo Brasil) de eCG (grupo eCG) no momento da retirada do implante de P4 enquanto a outra metade recebeu aplicação i.m. de 2 ml de solução salina (grupo controle). Os dados foram comparados por análise de variância (teste de tukey) considerando $P < 0,05$. No presente

experimento foi observada a ovulação em 83% dos animais avaliados. Para taxa de ovulação, foi observada diferença estatística entre as estações do ano (ET: 67% dos animais e ER: 100% dos animais; $P=0,0042$) não sendo observada, porém, diferença entre os grupos controle e eCG (Controle: 79% dos animais e eCG 87,5%). Houve interação ($P=0,0016$) entre estação do ano e tratamento, para o diâmetro do folículo ovulatório, de modo que os animais que receberam eCG na ER ($33,00 \pm 2,53$ mm) apresentaram menor ($P=0,0161$) diâmetro folicular que os da ET ($37,13 \pm 1,76$ mm) e menor ($P=0,0193$) diâmetro folicular que os animais controle da ER ($36,56 \pm 2,03$ mm). Com relação ao diâmetro do CL aferido aos 13 dias após ovulação, seu diâmetro médio foi maior ($P=0,0516$) nas éguas que receberam eCG na ET ($26,60 \pm 4,44$ mm) em comparação as éguas que receberam eCG na ER ($22,99 \pm 2,26$ mm). Adicionalmente, houve tendência ($P=0,0814$) para maior CL de 13 dias de animais que receberam eCG na ET ($26,60 \pm 4,44$ mm) em comparação aos animais que não receberam eCG (Controle) dessa mesma estação ($22,78 \pm 3,82$ mm). Foi observada ainda tendência estatística para regressão luteal mais tardia ($P=0,0625$) nos animais que receberam eCG e se encontravam na ET ($13,99 \pm 1,63$ dias) em comparação aos animais que receberam eCG e se encontravam na ER ($12,62 \pm 0,52$ dias) Adicionalmente, foi observada tendência estatística ($P=0,0996$) para maior quantidade de P4 aos 13 dias após a ovulação nos animais da ER ($5,84 \pm 0,56$ ng/mL) em comparação aos animais da ET ($4,29 \pm 0,63$ ng/mL), sugerindo maior manutenção luteal nos animais durante o verão. A aplicação de eCG no momento da retirada do implante de progesterona atrasou o momento da regressão luteal das éguas no período de transição, porém, sua aplicação não se apresentou benéfica para as éguas da estação reprodutiva.

Palavras-chave: égua, eCG, corpo lúteo, fertilidade.

Abstract

Hormones aiming to induce and synchronize ovulations are usually used in mares intended for artificial insemination, donation or embryo reception. In this sense, progesterone (P4) by various routes of administration is useful for estrus synchronization. In cattle, the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) in intravaginal P4 protocols has been recommended for action on the development of anestrous cow follicles, improving ovulatory follicle area (FO), luteo body area (CL) and pregnancy rate. In mares, out-of-season ovulation can lead to early luteal regression (LRPR), reducing reproductive performance. RPCL may be related to ovulation of smaller follicles and/or deficiency in steroid secretion by FO. Although used in equine breeding in superovulation protocols, few studies have investigated the effect of ovulation inducers (GnRH or LH) corrected eCG on ovulatory characteristics, which could be of interest especially to mares outside that breeding season. Our hypothesis is that ovulatory synchronization with intravaginal P4 implantation associated with eCG may improve ovulatory follicle size (providing higher E2 production by it) and the quality of the subsequently formed CL (relating to higher P4 production by it). Thus, this study aims to monitor follicular development and evaluate ovulation time, FO and CL characteristics, as well as serum E2 and P4 levels, comparing the efficacy of two intravaginal P4-based ovulation synchronization protocols associated or not to eCG, in mares synchronized during the transitional season and during the breeding season. Fifteen mares between 03 and 08 years of age, crossbred, in good body condition were used. All animals were submitted to the same hormonal protocol based on 1.9g intravaginal P4 (1,9 g; CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil) with an ovulation inducer (hCG; 1.750 UI (0,7 ml) Gonadotrofina Coriônica Humana; i.v.; Vetecor®, Hertape, Juatuba, Brasil) during the reproductive season (summer; period of regular cycling). Half of animals received intramuscular application of 400 UI (2ml; i.m.; Novormon®, Zoetis, São Paulo Brasil) de eCG (eCG group) while the other half received i.m. 2 ml of saline solution (control group). Data were compared by analysis of variance (tukey test) considering $P < 0.05$. In the presente experimente ovulation was observed in 83% of the evaluated animals (ET: 67% of the animals e ER: 100% of the animals). For ovulation rate, a statistical difference was observed between the seasons ($P=0.0042$), but no difference was observed between the control and eCG groups. (Controle: 79% dos animais e eCG 87,5%). There was still interection ($P=0.0016$) between season and treatment for ovulatory follicle diameter. In relation to the animals

that received eCG in the RE ($33,00 \pm 2,53$ mm) they had smaller ($P=0.0161$) follicular diameter than those of ET ($37.13 \pm 1,76$ mm) and smaller ($P=0,0193$) follicular diameter than the animals control the RE ($36.56 \pm 2,03$ mm). Suggesting that the application of eCG negatively affected the FO diameter in mares during RE. ($26,60 \pm 4,44$) Regarding the 13-day CL, its mean diameter was larger ($P=0.0516$) in mares that received eCG in RE ($22,99 \pm 2,26$). Additionally, there was a trend ($P=0.0814$) for a higher 13-day CL of animals receiving eCG in ET ($26,60 \pm 4,44$) compared to animals not receiving eCG (control) from that same season ($22,78 \pm 3,82$). There was also a statistical tendency for later luteal regression ($P=0.0625$) in animals receiving eCG and in ET compared to animals receiving eCG in RE. In addition, a statistical tendency ($P=0.0996$) was observed for a higher amount of P4 at 13 days after ovulation in RE animals (5.84 ± 0.56 ng/ml) compared to ET animals (4.29 ± 0.63 ng/ml), suggesting greater luteal maintenance in animals during the summer. The application of eCG at the time of progesterone implant withdrawal delayed the time of luteal regression of the mares in the transition period, but its application was not beneficial to the mares of the reproductive season.

Key words: mares, eCG, Corpus luteum, fertility.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 01	Taxa de ovulação (%) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição primaveril. Belo Horizonte, 2020.....	38
TABELA 02	Taxa de crescimento folicular (mm) antes da utilização do implante de P4 de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	39
TABELA 03	Taxa de crescimento folicular (mm) após a utilização do implante de P4 de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	39
TABELA 04	Número de horas desde o momento da indução com hCG até a ovulação detectada por ultrassonografia e número de dias desde a remoção do implante até a ovulação, de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET). Belo Horizonte, 2020.....	41
TABELA 05	Diâmetro médio (\pm erro padrão) do folículo dominante observado em diferentes momentos do protocolo hormonal	

	(dia 0=D0; dia 5=D5; dia 10=D10) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET). Belo Horizonte, 2020.....	43
TABELA 06	Diâmetro médio (\pm erro padrão) do folículo dominante observado no dia da aplicação do indutor de ovulação (hCG) e no dia da ovulação em éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET). Belo Horizonte, 2020.....	43
TABELA 07	Concentração sérica de estradiol (ng/mL) no dia da remoção do implante intravaginal de progesterona (P4; dia 10 do protocolo) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	45
TABELA 08	Concentração sérica de estradiol (E2; ng/mL) no dia da indução da ovulação com hCG (folículo dominante > 35 mm) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	45
TABELA 09	Diâmetro médio (\pm erro padrão) do corpo lúteo (CL) observado em diferentes momentos após a ovulação (dia 5=CL 5 dias e dia 9= CL 9 dias) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4;	

	1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET). Belo Horizonte, 2020.....	46
TABELA 10	Diâmetro médio (\pm erro padrão) do corpo lúteo (CL) observado aos 13 dias após a ovulação (CL de 13 dias) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET). Belo Horizonte, 2020.....	46
TABELA 11	Dia da regressão estrutural do corpo lúteo de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de 1,9g de progesterona na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	48
TABELA 12	Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia do início (D0) do protocolo de sincronização do estro com implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	50
TABELA 13	Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia 5 (D5) do protocolo de sincronização do estro com implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	50
TABELA 14	Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia da remoção do implante intravaginal de 1,9g de progesterona (D10) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	51

TABELA 15	Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia da indução da ovulação com hCG (folículo > 35 mm) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	52
TABELA 16	Concentração sérica (ng/mL) de progesterona aos 9 dias após a ovulação de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	54
TABELA 17	Concentração sérica (ng/mL) de progesterona aos 13 dias após a ovulação de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Animais utilizados em ambas as fases experimentais	32
FIGURA 02	Desenho do estudo.....	33
FIGURA 03	Materiais utilizados para realização dos protocolos hormonais	34
FIGURA 04	Acompanhamento folicular diário.....	36
FIGURA 05	Amostras obtidas realização das dosagens hormonais.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang1	Angiopietina 1
CL	Corpo Lúteo
E2	Estrógeno
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FO	Folículo Ovulatório
FSH	Hormônio folículo estimulante
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
LH	Hormônio luteinizante
P4	Progesterona
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGF2 α	Prostaglandina F2alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGFA	Fator de crescimento endotelial A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Eixo hipotálamo- hipofisário gonadal em equinos.....	19
2.2	Ciclo Estral Equino.....	22
2.3	Formação dos cálices endometriais.....	25
2.4	Características Farmacodinâmicas da eCG.....	27
2.5	Controle da sazonalidade reprodutiva: Progesterona.....	28
3.0	OBJETIVOS	30
4.0	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Animais.....	31
4.2	Desenho do estudo.....	32
4.3	Protocolo hormonal e doses utilizadas.....	34
4.4	Acompanhamento ultrassonográfico do desenvolvimento folicular.....	34
4.5	Coleta de sangue para dosagem de estrógeno e progesterona por Quimioluminescência.....	36
4.6	Análise estatística.....	37
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7.0	CONCLUSÃO.....	57
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9.0	ANEXO.....	70

1. Introdução

A fêmea equina apresenta inúmeros ciclos estrais durante um período reprodutivo específico. Esse período compreende determinadas épocas do ano, quando a atividade reprodutiva é influenciada, principalmente, pelo fotoperíodo, por fatores nutricionais e por fatores climáticos, caracterizando esta espécie como poliéstrica estacional (Samper, 2008).

A indução controlada da ovulação é um procedimento rotineiro em casos onde se pretende reduzir o número de montas ou inseminações artificiais (IA), melhor aproveitamento do garanhão ou sêmen, redução de gastos, conservar a integridade da égua e/ou ainda, evitar problemas reprodutivos para a mesma. Portanto, induzir e/ou sincronizar as ovulações permite que se planeje e agende avaliações reprodutivas, reduzindo mão-de-obra e tempo para obtenção de sucesso na aplicação de biotécnicas reprodutivas (Klug; Jochle; Melo et al., 2012).

Medicamentos que objetivam induzir e sincronizar as ovulações são usualmente utilizados em éguas que se prestam à IA, doação de embriões ou de oócitos. Neste sentido, a progesterona (P4), por várias vias de administração, usada isoladamente ou seguida de prostaglandina (PGF2 α ou seus análogos) são úteis para a sincronização do estro (Greco, 2010). A utilização de P4 permite ainda, iniciar mais precocemente a estação de monta, reduzir o número de serviços por ciclo reprodutivo e facilita a aplicabilidade de biotécnicas reprodutivas (Schutzer, 2012)

Além da P4, outros hormônios podem ser utilizados no intuito de melhorar a fertilidade dos animais domésticos. Em bovinos, a administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) nos protocolos de IATF, em vacas lactantes acíclicas tratadas com P4 ou outros progestágenos, tem sido recomendada pela ação de FSH e, principalmente LH no desenvolvimento dos folículos de vacas em anestro (Ereno et al., 2007; Campos et al., 2013; Barreiros et al., 2014).

Neste sentido, Baruselli et al. (2004) encontraram maior taxa de gestação com uso de eCG em vacas Nelore lactantes e acíclicas tratadas com implante de progesterona, quando comparada com vacas de mesma categoria que não receberam o eCG. Em ovelhas, quando aplicada no âmbito de tratamentos progestagénios e/ou com PGF2 α a eCG gera uma melhora na resposta ovariana aumentando as taxas de fertilidade e prolificidade, onde, aparentemente gera uma compensação dos efeitos negativos que os tratamentos progestagénicos longos realizam sobre a dinâmica folicular (Dias, 2011).

Como a função luteal reflete diretamente nas taxas reprodutivas, os mecanismos que estão envolvidos na formação, secreção e regressão do corpo lúteo (CL) são alvos de estudos. Em éguas, a ovulação fora da estação reprodutiva pode ocasionar o fenômeno da regressão luteal precoce (RPCL), reduzindo o desempenho reprodutivo (Arbeiter et al., 1994). Em revisão realizada por Sá Filho e Vasconcelos (2008), foi abordada como outra possível causa da RPCL a deficiência na secreção de esteroides pelo folículo pré-ovulatório de ruminantes.

As causas de RPCL em pequenos ruminantes ainda não estão totalmente compreendidas, porém é considerada como uma das principais razões de subfertilidade nos mesmos, ocorrendo de forma natural em períodos transicionais de condições de anestro para a ciclicidade (Christensen et al., 2014). Na literatura alguns fatores são citados como possíveis causas da RPCL, sendo eles: A superestimulação, onde se observa folículos persistentes, causando elevadas concentrações de E2 durante o início da fase luteal (Okada et al., 2000); um inadequado suporte gonadotrófico no período de desenvolvimento folicular ou do CL, assim como maior sensibilidade do mesmo a substâncias luteolíticas, ou a sua ineficiência em responder as gonadotrofinas (Braden et al., 1989); além de ovulação de folículo de menor diâmetro (Sá Filho e Vasconcelos, 2008). Os efeitos luteotrópicos do eCG são citados em ovelhas reduzindo as perdas embrionárias e elevando a taxa de fertilidade, principalmente em associação ao hCG, com o intuito de melhor aproveitar os efeitos FSH (do eCG), melhorando taxas ovulatórias e LH (do hCG), possibilitando melhor sobrevivência embrionária (Khan et al., 2003 e Dias, 2011).

Poucos são os relatos da literatura referentes a eficácia e efeitos da utilização de implantes intravaginais de P4 em equinos. Adicionalmente, a inclusão de gonadotrofina coriônica equina (eCG) nos protocolos hormonais a base de P4 em equinos, bem como seus efeitos no tamanho do folículo ovulatório, qualidade do CL formado e produção de hormônios ainda não foram avaliados. Desta forma, surge a hipótese de que sincronização ovulatória com implante intravaginal de progesterona associada ao eCG possa melhorar o tamanho do folículo ovulatório e a qualidade do CL posteriormente formado (garantindo maior produção de progesterona pelo mesmo) reduzindo, eventualmente, a incidência de RPCL. A melhora dessas características reprodutivas está positivamente relacionada com melhora do ambiente uterino e fertilidade de fêmeas domésticas.

Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo realizar o acompanhamento folicular, assim como as características do folículo ovulatório e consequente CL formado,

além da realização de dosagens hormonais de E2 e P4 de éguas submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação associado ou não ao eCG, em dois períodos distintos: reprodutivo e de transição.

2. Revisão de literatura

2.1. Eixo hipotálamo- hipofisário gonadal em equinos

Os organismos são capazes de expressar respostas adaptadas de forma antecipada a mudanças ambientais, sendo que o principal sinal de adaptação estacional é o fotoperíodo. A informação do fotoperíodo em mamíferos, têm relação com a secreção do hormônio melatonina pela glândula pineal, tendo pico produtivo noturno. Este atua no sistema neuroendócrino, gerando mudanças endócrinas, anatômicas e fisiológicas que geram consequências no comportamento, balanço energético e o no sistema reprodutivo (Morgan & Hazlerigg, 2008).

A melatonina é um hormônio produzido na glândula pineal, que influencia negativamente os níveis de GnRH nos equinos, este fato é possível através de uma complexa rede de neurônios que envolvem neurotransmissores e células alvo que estão localizadas no hipotálamo (Malpaux et al., 1996). Os estímulos que controlam sua produção, tem início no nervo óptico, na fase escura do dia. Sendo assim, a produção de melatonina ocorre concomitantemente com a redução na produção das gonadotrofinas, fato que ocorre no período final de verão e início de outono, quando a luminosidade diária reduz gradativamente até o inverno. A redução da atividade folicular e ausência de ovulações são observadas. Posteriormente, o aumento nos níveis de GnRH, LH e FSH e atividade ovariana são aumentadas quando o final do inverno e início da primavera se aproximam, gerando um aumento no período de luminosidade (Bergfelt, 2009).

A inibição da síntese da melatonina, gera um estímulo positivo das atividades hipotalâmicas. Sendo assim, a conversão dos sinais neurológicos e estímulos externos e internos em descargas hormonais é realizada pelo hipotálamo. Um de seus produtos o GnRH, é um composto peptídico com 10 aminoácidos, armazenado na eminência média até o momento em que é visualizado uma despolarização neuronal fazendo com que o hormônio seja capaz de entrar nos capilares fenestrados e chegue até a hipófise via vasos do sistema porta (Hart et al., 1984).

Sabendo que o ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente por hormônios hipotalâmicos, gonadotrofinas e esteroides secretados pelo ovário, o GnRH se tornou bastante conhecido por sua influência. Este além da sua secreção pelo hipotálamo, pelo sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, estimula a liberação das gonadotrofinas FSH e LH, quem atuam sob os ovários para que haja estímulo de desenvolvimento folicular, ovulação e síntese dos hormônios esteroides na fêmea (Constanzo, 1999).

O hipotálamo se liga a hipófise, permitindo que quantidades mínimas de hormônios exerçam ações diretamente nas células da hipófise anterior, antes de se diluírem na circulação sistêmica. Hormônios da hipófise dos lobos anteriores e posteriores são liberados dentro dos vasos sanguíneos. Assim sendo, os hormônios primários da reprodução liberados do lobo anterior da hipófise são hormônios do folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e a prolactina. E a ocitocina é liberada do lobo posterior da hipófise (Senger, 2003).

Os receptores de GnRH geram estímulos para as células endócrinas da hipófise anterior dando início a produção das gonadotrofinas hipofisárias FSH e LH. Estes, por sua vez, são compostos glicoproteicos, que possuem o mesmo peso molecular e duas subunidades diferenciais, chamadas de α e β . A primeira sendo específica para cada espécie, sendo essencialmente igual em todos os hormônios hipofisários, já a segunda, proporciona a cada substância sua função biológica específica (Mckinnon & Voss, 1993).

Das gonadotrofinas hipofisárias, depende o ciclo funcional do ovário, sendo assim a remoção da hipófise causa redução da fertilidade, gerando um estágio juvenil nos ovários (Mckinnon & Voss, 1993). Sob ação do FSH, as células da granulosa se multiplicam através de mitose, aumentando o número de camadas do ovócito e quantidade de fluido por ele produzido. Já o LH oferece estímulos as células da teca interna e folículos terciários produzindo andrógenos, e quando o FSH estimula a ativação da aromatase nas células da granulosa, possibilita então a transformação de andrógenos em estradiol. Além deste fator, o FSH é citado como aumentando a vascularização do folículo dominante, gerando a possibilidade de uma melhor nutrição, sendo que outra função é o estímulo gerado para a formação do antro e a expressão de receptores de LH vistos nas células da granulosa do folículo dominante (Hafez, 2004). A secreção das gonadotropinas hipofisárias então, é controlada pelo GnRH hipotalâmico, seguindo a uma modulação feedback negativa por parte dos esteróides gonadais (P4 e E2). A secreção basal das gonadotropinas acontece de forma pulsátil e um pico massivo de LH durante o estro, a

interrompe. Esse pico de LH é realizado por um pico de GnRH hipotalâmico, causado por um aumento na liberação de 17β estradiol durante o proestro (feedback positivo) (González, 2002).

Já a função de reiniciar a meiose no folículo dominante que se une a receptores de membrana nas células da teca a granulosa para proporcionar a ovulação, fazendo o controle e manutenção do CL, é do LH. É relatado que há um aumento de AMPc através da enzima Adenil ciclase, que gera a conversão do colesterol em pregnolona que participa do processo de ovulação. Outro fator, é que o LH nas éguas tem uma maior concentração de carboidratos, assim como de ácido siálico, em comparação a outras espécies (Ginther, 1992).

De acordo com Leitão (2009) vários fatores de crescimento produzidos pelas células dos folículos como a ativina, EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), TGF- α (Transforming Growth Factor-alfa), TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) e IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), modulam a ação das gonadotrofinas FSH e LH, controlando a foliculogênese, esteroidogênese e atresia folicular.

Além destes hormônios, os chamados gonadais têm sua origem nas gônadas. Estes afetam a função do hipotálamo, do lobo anterior da hipófise e os tecidos no processo reprodutivo. Nas fêmeas, o ovário produz estrógenos, progesterona, inibina, testosterona, ocitocina e relaxina (Senger, 2003). Os esteróides gonadais controlam os caracteres sexuais secundários e também fazem feedback com o sistema nervoso, onde influenciam o comportamento sexual e modulam a secreção de GnRH e gonadotrofinas (Sisk & Foster, 2004). A inibina por exemplo têm sua função de diminuição da síntese e a liberação de FSH. Gera um efeito na secreção do hormônio folículo estimulante que é lento, porém a redução na síntese do mesmo sofre ação rápida. Na literatura Donadeu & Ginther (2002) relatam um aumento considerável na concentração de inibina nos folículos maiores entre 16 e 19mm sendo indicativo a participação no desvio folicular e no subsequente crescimento diferencial do folículo dominante. Além dela o estradiol gera um aumento da atividade da enzima aromatase nas células da granulosa, promovendo a expressão de receptores de gonadotrofinas, aumentando a sensibilidade do folículo ao LH (Gurgel et al. 2008), dentre outros.

Já em relação a maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, são considerados vários períodos na vida do animal: período fetal, período infantil, período pré-pubere, puberdade e período pós-pubere. O eixo é ativado durante a vida do feto e no

início da vida infantil, porém permanece em dormência durante a fase juvenil, sendo reativado gradualmente no período pré-pubere em ovelhas, éguas, ratos e humanos (Foster, 1981). Relatos em seres humanos sobre o período inativo da fase juvenil discutem que a mesma ocorre devido, ao feedback negativo que é dependente das gonadotrofinas, que se encontram reduzidas em indivíduos recém-nascidos e pré-puberes. Pouco antes da puberdade, a inibição intrínseca do SNC deixa de existir parcialmente devido à menor sensibilidade ao feedback negativo da GnRH (Hall, 2003).

2.2 Ciclo Estral Equino

As éguas são animais poliéstricos sazonais cujos ciclos duram em média 22 dias. O ciclo estral equino pode ser observado relatando duas fases importantes: o estro e o diestro (Sharp, 1980). Na fase estral é observada uma receptividade ao garanhão, fato que se deve ao estrógeno circulante (Clayton et al., 1981), o mesmo é secretado pelas células da granulosa presentes no folículo. A ovulação marca o final da fase estrogênica, que tem sua duração em média sete dias, podendo durar de dois a 14 dias. O esclarecimento a respeito dos mecanismos que envolvem o desenvolvimento folicular, assim como os fatores que levam a seleção do folículo dominante são necessários para que haja a manipulação do ciclo estral, gerando a possibilidade da aplicação das biotecnologias reprodutivas. O conjunto de fenômenos foliculares, que obedecem a sequência de: recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia é denominado ‘onda folicular’ (Chinait et al., 2008), onde na égua existem dois padrões típicos para este evento. A primeira denominada de onda folicular maior, caracterizada por folículos dominantes e subordinados e a segunda onda folicular menor, onde não se pode atingir o tamanho de um folículo dominante pelo maior folículo existente (Ginther, 2000). As ondas maiores são ainda divididas em: ondas primárias, onde o folículo dominante se desenvolve e têm sua ovulação possibilitada durante a fase estral e as ondas secundárias, onde o folículo dominante não chega a ovulação, ou têm sua ovulação posterior a onda primária e o estro, sendo relatada na literatura como ovulação de diestro (Ginther, 2000). Segundo Ginther et al. (2003) foi relatado que os maiores folículos das ondas menores alcançam um diâmetro característico ao desvio folicular, cerca de 22,8 mm, porém posteriormente, param de crescer. Já em relação as concentrações de LH, no início do desvio estas foram maiores no momento correspondente as ondas maiores, do que no mesmo período das ondas menores, sendo assim, é possível concluir que o folículo dominante originado,

necessita de um estímulo adicional do LH na fase inicial do desvio folicular, além de que, é possível que o LH forneça o estímulo para que haja a conversão de uma onda menor em uma onda folicular maior (Ginther et al., 2003)

A seguinte fase ou fase luteal também conhecida como diestro, possui um período mais definido de 15 dias em média. Sendo característica a presença de um corpo lúteo (Mccue, 2003). O ovócito é então liberado e é produzido a P4. Em suma, a duração média do estro, diestro e do ciclo estral é de respectivamente 7, 15 e 22 dias nas éguas (Ginther, 1992). O CL é uma glândula endócrina transitória, que tem responsabilidade principalmente pela síntese de P4, necessária para a manutenção da prenhez em mamíferos (Niswender et al., 2000).

Em éguas a luteogênese requer um surgimento maciço de vasos sanguíneos durante os primeiros três dias após a ovulação, por outro lado, a regressão do CL é seguida de uma degradação progressiva de sua vasculatura entre os dias 13 e 16 do ciclo estral (Ginther, 1992). Diferentemente das outras espécies, nas éguas o CL se encontra totalmente no estroma ovariano, onde se localiza a fossa de ovulação, tendo em conta que sua morfologia pode ser descrita como normal ou cavitária, fator que não interfere na produção de P4, além destes fatores é citado como um órgão altamente vascularizado, que demanda a maior taxa de fluxo sanguíneo no corpo das fêmeas (Redmer; Reynolds, 1996). Em relação a sua formação, após a ruptura folicular, é observada a degradação da membrana basal, sendo um fator importante envolvido na angiogênese luteal. Após este processo inicial, ocorre a invasão das células vascularizadas da teca nas células avasculares da granulosa, a migração de células imunes, como por exemplo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, as células endoteliais se proliferam, assim como periócitos, fibroblastos e formação dos brotos vasculares do CL derivados de vasos já existentes das células foliculares da teca (Mongiat et al., 2016). Alguns fatores angiogênicos regulam a angiogênese luteal. Destes, os fatores pró-angiogênicos produzidos pelo CL são destacados, dentre eles: fator de crescimento endotelial A (VEGFA), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e angiopoietina 1 (Ang1) (Müller; Ellenberger; Schoon, 2009). Após a ovulação é observada a formação de uma estrutura repleta de sangue, transudato, células do sistema imune e linfa que possibilita a formação de um coágulo, sendo denominada corpo hemorrágico, este por sua vez tem sua importância relatada na migração de células endoteliais, estabelecendo então a angiogênese luteal (Furukawa et al., 2007). Nos equinos, a vascularização e luteinização do CL, então completas entre 3 a 5 dias

posteriores a ovulação, onde, a medida que o CL amadurece, é visualizado um aumento no diâmetro das células luteais, núcleos vesiculados além de vacúolos finos no citoplasma, sendo relacionados com uma maior proliferação celular, além de maior produção de P4 (Bergfelt; Adams, 2011).

É observado o término da fase luteal quando há uma regressão do corpo lúteo, ou luteólise, que tem seu início através da liberação de prostaglandina pelo endométrio equino, a qual é carregada até o ovário mediante a circulação sistêmica (Ginther e First, 1971). O prolongamento da fase luteal ou bloqueio da luteólise ocorre pela presença de um conceito, através de sua migração pelo útero da égua, denominado reconhecimento materno da gestação (Allen, 2005). Em relação a luteólise ou também denominada regressão do CL, esta ocorre em duas etapas, onde a primeira é definida como luteólise funcional, sendo relatada a queda na produção de P4, até que a mesma se encontre menor que 1ng/ml. Já a seguinte fase a luteólise estrutural, ocorre a apoptose das células do CL, redução de tamanho e peso luteais e a substituição de tecidos, de vascular para tecido conjuntivo e fibras de colágeno (Stocco; Telleria; Gibori, 2007). Em experimento realizado por Ginther e colaboradores (2011), foi relatado com base em coletas sanguíneas realizadas a cada hora, de concentrações plasmáticas de P4, que o período luteolítico nas éguas é de aproximadamente 23 horas, assim sendo pode-se considerar a luteólise de duas formas: fisiológica ou induzida.

As prostaglandinas são derivadas de ácidos graxos oxigenados e insaturados que apresentam 20 átomos de carbono. Na literatura, o CL de equinos é citado como tendo maior sensibilidade que o bovino, sendo explicada devido a taxa de metabolização do mesmo ser 5x mais lenta e a meia vida e tempo de distribuição serem 3x maiores em equinos (Shrestha et al., 2012). As prostaglandinas exercem sua função de acordo com o tipo de receptor que se ligam, estes, presentes nas células lúteas grandes e pequenas, além de células endoteliais, realizam uma série de alterações que levam a luteólise, sendo os equinos responsáveis no 3º e 4º dia após a ovulação (Meidan et al., 2017). Acredita-se então que o agente luteolítico regule o fluxo sanguíneo, diminua a oferta de nutrientes, oxigênio e substrato para que seja produzida a P4, além de reduzir a esteroidogênese das células luteas, sendo desencadeada então, a cadeia luteolítica (Niswender et al., 2000).

2.3. Formação dos cálices endometriais

A produção de P4 é realizada inicialmente pelo corpo lúteo primário, atingindo concentrações plasmáticas de 6 a 10 ng/mL no dia 5 após a ovulação e continuam, na égua prenhe, a crescer até os 35 a 40 dias de gestação, quando a eCG começa a ser produzida pelos cálices endometriais (Allen et al., 2002).

Com aproximadamente 70 dias de gestação, há formação dos cálices endometriais, que são pequenas protuberâncias de tecido altamente compacto, semelhantes a um anel, presentes na porção caudal do corno gravídico, resultantes da invasão de células trofoblásticas para dentro do endométrio (Ginther, 1992).

Uma sub-população de células trofoblásticas altamente invasivas se diferenciam entre os dias 25 e 36 de gestação para formar uma faixa avascular composta por um tecido denominado cinta coriônica que circunda o concepto esférico na região entre o alantóide em formação e o saco vitelínico em regressão (Ginther, 1992). Ao contrário das demais células não invasivas do trofoblasto equino, as células da cinta coriônica começam a se fixar e invadir o epitélio uterino ao redor dos 35 dias de gestação (Allen et al., 2002).

As células das cintas coriônicas se diferenciam em células secretórias binucleadas durante a formação dos cálices endometriais, e secretam eCG durante aproximadamente os dias 33 a 120 da gestação. A sua concentração permanece alta até 90 dias e após esse período declina sendo aos 150 dias ausente. O pico de secreção de eCG ocorre ao redor dos 55 a 70 dias de gestação e corresponde ao período de tamanho máximo dos cálices endometriais (Allen, 2002).

A eCG pertence à família dos hormônios glicoproteicos, com alto peso molecular e sua função ainda não é totalmente compreendida, sendo bastante complexa. Além desta, o LH e o FSH hipofisários, bem como a hCG, pertencem à mesma família de hormônios, as quais são bastante utilizadas na medicina humana e veterinária mimetizando os mecanismos endócrinos que regulam os ciclos reprodutivos (Allen, 2001). A placenta da égua e da mulher sintetizam gonadotropinas com características similares as gonadotropinas hipofisárias. Estes hormônios por sua vez, sendo eles hCG e eCG, atuam sobre as células gonadais da fêmea gestante estimulando a biossíntese dos hormônios esteroidais. Porém as cadeias α de hCG e eCG são maiores quando comparadas com as gonadotropinas hipofisárias, além de possuírem maior número de carboidratos, o que influencia na meia vida mais prolongada (González, 2002).

Sendo assim, é relatado na literatura que o eCG no sangue materno aparece pela primeira vez em torno de 37 a 40 dias posteriores a ovulação, sendo que suas concentrações aumentam acentuadamente em torno de 55-70 dias (40-250 iu/ml), até que

seja completamente desaparecida do soro sanguíneo em torno de 100-140 dias. Este declínio do eCG sérico ocorre de forma paralela a degeneração e eventual morte dos cálices endometriais do endométrio (Wooding et al. 2001).

Alguns fatores na literatura são demonstrados como influenciando as concentrações de eCG no soro materno entre os dias 40 e 100 de gestação, sendo eles: o tamanho da égua (Allen et al. 2002); fatores intrínsecos da égua (Martinuk et al. 1990); influências da paternidade do concepto (Manning et al. 1987); genótipo e gênero fetal, gestações gemelares, além do ambiente uterino (Allen et al. 1993). A quantidade de eCG no sangue materno então, é a principal função da quantidade de tecido de cálices endometriais presentes no útero, que por sua vez, são regidos pela largura e desenvolvimento geral da cinta coriônica progenitora e seu contato com o endométrio. O efeito das diferenças de largura da cinta na produção de eCG pode ser ilustrada por acasalamentos interespecíes. Por exemplo, o cinturão que se desenvolve em éguas (*Equus caballus*) é consideravelmente mais amplo do que em mulas (*Equus asinus*), resultando em cálices endometriais maiores e conseqüente níveis mais altos de eCG (Allen, 1969).

O desenvolvimento da cinta coriônica invasiva entre os dias 25 e 35 da gestação é estimulado principalmente pela secreção do fator de crescimento mitogênico, fator de crescimento de hepatócitos, outros fatores como fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento transformador b1. Estes são secretados por componentes do endométrio na época do desenvolvimento e invasão dos cálices endometriais (Allen et al. 2007). Porém os estímulos precisos para proliferação, diferenciação, adquirir fenótipo invasivo e a capacidade de sintetizar e secretar eCG permanecem pouco evidenciados (Wilsher & Allen., 2011).

Nos dias 80 a 90 da gestação, ocorre uma intensa resposta leucocitária materna associada a regressão dos tecidos dos cálices. Considerável número de leucócitos maternos, linfócitos, plasma celular e eosinófilos aparecem acumulados na base dos cálices endometriais, formando uma barreira imunológica entre os tecidos materno e fetal. Com isto, os cálices são degenerados e destruídos, reestabelecendo a passagem dos ductos obstruídos das glândulas endometriais (Allen, 2002).

2.4 Características Farmacodinâmicas da eCG

A eCG possui uma meia vida de até 48 h (Murphy e Martinuk, 1991), sendo um fármaco produzido nos cálices endometriais das éguas em período gestacional, compreendendo dos dias aproximados 40 e 130 dias de gestação.

O mesmo tem uma característica individual sendo a única gonadotrofina com a capacidade de se ligar tanto aos receptores de FSH como aos de LH, ou seja, tem uma atividade tanto de folículo estimulante quanto luteinizante. Este fato possibilita quando ligada aos receptores foliculares de FSH e LH, o crescimento, maturação folicular e ovulação (Murphy e Martinuk, 1991).

É observada em sua composição duas subunidades (α - composta por 96 aminoácidos; e β - composta por 149 aminoácidos). Tem como característica a existência de aproximadamente 45% de sua massa, em quantidade de carboidratos onde a N-acetilneuramina (ou ácido siálico) se destaca, sendo presente na subunidade β da molécula de eCG, fato este que lhe garante uma longa meia-vida (Murphy e Martinuk, 1991).

Um fator relatado na literatura sobre o eCG, segundo Flores-Flores e colaboradores (2014) foi o observado em éguas prenhes, onde concentrações de eCG em matrizes que obtiveram prenhez por garanhões foram dez vezes mais altas do que em éguas que foram emprenhadas por jumentos. Em relação a luteólise quando submetidos ao cloprostenol (0,25 mg), a mesma foi completa em prenhez por jumentos em 30 horas após a primeira aplicação, e por garanhões foram necessárias 96 horas (o tratamento foi repetido 48, 72 e 96 horas após a primeira aplicação) e 3 aplicações do mesmo. Com isto, as altas concentrações de eCG são citadas como agente protetor aos corpos luteos da gestação contra os efeitos luteolíticos da PGF2 α . Este é um fato importante de ser ressaltado quando comparado ao experimento em questão, onde no período de transição as éguas controle obtiveram a regressão luteal mais precoce ($11,60 \pm 1,52$), sugerindo a possibilidades de que o eCG possa ter protegido o CL contra a liberação endógena de PGF2 α .

Ainda, devido ao alto peso molecular e à presença de ácido siálico, a molécula de eCG é carregada negativamente, o que dificulta a sua filtração glomerular e aumenta ainda mais sua meia-vida (Baruselli et al., 2008). Receptores de LH do CL, podem sofrer ligações pelo eCG, promovendo um aumento das células luteais grandes, que são responsáveis por cerca de 80% da síntese de P4, conferindo-lhe maior volume e maior capacidade de produção progesterônica (Souza et al., 2009), sendo relatada seu uso, como um aporte para melhora das concentrações plasmáticas de P4 em ciclos estrais subsequentes (Baruselli et al., 2000).

Cada subunidade protéica das gonadotropinas é composta de duas cadeias de oligossacarídeos unidos por ligações N-glicosídicas. As unidades monossacarídicas mais comuns são: manose, glicosamina, fucose e ácido siálico. Este, tem responsabilidade sobre a meia-vida do hormônio, sendo que antes da degradação hormonal, deve ocorrer a remoção dos resíduos de ácido siálico. Assim, quanto maior é a proporção de ácido siálico na molécula, maior é a meia-vida do hormônio (González, 2002).

Em relação ao seu metabolismo, o eCG foi primeiro investigado por Catchpole e colaboradores (1935), onde foi relatado uma meia vida de 24 horas do hormônio quando injetado em camundongos. O mesmo teve seu prolongamento para três dias quando foi injetada em um cavalo macho castrado. Muitos anos depois, o mesmo grupo de pesquisa, Cole e colaboradores (1967) relatou uma meia vida entre 6 e 6,5 dias em duas éguas pôneis histerectomizadas em torno de 60 dias de gestação, com o intuito de remover a fonte de suprimento. Posteriormente, foi relatado por Aggarwal & Papkoff (1981), em modelo proposto com camundongos, que o eCG, desaparecia da circulação de maneira bifásica, com o plasma, fígado e rins, onde todos desempenhavam um papel na desativação e metabolismo do hormônio. Wilsher & Allen (2011), sugerem que vários outros fatores estão envolvidos com a determinação da liberação de eCG no sangue materno, incluindo a vida útil prolongada dos cálices endometriais em alguns animais.

2.5 Controle da sazonalidade reprodutiva: Progesterona

A utilização de dispositivos intravaginais de P4 nos períodos de anestro e transição em éguas, tem como principal finalidade a antecipação da ciclicidade, fato este que iniciaria mais precocemente o período reprodutivo destes animais (Oliveira et al., 2012). O protocolo se justifica em equinos, já que a P4 não inibe completamente a foliculogênese, fazendo com que ovulação antecipada seja possível (Newcombe et al., 2002). A atuação da P4 está relacionada com a inibição do pico pré-ovulatório do LH, sendo observado seu acúmulo na hipófise, favorecendo a ovulação dos folículos que estão em crescimento, além deste fato, a retirada do implante intravaginal gera uma queda abrupta hormonal, onde seus níveis plasmáticos atingem um valor aproximado de 1ng/ml, sendo observado um comportamento de estro (Staempfli et al., 2011). Mesmo que na literatura a foto-estimulação seja eficiente para realização da antecipação ovulatória, ainda não sendo um método hormonal, quando este é acrescentado a hormonioterapia no final do regime que o animal esteve sob estímulo de luminosidade, ocorre a antecipação

da primeira ovulação, gerando um aumento na eficácia do programa de luz (Schutzer, 2012). Porém para que seja eficaz o tratamento à base de P4, é necessário compreender o período da fase de transição além do status de crescimento folicular, onde quanto mais avançado o período de transição, maiores são as chances de ovulações após o tratamento.

A P4 se torna ineficiente para indução de estro quando utilizada no início do período de anestro, onde os ovários tem suas características de diminuição de tamanho e inatividade funcional (Leblanc, 2005). Em relação aos implantes intravaginais de P4 na literatura, Arbeiter et al. (1994) obtiveram sucesso demonstrando o uso do implante intravaginal de progesterona (CIDR-B®; 1,9 g de Progesterona) em éguas em anestro durante a fase de transição e durante a estação de monta. Além disso, administração da deslorelina (análogo sintético de GnRH) como indutor da ovulação foi avaliado, após a retirada do CIDR-B®, quanto aos seus efeitos para assegurar e/ou acelerar ovulações para tornar os resultados do tratamento mais previsível. Com a aplicação do CIDR-B®, os níveis de progesterona plasmática se elevaram, caindo drasticamente após sua remoção no D10 e D12. O tratamento com progesterona mostrou resultado em 93% das éguas tendo sua atividade ovariana diminuída significativamente. Após a retirada do implante, as ovulações ocorreram entre 24 e 52 horas. Adicionalmente, Klug (2001) e Cuervo-Arango (2010) demonstraram que a progesterona liberada a partir de um dispositivo intravaginal, suprimia e, após sua retirada, sincronizava o estro, acompanhada ou não de aplicação de estradiol (10 mg).

Em relação a sua classificação a P4 é um hormônio sexual esteróide que têm função juntamente com o E2 de sincronização funcional do sistema reprodutor feminino, possibilitando a ocorrência da fertilização e consequente desenvolvimento embrionário. (Ulbrich et al., 2003). Os hormônios esteróides possuem uma estrutura similar e são derivados do colesterol, estes são produzidos pelas glândulas adrenais e ovários através da endocitose de lipoproteínas, clivadas nos lisossomos. O colesterol livre passa por esterificação e em forma de gotículas é estocado ou pode também sofrer uma conversão para o esteroide apropriado. Sendo lipossolúveis a membrana celular é ultrapassada por difusão, não havendo hormônios estocados no interior das células por este motivo (Niswender, 1993). Os tecidos que geram respostas aos hormônios esteróides possuem um receptor de proteínas intracelular, que se liga ao hormônio ativo. Já dentro da célula o esteróide se encontra no citoplasma ligado a uma proteína. O complexo de ligação formado acaba por penetrar no núcleo gerando respostas fisiológicas próprias daquela célula (Hafez, 1995).

Segundo Press e colaboradores (1988) os eventos biológicos envolvidos no mecanismo de ação dos hormônios são regulados pela interação hormônio-receptor, onde os efeitos hormonais estão envolvidos pela concentração hormonal, concentração de receptores no tecido alvo e afinidade receptor-hormônio. Neste sentido o receptor de P4 é uma proteína que se localiza dentro da célula, sendo que sua síntese sofre influência da ação do E2 nas células alvo. Através de difusão passiva ou facilitada o E2 é englobado pela célula e liga-se a seu receptor. Este complexo sofre interação com a cromatina nuclear e geram uma produção de um grupo de RNAm que irão codificar os receptores de P4 (Press et al., 1988). Xiao & Goff (1993) relataram que no útero o número de receptores de P4 é mais alto no estroma que nas células epiteliais, além de que o estradiol retroalimenta seus receptores próprios e que a P4 inibe a ativação do estradiol sob os receptores progesterônicos no estroma e epitélio. Em relação a cérvix, foi encontrada uma concentração de receptores para P4 bem mais baixa do que no útero (Re et al.,1995).

3. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo geral acompanhar o desenvolvimento folicular e avaliar o momento da ovulação, características do folículo ovulatório (FO) e do corpo lúteo (CL), bem como níveis plasmáticos de hormônios esteroides (estrógeno e progesterona), comparando a eficácia de dois protocolos de sincronização da ovulação, ambos a base de progesterona (P4) intravaginal (1,9g), associada ou não ao eCG, utilizando hCG como indutor de ovulação, em éguas sincronizadas no período de transição estacional e durante a estação reprodutiva. Portanto, o presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar a taxa de crescimento folicular antes e após a remoção do implante intravaginal de progesterona em 15 éguas sincronizadas durante período de transição e das mesmas 15 éguas sincronizadas durante estação reprodutiva, utilizando hCG como indutor da ovulação, associado ou não ao eCG;
- 2) Avaliar a taxa de ovulação, momento da ovulação, tamanho do folículo ovulatório e eficácia na indução da ovulação, após a remoção do implante intravaginal de progesterona, bem como tamanho e qualidade do corpo lúteo formado aos 9 e 13 dias

após a ovulação, em 15 éguas sincronizadas durante período de transição e das mesmas 15 éguas sincronizadas durante estação reprodutiva, utilizando hCG como indutor da ovulação, associado ou não ao eCG;

3) Avaliar o nível de progesterona plasmático no momento do início do protocolo, durante e no fim da realização do protocolo hormonal, no momento da indução da ovulação, e aos 9 e 13 dias após ovulação, em 15 éguas sincronizadas durante período de transição e das mesmas 15 éguas sincronizadas durante estação reprodutiva, utilizando hCG como indutor da ovulação, associado ou não ao eCG;

4) Avaliar o nível de estrógeno plasmáticos ao fim do protocolo hormonal e no momento da indução da ovulação, em 15 éguas sincronizadas durante período de transição e das mesmas 15 éguas sincronizadas durante estação reprodutiva, utilizando hCG como indutor da ovulação, associado ou não ao eCG;

4. Material e Métodos

4.1. Animais

O presente experimento foi realizado utilizando 15 éguas entre 04 e 08 anos de idade, de raça mestiça, em boas condições corporais (protocolo CEUA UFMG 57/2018 e protocolo CEUA PUC Minas 017/2018; anexos 1 e 2) na fazenda experimental da universidade pontifícia católica de Minas Gerais. O protocolo de sincronização foi realizado duas vezes em cada animal (uma vez durante o período de transição estacional e uma vez durante estação reprodutiva). Portanto, as éguas foram sincronizadas durante a primavera (período de transição- setembro 2018) e as mesmas éguas durante o verão (estação reprodutiva- janeiro 2019).



Figura 01: Animais utilizados em ambas as fases experimentais.

4.2. Desenho do estudo

Todas as éguas ($n = 15$) receberam o mesmo protocolo hormonal a base de implante intravaginal de P4 para sincronização do estro, sendo utilizado o hCG como indutor da ovulação. Dentre esses animais, em 8 éguas a eCG foi administrada no momento da remoção do implante de P4 (grupo tratamento-eCG) e em 7 éguas foi aplicada apenas solução salina no momento da retirada do implante (grupo Controle).

O protocolo estabelecido para sincronização da ovulação consistiu na administração de benzoato de estradiol (EB), $PGF2\alpha$ e aplicação do implante intravaginal de P4, no primeiro dia do protocolo, determinando o dia 0 (D0) do mesmo. O implante de P4 permaneceu por 10 dias. Em todas as éguas, no dia 10 (D10), foi realizado a remoção do implante de progesterona e aplicação de $PGF2\alpha$. Nas éguas do Grupo eCG foi ainda administrado 400 UI (2ml) de eCG no D10 e nas éguas do grupo controle este procedimento não foi realizado.

Durante o período de presença do implante de P4 (D0 a D10) foi realizado a avaliação ovariana por ultrassonografia, diariamente (uma vez por dia, sempre no mesmo horário), para acompanhamento do diâmetro folicular de cada égua.

Após a remoção do implante (D11 em diante) a avaliação ovariana por ultrassonografia passou a ser realizada duas vezes por dia. Ao surgimento de um folículo com ≥ 35 mm, a

ovulação foi induzida com hCG e o monitoramento folicular continuou por até 15 dias após a ovulação, para monitoramento do CL.

Foi realizado colheita de sangue de cada animal no dia do início do protocolo (D0), no quinto dia da presença do implante (D5) e no dia da remoção do implante de progesterona (D10 ; antes da retirada do dispositivo), no dia da indução da ovulação (dia em que o folículo dominante atingiu > 35mm de diâmetro) e aos nove e treze dias após a ovulação, onde foram realizadas as dosagens de estrógeno e progesterona por quimioluminescência.

Um esquema do delineamento experimental do presente trabalho se encontra na figura 2.

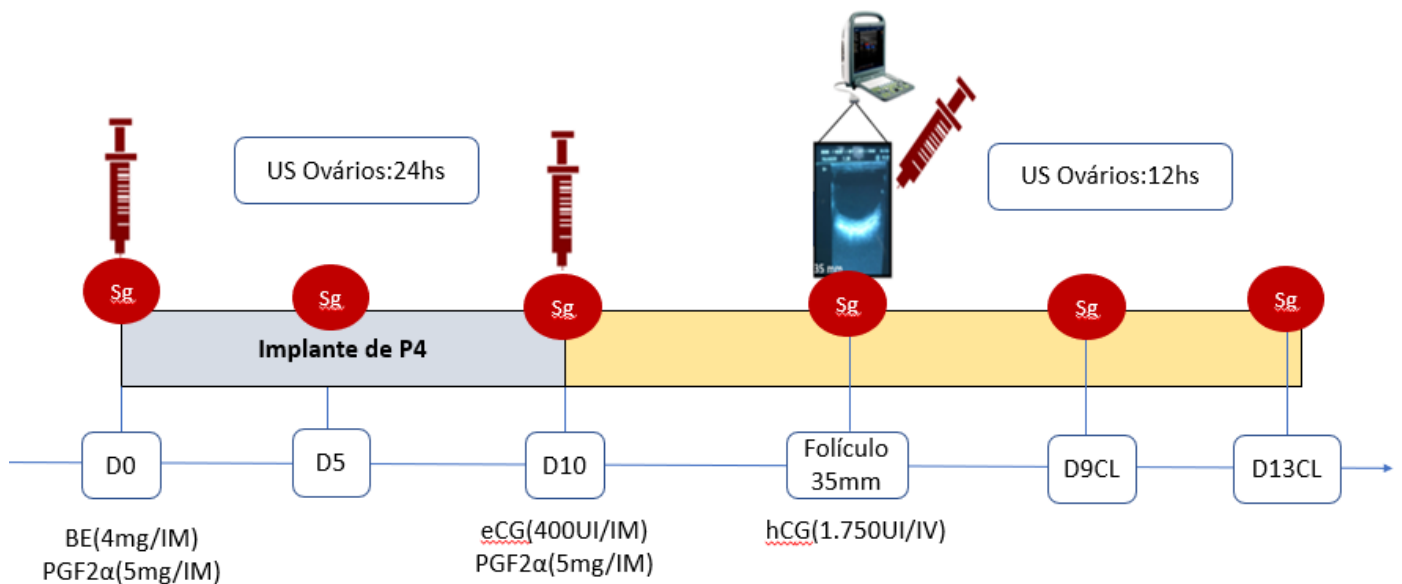


Figura 2. Desenho do estudo

Esse experimento foi realizado em duas etapas, sendo o protocolo realizado em 15 éguas durante a transição estacional de primavera (7 éguas do grupo Controle e 8 éguas do grupo tratamento/eCG) e nas mesmas 15 éguas durante o verão (7 éguas do grupo Controle e 8 éguas do grupo tratamento/eCG). Portanto, ao final do experimento obtivemos 4 grupos experimentais: 1) Grupo Controle verão (n = 7); 2) Grupo eCG verão (n = 8); 3) Grupo Controle inverno (n = 7); 4) Grupo eCG inverno (n=8)

4.3 Protocolo hormonal e doses utilizadas

O protocolo estabelecido para sincronização da ovulação consistiu na administração de benzoato de estradiol (4mg;4ml, i.m.; Gonadiol®, Coopers, São Paulo, Brasil) e aplicação do implante intravaginal de progesterona (1,9 g; CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil), no primeiro dia do protocolo, determinando o dia 0 (D0). Adicionalmente, no dia 0 (D0), foi realizada a administração de prostaglandina (5 µg; 1ml de dinoprost i.m.; Lutalyse Zoetis, São Paulo, Brasil).

No dia 10 (D10), foi realizada a remoção do implante de progesterona e uma segunda dose de prostaglandina foi administrada (5 µg; 1ml de dinoprost i.m.; Lutalyse; Zoetis, São Paulo, Brasil). Nas éguas do grupo eCG foram ainda realizadas a administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG; 400 UI; 2ml, i.m.; Novormon®, Zoetis, São Paulo Brasil).

Ao surgimento de um folículo com ≥ 35 mm, a ovulação foi induzida com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG, 1.750 UI; 0,7 ml intravenosa (i.v.); Vetecor®, Hertape, Juatuba, Brasil) em todas as éguas.



Figura 03: Materiais utilizados para realização dos protocolos hormonais.

4.4 Acompanhamento ultrassonográfico do desenvolvimento folicular

Como anteriormente relatado, durante o período de presença do implante de progesterona (do D0 a D10) foi realizada avaliação ovariana por ultrassonografia (Aloka

Ssd-500) diariamente (uma vez por dia, sempre no mesmo horário, pela manhã), para acompanhamento do diâmetro folicular de cada égua.

Após a remoção do implante (a partir do D11), a aferição do maior folículo foi realizada duas vezes ao dia (no mesmo horário das demais aferições, pela manhã, e também no final da tarde).

Durante as avaliações, o diâmetro do maior folículo foi determinado considerando a média da máxima área transversal da altura e da largura de uma imagem “congelada” obtida pela ultrassonografia.

Uma vez que um folículo ≥ 35 mm foi detectado, a ovulação foi induzida (com hCG), sendo considerado como Hora 0 (h0) o momento da indução da ovulação, considerado Hora 12 (h12), o momento de 12 horas após, e assim por diante.

A ovulação foi detectada pela inexistência do maior folículo ovariano (folículo pré-ovulatório) anteriormente detectado no exame ultrassonográfico anterior.

As taxas de crescimento folicular foram determinadas pela somatória das diferenças do diâmetro folicular em dias consecutivos e dividido pelo número de intervalos envolvidos.

A ovulação foi detectada pelo desaparecimento do folículo pré-ovulatório e pela presença de um corpo lúteo (CL) recente caracterizado na imagem feita pelo exame ultrassonográfico, corroborando com as descrições de Ginther (1990).

A mensuração do CL até os 15 dias após a ovulação seguiu o mesmo procedimento descrito para o folículo dominante. Ou seja, o diâmetro do CL foi determinado considerando a média da máxima área transversal da altura e da largura de uma imagem “congelada” obtida pela ultrassonografia.



Figura 04: Acompanhamento folicular diário.

4.5 Coleta de sangue para dosagem de estrógeno e progesterona por Quimioluminescência

Foram realizadas colheitas de sangue (10 mL) da veia jugular de cada animal no dia do início do protocolo (D0), no quinto dia do protocolo hormonal (D5), no dia da remoção do implante de progesterona (D10; antes da retirada do dispositivo), no dia da indução da ovulação (dia da detecção de um folículo > 35mm de diâmetro) e aos nove e treze dias após a ovulação (dias em que o CL estará formado), para posterior realização das dosagens de estrógeno e progesterona por quimioluminescência.

As amostras de sangue foram obtidas utilizando-se tubos siliconizados (tampa vermelha) e agulha de 25mm x 8mm (sistema Vacutainer®) utilizando-se kits comerciais pelo método de quimioluminescência. Para dosagem hormonal, o plasma foi obtido a partir da centrifugação do sangue (900xg por 15 min) e submetido ao congelamento (-20°C) até o momento da realização das dosagens hormonais de estrógeno e progesterona por quimioluminescência.



Figura 05: Amostras obtidas realização das dosagens hormonais.

4.6. Análise estatística

As variáveis avaliadas foram representadas em termos de médias e erro-padrão. Para estudo do efeito da utilização do eCG, estação e da interação entre os dois fatores foi proposto um modelo linear misto considerando o efeito de animal como aleatório. Foi realizada análise de variância e teste F. Em caso de interação significativa as combinações entre utilização ou não de eCG e estação foram comparadas por meio do teste de Tukey. Transformação logarítmica foi realizada para a análise das variáveis que não apresentaram distribuição normal ou homocedasticidade dos resíduos e os mesmos testes anteriores aplicados. O nível de significância considerado em todas as análises foi de 5%. As avaliações foram realizadas por meio do software R 3.6.1 (R core Team, 2019).

5. Resultados e discussão

Embora utilizada na reprodução de equinos em protocolos de superovulação, poucos trabalhos investigaram a utilização do eCG associado a progesterona como auxiliar na indução da ovulação e/ou da melhora na resposta ovulatória em éguas com folículo > 35 mm, o que pode ser interessante principalmente para éguas fora da estação de reprodutiva como no período de transição estacional. No presente experimento foi possível observar que a utilização de progesterona intravaginal (1,9 g) permite controle

folicular satisfatório e que a utilização de eCG parece auxiliar na manutenção do corpo luteo (CL) das éguas em período de transição.

No presente experimento não foi observado efeito de escore de condição corporal (ECC) entre os tratamentos, estação do ano e/ou interação entre eles ($P>0,05$), demonstrando que os animais utilizados apresentaram ECC semelhante ($2,82 \pm 0,37$) e foram distribuídos de forma equiparada entre os grupos (Controle/estação reprodutiva: $2,81 \pm 0,45$; Controle/transição: $2,75 \pm 0,38$; eCG/estação reprodutiva: $2,89 \pm 0,33$; eCG/transição: $2,83 \pm 0,35$).

Com relação a taxa ovulatória, neste trabalho foi observada a ovulação em 83% dos animais avaliados, sendo que no período de transição foi detectada ovulação em 67% dos animais e no período reprodutivo em 100% dos animais, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Taxa de ovulação (%) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição primaveril.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	100% (7/7)	57 % (4/7)	79% (11/14)
Ecg	100% (8/8)	75 % (6/8)	87,5% (14/16)
Total	100% (15/15) a	67 % (10/15) b	83% (25/30)

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença entre grupos por meio do teste Exato de Fischer ($p<0,05$).

Para taxa de ovulação, foi observada diferença estatística entre as estações do ano ($P=0,0042$) não sendo observada, porém, diferença entre os grupos controle e eCG (tabela 1). O comportamento reprodutivo estacional, ou seja, a não fertilidade dos animais durante todo o ano, tem sido relatado na maior parte das éguas. A mudança da relação luminosidade e escuridão leva primeiramente a uma modificação fisiológica e morfológica dos órgãos relacionados a reprodução, definindo assim a sazonalidade reprodutiva (Bergfelt, 2009). Quando há um rompimento do folículo ovariano e liberação do oócito, possibilitando sua captação pela tuba uterina e consequente fertilização, se denomina ovulação (Ginther, 1992). A incidência de ovulações pelo padrão de sazonalidade da atividade reprodutiva das éguas, geralmente se apresenta reduzidas durante o outono, tornando-se ausentes ou mínimas no inverno, tendo um aumento na primavera e sendo observada de forma máxima durante o período de verão, dados estes que são semelhantes aos obtidos pelo experimento, onde 100% das éguas

tiveram suas ovulações no período reprodutivo, e encontraram-se com ovulações reduzidas no período transicional (Bergfelt, 2009).

A queda nas concentrações de LH se tornam evidenciadas na fase de transição de outono, quando as ovulações se fazem ausentes e a atividade folicular ovariana se apresenta reduzida (Palmer & Guillaume, 1992). Estas concentrações se tornam mínimas no anestro, ou seja, no período anovulatório. Neste período são observadas baixas concentrações hipotalâmicas de GnRH, de LH na hipófise e dos esteroides ovarianos estrógeno e progesterona (Bergfelt, 2009). A secreção de GnRH e gonadotrofinas, assim como a retomada do desenvolvimento folicular, comportamentos de estro e ovulação é verificada na fase de transição de primavera (Nagy et al., 2000).

Arbeiter et al. (1994) obtiveram sucesso demonstrando o uso do implante intravaginal de progesterona (CIDR-B®; 1,9 g de Progesterona) em éguas em anestro durante a fase de transição e durante a estação de monta.

Porém, como foi possível observar na tabela 1 do presente estudo, mesmo sendo utilizado implante de P4 em todos os animais, o desempenho reprodutivo referente a taxa de ovulação das éguas em período de estação reprodutiva se apresentou melhor ao das éguas em estação de transição primaveril.

Com relação a taxa de crescimento folicular, não foi observada diferença estatística seja antes ou após a remoção do implante de progesterona, tanto para animais na estação reprodutiva, quanto para animais no período de transição, conforme demonstrado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Taxa de crescimento folicular (mm/dia) durante a utilização do implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	2,04 ± 0,76	2,31 ± 2,25	2,18 ± 0,37
Ecg	1,21 ± 0,61	2,12 ± 1,42	1,66 ± 0,34
Total	1,62 ± 0,34	2,22 ± 0,36	1,90 ± 0,13

Tabela 3. Taxa de crescimento folicular (mm/dia) após a remoção do implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9 g) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva e na estação de transição. Belo Horizonte, 2020.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	3,17 ± 0,62	4,03 ± 1,17	3,65 ± 0,35
eCG	3,90 ± 0,86	3,64 ± 1,22	3,84 ± 0,29
Total	3,62 ± 0,27	3,87 ± 0,28	3,70 ± 0,10

Na literatura, trabalhos com a utilização de dispositivos intravaginais de progesterona em éguas tem-se baseado na hipótese de que o aporte rápido deste hormônio, assim como posteriormente a retirada do dispositivo e sua consequente queda, estimulariam a produção e liberação de GnRH hipotalâmico no período de transição e anestro estacional, aumentando os níveis de LH e FSH hipofisários estimulando o crescimento folicular e ovulação. Neste sentido, Hanlon e colaboradores (2010), em éguas na estação de transição de primavera submetidas ao implante intravaginal de progesterona (Cue-Mare®) por 10 dias, observaram um pico de progesterona ($3,3 \pm 0,7$ ng/ml) um dia após a utilização do mesmo, já as concentrações plasmáticas de LH e FSH observadas em declínio. Do terceiro ao quinto dia de utilização do implante o FSH teve suas concentrações aumentadas e se manteve em platô ($9,4 \pm 0,8$ ng/ml no dia 3), tendo um declínio de seus níveis plasmáticos nos dias 5 e 9. Em relação ao LH, nos dias 6 e 7, pode-se observar um aumento em suas concentrações em relação ao primeiro dia de dosagens.

Ainda sobre os tratamentos à base de P4, relatos sobre sua importância na reprodução equina têm sido reportados. Os mesmos visam manutenção de prenhez, tratamentos para algumas patologias reprodutivas, regulação e sincronização do estro além de ser utilizada para inovulação de embriões como coadjuvante. Acelera então a ciclicidade das éguas, principalmente no período de transição, facilitando e melhorando o manejo reprodutivo durante este período. Segundo Cuervo-Arango (2010) os fatores acima se devem a maior resposta folicular a indutores de ovulação em éguas que foram previamente expostas a P4. Assim como Botelho (2012) demonstrou que o tratamento mais eficaz para se iniciar a atividade ovariana, apresentando ciclicidade normal em éguas no período de transição de primavera foi a aplicação intramuscular de P4 longa ação associada a $PGF2 \alpha$, dez dias posteriores a mesma. Além disso, em éguas tratadas com implante intravaginal de progesterona segundo Hanlon & Firth (2012), foi observado que estas seriam servidas mais precocemente durante a estação de monta do que as do grupo controle, sendo que o intervalo do primeiro serviço foi de $13,9 \pm 3,0$ vs $26,7 \pm 13,2$ dias, assim como também foi verificado que a duração do tratamento com o implante intravaginal obteve uma diferença no primeiro serviço, onde éguas submetidas a sete dias de implante, foram servidas 2,5 dias mais precocemente do que as éguas que foram submetidas a 10 dias de P4. Ao final da estação reprodutiva, haviam maior número de animais que foram submetidas ao implante prenhes, do que as do grupo que não receberam tratamento. Com estes fatores, os progestágenos, tem sido utilizado para

controlar de forma mais consistente o período de transição, reduzindo o período de anestro de inverno até que ocorra a primeira ovulação.

Embora nas tabelas 2 e 3 não tenha sido observada diferença na taxa de crescimento folicular entre as estações do ano, é interessante observar na tabela 4 que houve efeito de estação no momento da ovulação ($P=0,0073$), de modo que os animais ovularam mais precocemente (em número de horas) enquanto se encontravam na estação reprodutiva ($31,5 \pm 2,79$ hs) do que quando estes se encontravam no período de transição ($40,50 \pm 2,85$ hs; $P=0,0078$).

Tabela 4. Número de horas (hs) desde o momento da indução com gonadotrofina coriônica humana (hCG) até a ovulação detectada por ultrassonografia e número de dias (d) desde a remoção do implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) até a ovulação, de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET).

	Horas desde a indução até a ovulação (hs)			Dias desde a remoção do implante de P4 até a ovulação (d)		
	ER	ET	Total	ER	ET	Total
Controle	31,71±8,28	37,20±6,57	35,10±3,75	3,81± 2,33	4,90±2,07	4,36± 0,57
eCG	36,00±12,58	40,28±12,83	36,80±3,53	4,67± 2,02	4,36±1,60	4,51± 0,51
Total	31,5±2,79 a	40,50±2,85 b	36,24±10,46	4,24± 0,49	4,63±0,59	4,40±1,96

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância ($p<0,05$).

Um dos fatores importantes na atividade reprodutiva das éguas é a melatonina. Esta por sua vez, é produzida na glândula pineal possuindo uma atuação negativa sob os níveis de GnRH através de uma rede de neurônios que envolvem neurotransmissores e células alvos que estão localizadas no hipotálamo (Maupaux et al., 1999). Do nervo óptico partem os estímulos nervosos responsáveis pela produção de melatonina que ocorrem na fase escura do dia. Ao final do verão e início do outono, é observado um aumento da produção de melatonina e redução da produção de gonadotrofinas, isso resulta na redução da atividade folicular concomitante com a ausência de ovulação. Na estação reprodutiva o processo inverso ocorre devido a um aumento do período de luminosidade, aumentando os níveis de GnRH, FSH e LH (Bergfelt.,2009).

De acordo com Botelho (2012) a retomada da ciclicidade ovariana se faz necessária com uma sequência de eventos endócrinos que geram o controle e coordenação da foliculogênese. O aumento da secreção de GnRH, juntamente a maior síntese e

secreção de gonadotrofinas são fatores que possibilitam a retomada da atividade ovariana. Newcomb e colaboradores demonstraram que grande parte de éguas (80%) com a utilização de dispositivos intravaginais de progesterona tiveram crescimento folicular imediato após a retirada do implante, sendo folículos pré ovulatórios entre 4 e 5 dias. Quando é realizada a retirada dos dispositivos intravaginais de P4, as concentrações deste hormônio caem abruptamente.

A utilização de protocolos de sincronização associado a agentes indutores de ovulação é uma importante estratégia na aplicação das biotecnologias reprodutivas. Para que o mesmo possa ser eficiente, a utilização desses deve ser realizada com o acompanhamento diário da atividade ovariana, através de palpação retal e ultrassonografia, monitorando o crescimento folicular e o edema uterino, para que a administração dos fármacos seja realizada no momento adequado e que se minimizem as possíveis falhas.

Conforme observado na tabela 4 do presente trabalho, os animais apresentaram menor tempo para ovulação após o indutor de ovulação na estação reprodutiva ($31,5 \pm 2,79$ hs) quando comparados a estação de transição ($40,50 \pm 2,85$ hs). Os resultados apresentaram dentro do esperado quando comparados a literatura, que relata o tempo médio de ovulação após a indução de 24 e 48 horas em aproximadamente 80% dos animais (Samper et al., 2002; McCUE et al., 2004). Além então da observada vantagem fisiológica, não se pode ignorar a possibilidade de que a utilização de P4 possa ter contribuído para o maior estoque hipofisário de gonadotrofinas (Samper et al., 2002), reduzindo o tempo para ovulação posteriormente a aplicação do indutor de ovulação, fazendo de ambas observações a possibilidade de uma ovulação mais precoce na estação reprodutiva.

Os dados referentes ao diâmetro médio do folículo dominante durante o período de inserção da progesterona (dias 0, 5 e 10 do protocolo) se encontram na tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro médio (\pm erro padrão) do folículo dominante observado em diferentes momentos do protocolo hormonal (dia 0=D0; dia 5=D5; dia 10=D10) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET).

	D0 (mm)			D5 (mm)			D10 (mm)		
	ER	ET	Total	ER	ET	Total	ER	ET	Total
Controle	14,64 $\pm 3,45$	18,69 $\pm 9,72$	16,70 $\pm 1,71$	18,47 $\pm 3,32$	20,42 $\pm 5,76$	19,50 $\pm 1,02$	26,46 $\pm 8,60$	23,54 $\pm 6,03$	25,00 $\pm 1,67$
eCG	16,13 $\pm 3,70$	23,11 $\pm 7,06$	19,60 $\pm 1,61$	18,35 $\pm 3,59$	22,39 $\pm 3,31$	20,40 $\pm 0,96$	20,37 $\pm 5,46$	24,37 $\pm 6,41$	22,40 $\pm 1,58$
Total	15,40 $\pm 1,66$ a	20,90 $\pm 1,66$ b	18,20 $\pm 0,43$	18,40 $\pm 0,99$ a	21,40 $\pm 0,99$ b	19,90 $\pm 0,43$	23,40 $\pm 1,62$	24,00 $\pm 1,62$	23,60 $\pm 0,68$

Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de um mesmo momento indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância ($p < 0,05$).

De acordo com a tabela 5, foi observado efeito de estação para os diâmetros foliculares no D0 ($P=0,0332$) e no D5 ($P=0,0498$) do protocolo hormonal, de modo que maior diâmetro médio foi observado para as éguas da estação de transição em comparação as éguas da estação reprodutiva nesses momentos de avaliação. No D10 do protocolo essa diferença entre estações não foi observada.

Os dados referentes ao diâmetro médio do folículo dominante após a remoção do implante de P4 (dia da indução e dia da ovulação) se encontram na tabela 6.

Tabela 6. Diâmetro médio (\pm erro padrão) do folículo dominante observado no dia da aplicação do indutor de ovulação (hCG) e no dia da ovulação em éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET).

	Diâmetro aferido no dia da indução da ovulação (mm)			Diâmetro aferido no dia da ovulação (mm)		
	ER	ET	Total	ER	ET	Total
Controle	36,76 $\pm 2,60$	36,00 $\pm 0,79$	36,40 $\pm 0,49$	36,56 $\pm 2,03$ a	33,62 $\pm 2,17$ ab	35,10 $\pm 0,62$
eCG	35,62 $\pm 0,81$	36,05 $\pm 1,29$	35,80 $\pm 0,46$	33,00 $\pm 2,53$ b	37,13 $\pm 1,76$ a	35,10 $\pm 0,55$
Total	36,20 $\pm 0,45$	36,00 $\pm 0,46$	36,10 $\pm 0,16$	34,80 $\pm ,53$	35,40 $\pm ,64$	35,10 $\pm ,28$

Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de um mesmo dia indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na tabela 6 foi interessante observar que houve interação ($P=0,0016$) entre estação do ano e tratamento, para o diâmetro do folículo ovulatório (FO) observado no dia da ovulação (ou seja, última aferição do FO realizada 12 horas antes da ovulação ser detectada). Ainda, foi possível notar que animais que receberam eCG na estação reprodutiva ($33,00 \pm 2,53$ mm) apresentaram menor ($P=0,0161$) diâmetro folicular que os animais que receberam eCG na estação de transição ($37,13 \pm 1,76$ mm) e menor ($P=0,0193$) diâmetro folicular que os animais Controle da estação reprodutiva ($36,56 \pm 2,03$ mm). Assim, parece que a aplicação de eCG afetou negativamente o diâmetro do folículo ovulatório nas éguas durante a estação reprodutiva.

De acordo com McCue (1996) não há um produto hormonal capaz de induzir múltiplas ovulações em éguas como ocorre em bovinos, onde o eCG, no início do protocolo hormonal tem sido utilizado rotineiramente em bovinos para este fim. Porém, em éguas, mesmo quando utilizado em altas dosagens, os relatos indicam que este fármaco não apresentou efeito no desenvolvimento folicular ou ovulatório. Trabalhos de Murphy e Martinuk (1991), relatam que a sub-unidade β da molécula do eCG seria idêntica ao LH na espécie equina e que ambas seriam codificadas por um único gene. Já Ginther e colaboradores, (2008) observaram que os equinos, divergindo de outras espécies, apresentam uma persistente elevação do LH, até atingir o nível máximo 1 a 2 dias após a ovulação, gerando a hipótese de que o eCG pode agir como LH gerando um aumento da condensação das células luteínicas e estimulando uma maior atividade glandular e além de uma maior ecogenicidade do corpo lúteo.

Uma possível explicação para os achados do presente experimento seria considerar a possibilidade de uma possível menor afinidade e/ou ocorrência de competição do eCG pelos receptores de LH, sendo que a molécula de eCG possivelmente obteve uma ação menos eficiente que o hormônio endógeno, podendo ter sido prejudicial ao desempenho reprodutivo das éguas no período reprodutivo. Isso porque neste período (estação reprodutiva), entende-se que os animais possuem concentrações de LH suficientes para o ciclo estral fisiológico.

Gastal e colaboradores (1999) demonstraram efeito da progesterona exógena no crescimento folicular em éguas, onde o tratamento precoce com P4 por 10 dias influenciou positivamente no desenvolvimento do folículo após sua utilização no período de agosto a outubro o que não podemos descartar a possibilidade em nosso experimento. Porém, Canisso e colaboradores (2013) demonstraram que, quando a suplementação de progesterona foi realizada por dois dias na estação reprodutiva com

implante intravaginal (1,9g) e suplementação oral com 0,044 mg/kg/dia de altrenogest, a P4 não afetou a ovulação e a taxa de crescimento do folículo pré ovulatório.

Vale também destacar que foi observada tendência estatística ($P=0,0801$) para maior tamanho do folículo ovulatório nos animais do grupo eCG na estação de transição ($37,13 \pm 1,76\text{mm}$) comparados aos animais do grupo controle na estação de transição ($33,62 \pm 2,17\text{mm}$). Assim, parece existir uma sugestão de que o eCG pode melhorar este parâmetro do folículo ovulatório nas éguas que se encontram no período de transição e, portanto, apresentam menores estoques gonadotróficos de LH.

Porém, conforme pode ser observado nas tabelas 7 e 8 do presente trabalho, as concentrações séricas de estrógeno (E2) não confirmaram este achado, de modo que não foi observada diferença entre os grupos para este parâmetro reprodutivo.

Os dados das concentrações séricas de E2 no dia da remoção do implante de P4 (D10) e no dia da indução da ovulação com hCG (folículo > 35 mm) se encontram nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Concentração sérica de estradiol (ng/mL) no dia da remoção do implante intravaginal de progesterona (P4; dia 10 do protocolo) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação transição	Total
Controle	$44,77 \pm 22,29$	$46,63 \pm 18,53$	$44,50 \pm 5,81$
Ecg	$44,33 \pm 19,34$	$41,44 \pm 13,64$	$44,00 \pm 5,31$
Total	$44,10 \pm 5,07$	$44,30 \pm 4,94$	$44,08 \pm 17,37$

Tabela 8. Concentração sérica de estradiol (E2; ng/mL) no dia da indução da ovulação com hCG (folículo dominante > 35 mm) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação Reprodução	Estação Transição	Total
Controle	$49,27 \pm 15,70$	$28,77 \pm 7,77$	$43,12 \pm 16,61$
eCG	$39,52 \pm 11,30$	$41,53 \pm 19,13$	$40,39 \pm 14,51$
Total	$44,07 \pm 13,96$	$37,28 \pm 16,87$	$42,46 \pm 14,74$

Embora o tamanho do folículo ovulatório seja frequentemente relacionado com a quantidade de estrógeno produzido tanto em éguas (Okólski et al., 1995) como em outras espécies Sunderland et al., 1994; Evans et al., 1997; Kulick et al., 1999), no presente trabalho não foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento

e/ou estação do ano, nem efeito de interação para nível de E2 nos dias avaliados, conforme demonstrou as tabelas 7 e 8.

Além de ser frequentemente relacionado ao nível de estrógeno, o diâmetro do folículo ovulatório também tem sido frequentemente relacionado com o tamanho do corpo lúteo (CL) formado em diversas espécies domésticas (Bartlewski et al., 1999; Sá Filho e Vasconcelos, 2008; Mohktari et al., 2016)

Os dados referentes ao diâmetro médio do CL observado após a ovulação nos diferentes grupos experimentais se encontram nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Diâmetro médio (\pm erro padrão) do corpo lúteo (CL) observado em diferentes momentos após a ovulação (dia 5=CL 5 dias e dia 9= CL 9 dias) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET).

	CL de 5 dias (mm)			CL de 9 dias (mm)		
	ER	ET	Total	ER	ET	Total
Controle	32,45 \pm 2,69	32,50 \pm 2,64	32,50 \pm 0,81	28,47 \pm 2,80	29,74 \pm 7,02	29,10 \pm 1,28
eCG	30,67 \pm 1,95	35,41 \pm 3,95	33,00 \pm 0,72	28,37 \pm 3,20	31,37 \pm 5,30	29,90 \pm 1,13
Total	31,60 \pm 0,69 b	34,0 \pm 0,83 a	32,60 \pm 0,32	28,40 \pm 1,09	30,60 \pm 1,31	29,40 \pm 0,44

Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de um mesmo dia indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 10. Diâmetro médio (\pm erro padrão) do corpo lúteo (CL) observado aos 13 dias após a ovulação (CL de 13 dias) de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva (ER) e na estação de transição (ET).

	CL de 13 dias (mm)		
	ER	ET	Total
Controle	25,70 \pm 3,01 a	22,78 \pm 3,82 a	24,20 \pm 0,96
eCG	22,89 \pm 2,26 b	26,60 \pm 4,44 a	24,70 \pm 0,85
Total	24,30 \pm 0,81	24,70 \pm 0,99	24,50 \pm 0,36

Letras minúsculas distintas entre linhas e/ou colunas indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conforme observado na tabela 9, houve efeito de estação sobre o tamanho do CL de 5 dias ($P=0,0310$), de modo que os animais da estação de transição primaveril apresentaram maior ($P=0,0512$) diâmetro lúteo em comparação aos animais da estação reprodutiva, quando o CL foi analisado neste momento.

Com relação ao CL de 13 dias (tabela 10), foi observada interação ($P=0,0259$) entre estação do ano e tratamento, para o diâmetro do CL aos treze dias após a

ovulação. Assim, o diâmetro médio do CL de 13 dias foi maior ($P=0,0516$) nas éguas que receberam eCG no período de transição em comparação com as éguas que receberam eCG na estação reprodutiva. Adicionalmente, houve tendência ($P=0,0814$) para maior CL de 13 dias de animais que receberam eCG na transição (26,6 mm) em comparação aos animais que não receberam eCG (Controle) dessa mesma estação (22,8 mm).

O tratamento com eCG vem sendo citado na literatura bovina como melhorador de índices de fertilidade, através de mudanças em padrões de crescimento folicular e qualidade do corpo lúteo formado. Este fato se deve pela ação deste hormônio em aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório, melhorando as taxas de ovulação e aumentando as concentrações de P4 durante a fase luteal, o que evidencia a ação gonadotrófica da eCG (Baruselli et al., 2008; Uribe-Velásquez, 2010).

Wecker et al. (2012) avaliaram vacas não lactantes da raça Brangus e observaram que as tratadas com 400UI de eCG sete dias após a realização da IATF demonstraram maior número de corpos lúteos (CL) com área maior que 2 cm^2 (21 e 13, 80,8 e 54,2% dos animais; $P < 0,01$), o que evidencia a ação luteotrófica da eCG. Além disso, receptores de LH do CL podem sofrer ligações pelo eCG, promovendo um aumento das células luteais grandes, que são responsáveis por cerca de 80% da síntese de P4, conferindo-lhe maior volume e maior capacidade de produção progesterônica (Souza et al., 2009). Assim, esse efeito luteotrófico da eCG pode ter ocorrido nas éguas em período de transição do presente trabalho. Porém, visto que a eCG possui uma meia vida média de até aproximadamente 48h em éguas (Murphy e Martinuk, 1991), há de se considerar que esse efeito pode ter ocorrido apenas nos animais em que a ovulação ocorreu próximo a este período após a sua aplicação. Em bovinos, Baruselli et al. (2008) observaram meia vida média de 48 h da eCG.

Estudos sob a função luteal e sua relação com fertilidade em vacas demonstram correlação positiva entre produção luteínica de P4 e taxas de prenhez. Vacas que apresentam diâmetros maiores do folículo pré ovulatório produzem um CL de maior tamanho e conseqüentemente uma maior produção de P4, favorecendo a gestação (Bisinotto et al., 2012). Muitos estudos com manipulações hormonais em programas de sincronização do ciclo estral e indução da ovulação são realizados com o objetivo de manipular o desenvolvimento folicular aumentando a qualidade dos oócitos e taxas de prenhez (Baruselli et al., 2004; Sá Filho et al., 2010). Sendo assim, estes trabalhos

demonstram que as maiores taxas de prenhez são obtidas quando um CL de maior tamanho está presente.

Já a regressão precoce do CL tem sido associada com problemas reprodutivos como infertilidade, abortos e desordens no ciclo ovariano (Giometti et al., 2009). Em ovelhas, ainda é citada como importante obstáculo na produção *in vivo* de embriões, onde é relatada ocorrência em 75% em ovelhas superestimuladas. A baixa recuperação embrionária nestes casos provavelmente ocorre por condições uterinas com baixas concentrações de P4 (Oliveira et al., 2013).

Os dados referentes ao dia da regressão luteal do presente trabalho se encontram na tabela 11.

Tabela 11. Dia da regressão estrutural do corpo lúteo de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de 1,9g de progesterona na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação transição	Total
Controle	13,25 ± 1,03 a	11,60 ± 1,52 b	12,61 ± 0,40
eCG	12,62 ± 0,52 ab	13,99 ± 1,63 a	13,29 ± 0,37
Total	12,94 ± 0,85	12,70 ± 4,36	12,96 ± 1,40

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância e teste de Tukey (p<0,05).

Na tabela 11 foi possível observar que houve interação (P=0,0091) entre estação do ano e tratamento, para o dia da regressão estrutural do CL. A regressão estrutural do CL neste estudo foi definida pela detecção de redução do diâmetro luteal, consecutiva por 2 dias em, pelo menos, 10% do tamanho aferido no dia anterior. Neste sentido, a presente tabela (tabela 11) demonstrou que o dia da regressão luteal mais precoce foi detectada nas éguas do período de transição que não receberam eCG.

Nota-se, portanto, que os animais do grupo controle apresentaram regressão luteal mais precoce (11,6 dias após ovulação) quando se encontravam na estação de transição (P=0,0344) em comparação aos animais do grupo controle da estação reprodutiva (13,3 dias após ovulação). Ainda, os animais que receberam eCG na estação de transição apresentaram regressão luteal mais (P=0,0311) tardia (14 dias após ovulação) do que animais controle desta estação (11,6 dias após ovulação). Por fim, cabe destacar que houve tendência estatística (P=0,0625) para regressão luteal mais precoce nos animais que receberam eCG e se encontravam na estação reprodutiva

(12,6 dias após ovulação) em comparação aos animais que receberam eCG e se encontravam na estação de transição (14 dias após ovulação).

Assim sendo, observa-se que regressão estrutural do CL mais tardia foi detectada nas éguas do grupo eCG na estação de transição bem como do grupo controle na estação reprodutiva, principalmente quando comparadas com as éguas do grupo controle na estação de transição. Esse resultado sugere que, na estação de transição, a eCG pode permitir melhor manutenção luteal em comparação aos animais que não receberam este fármaco.

Em resumo, a média de duração do estro, diestro e do ciclo estral na espécie equina são respectivamente: sete, quinze e vinte dois dias. Sendo assim, a fase luteal dura em média 15 dias e culmina com a regressão do CL, através da liberação de PGF2 α pelo endométrio equino, que é transportada até o ovário mediante circulação sistêmica (Ginther & Fisrt, 1971). Ginther (1992) relata que a regressão do CL ocorre por uma progressiva degradação vascular entre os dias 13 e 16 do ciclo estral, fato que concorda com os dados experimentais tanto do período reprodutivo ($12,90 \pm 2,05$), quanto do período transicional ($12,70 \pm 4,36$). Em relação a vascularização do CL, Brito & Ginther (2017), relatam que tratamentos utilizando GnRH e hCG, são capazes de estimular a perfusão vascular do CL equino sem que haja interferência nas concentrações de progesterona plasmática, fato que deve ser levado em consideração já que o mesmo foi utilizado como indutor de ovulação no presente estudo.

A tendência estatística observada para regressão luteal mais tardia nos animais que receberam eCG e se encontravam na estação de transição em comparação aos animais que receberam eCG e se encontravam na estação reprodutiva parece ser mais um indício que a aplicação de eCG durante o período de transição pode permitir que este parâmetro ovariano apresente desempenho semelhante ao das éguas controle da estação reprodutiva. Porém, a aplicação de eCG na estação reprodutiva parece promover um desempenho inferior aos animais controle desta mesma estação.

Além da avaliação estrutural do CL (avaliação morfológica por ultrassonografia), avaliou-se também a avaliação do seu desempenho funcional (produção de progesterona) nos diferentes grupos. Os dados referentes aos níveis hormonais de progesterona, coletado em diferentes momentos do protocolo hormonal se encontram na tabela 12.

Tabela 12. Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia do início (D0) do protocolo de sincronização do estro com implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	7,53 ± 6,64 ab	2,29±2,66 b	4,91±1,37
eCG	13,11±7,91 a	1,48±1,42 b	7,30±1,42
Total	10,32±1,42 a	1,88±1,37 b	5,97±6,88

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância e teste de Tukey (p<0,05).

Como era de se esperar, foi observado efeito da estação (P=0,0009) na concentração de P4 no dia do início do protocolo (DO), conforme mostrou a tabela 12, de modo que foi observada maior (P=0,0016) concentração de P4 nas éguas da estação reprodutiva (10,32±1,42 ng/mL) em comparação ao período de transição (1,88 ±1,37 ng/mL). Adicionalmente, observou-se que as éguas do grupo eCG que estavam na estação reprodutiva apresentaram maior concentração circulante P4 em comparação as éguas do grupo controle da transição (P=0,0122) e das éguas do grupo eCG da transição (P=0,0095). Assim sendo, de acordo com a tabela acima, nota-se que os animais do experimento se encontravam em diferentes momentos reprodutivos no início do protocolo, o que reflete a diferença do status hipofisário de estoques gonadotróficos dos animais em diferentes estações do ano, conforme já mencionado anteriormente.

Os dados referentes as dosagens de P4 durante a presença do dispositivo intravaginal de P4 (D5 do protocolo hormonal) se encontram na tabela 13.

Tabela 13. Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia 5 (D5) do protocolo de sincronização do estro com implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	3,84 ± 2,68	2,61 ± 1,43	3,23 ± 0,42
Ecg	3,87 ± 1,21	3,09 ±1,07	3,48 ± 0,39
Total	3, 86 ± 0,41	2,85 ±0,40	3,35 ± 1,65

Com relação a dosagem de P4 no D5 (tabela 13), não houve efeito de estação, de tratamento e nem interação entre tratamento e estação. Não foi observada diferença entre os grupos, indicando que a aplicação de PGF2 α no DO pode ter permitido que o status

progesterônico dos animais do experimento estivessem equiparados neste momento do protocolo.

Os dados referentes as dosagens de P4 no momento da retirada do dispositivo de P4 (D10) se encontram na tabela 14.

Tabela 14. Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia da remoção do implante intravaginal de 1,9g de progesterona (D10) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	3,67 ± 2,56	1,54 ± 0,51	2,60 ± 0,38
eCG	2,14 ± 1,14	1,93 ± 0,76	2,03 ± 0,36
Total	2,90 ± 0,37 ^a	1,73 ± 0,37 ^b	2,33 ± 1,62

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença entre grupos por meio de análise de variância ($p < 0,05$).

Observou-se na tabela 14 que na fase reprodutiva foi observada maior ($P=0,043$) quantidade de P4 no D10 ($2,90 \pm 0,37$ ng/mL) quando comparada ao total da estação de transição ($1,73 \pm 0,37$ ng/mL). Esse resultado foi influenciado principalmente pela dosagem sérica das éguas controle da estação reprodutiva, onde se observou tendência ($P=0,0648$) para maior quantidade de P4 ($3,67 \pm 2,56$ ng/mL) neste momento quando comparado com as éguas controle ($1,54 \pm 0,51$ ng/mL) da estação de transição. Este resultado pode estar relacionado com a possibilidade de que alguns animais cíclicos podem ter apresentado CL não responsivo à $PGF2\alpha$ no dia do início do protocolo, de modo que no D10 os mesmos vieram a apresentar um CL completamente organizado e altamente produtor de P4. Analisando o mapeamento ovariano das éguas do presente trabalho foi possível observar que isso ocorreu com apenas dois animais, sendo ambos do grupo controle da estação reprodutiva, justificando assim esse achado.

As funções das prostaglandinas são exercidas de acordo com o tipo de receptor que se ligam. Quando essa ligação ocorre com seus receptores que estão presentes nas células endoteliais e nas células lúteas grandes e pequenas, uma série de alterações que levam a ocorrência da luteólise ocorrem. Para que a $PGF2\alpha$ exerça seu efeito luteolítico, é necessário que o estágio de desenvolvimento do CL seja responsivo a ela. Em asininos e equinos o CL se torna responsivo a partir do 3º e 4º dia após a ovulação, respectivamente (Carluccio et al., 2008).

Em relação ao fenômeno de refratariedade do CL, Alvarenga (1989) sugere que éguas que se encontram em D6 posterior a ovulação, são melhores candidatas a receptoras embrionárias, pelo fato de que, neste período, o corpo lúteo ainda pode ser refratário a uma possível liberação de prostaglandina F2 α , consequente de manipulação uterina realizada no momento da inovulação do embrião. Ainda em relação a este fenômeno, apesar de relatos afirmando que o CL equino é refratário a PGF2 α até o D4 (Ginther, 1992), a literatura demonstra que a funcionalidade do CL recém-formado pode ser comprometida pela administração de PGF2 α durante a luteogênese (Troedsson et al., 2001; Brendemuehl, 2002). Quando administrado nos dias 0, 1 e 2 após a ovulação o Cloprostenol pode afetar o desenvolvimento do CL interferindo na manutenção da gestação. Porém, o tratamento precoce com PGF2 α não gera necessariamente a regressão completa do CL (Troedsson et al., 2001). Assim, juntando os achados de dosagens de P4 nos dias 5 (D5) e 10 (D10) do presente protocolo hormonal, acreditamos que as éguas que não responderam a PGF2 α no início do protocolo (D0) apresentavam um CL formado há menos de 4 dias.

Além das concentrações de P4 durante a presença do implante, as concentrações de P4 em momentos posteriores à remoção do implante também foram avaliadas neste estudo. Os dados dos níveis séricos de P4 no dia da indução da ovulação com hCG (momento da presença de um folículo >35mm) se encontram na tabela 15.

Tabela 15. Concentração sérica (ng/mL) de progesterona no dia da indução da ovulação com hCG (folículo > 35 mm) de éguas mestiças avaliadas na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	0,93 \pm 0,53	0,90 \pm 0,05	0,91 \pm 0,19
eCG	1,16 \pm 0,60	0,49 \pm 0,22	0,83 \pm 0,12
Total	1,04 \pm 0,12	0,69 \pm 0,19	0,88 \pm 0,52

Com relação a concentração de P4 no dia da aplicação de hCG (tabela 15), não foram observadas diferenças entre os grupos, indicando semelhante concentração de progesterona nos animais do experimento no dia da indução da ovulação. Assim, este resultado mostra que a segunda aplicação de PGF2 α , realizada no D10 do protocolo hormonal garantiu que todos animais do experimento apresentassem adequada luteólise.

Essa redução da P4 tem grande importância para a ocorrência da ovulação. De acordo com Ginther (2006), o efeito da administração de PGF2 α sobre a regressão do CL e síntese de P4 depende da idade dessa glândula, do análogo da droga luteolítica e sua posologia, dentre outros. A utilização de 10 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse) resultou na luteólise e reduziu o intervalo interovulatório (IOI) em éguas e possibilitou a ocorrência da próxima ovulação, demonstrando a importância da ocorrência da luteólise antecedendo o momento ovulatório.

Em relação a ovulação com ocorrência durante o tratamento com P4, Squires et al. (1983) descreveram o uso do progestagênio altrenogest no controle do ciclo éstrico de éguas cíclicas. O comportamento éstrico foi suprimido em dois dias após o início de tratamento em 10 éguas nas quais o tratamento começou durante o estro. Destas 10 éguas, sete ovularam durante o tratamento. Já Bandeira et al. (2018), com o dispositivo intravaginal (Cronipres®, Laboratório Biogénesis) por 12 dias, observou no dia da retirada do implante que 2 éguas haviam ovulado, mesmo com a presença do dispositivo, enquanto 1 égua apresentou folículo de 38mm. Em estudos anteriores (dados não publicados) nosso grupo de pesquisa observou ovulação durante a presença do implante contendo 1g de progesterona em 4 de 9 éguas mestiças avaliadas (Sincrogest; Ouro Fino; 1g de P4). Porém, quando se utilizou dois implantes em cada égua (inserção concomitante de 2 implantes de 1g de P4 no mesmo animal) não foram observadas ovulações em nenhuma das 9 éguas. No presente trabalho, nenhuma égua ovulou durante a presença do implante intravaginal contendo 1,9 g de progesterona, demonstrando que a dosagem de 1,9g de P4 presente no implante deste estudo garantiu satisfatório controle folicular, de modo que os animais somente ovularam após remoção do mesmo, sempre associado a aplicação de PGF2 α no momento da remoção do dispositivo de P4.

Após a ovulação espera-se a formação de um CL que deve estar completamente formado em torno de 5 dias, sendo que a luteinização e vascularização no corpo lúteo equino estão completas neste período. À medida que o CL amadurece, as células luteais são caracterizadas por um aumento no diâmetro, núcleos vesiculados e vacúolos finos no citoplasma, os quais indicam um aumento na proliferação celular e produção de P4 (Bergfelt & Adams, 2011). No presente estudo, níveis séricos de P4 foram avaliadas aos 9 e aos 13 dias após a ovulação e se encontram nas tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16. Concentração sérica (ng/mL) de progesterona aos 9 dias após a ovulação de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	7,38 ± 2,78	5,23 ± 1,96	6,31 ± 0,67
eCG	6,73 ± 1,86	5,44 ± 2,56	6,09 ± 0,61
Total	7,06 ± 0,59	5,33 ± 0,69	6,33 ± 2,40

Não foi observada diferença entre os grupos na concentração de P4 ao nono dia após a ovulação (tabela 16), indicando semelhante quantidade de P4 produzida pelo CL dos animais, independente do tratamento. Foi observada, porém, tendência estatística para maior quantidade de P4 aos 9 dias após ovulação nas éguas (P=0,0894) do período reprodutivo (7,06 ± 0,59 ng/mL) em comparação as da transição primaveril (5,33 ± 0,69 ng/mL) condizente com o maior suporte gonadotrófico de origem hipofisária para o CL dos animais durante o período de maior luminosidade. Os resultados referentes as dosagens de P4 aos 13 dias após ovulação se encontram na tabela 17.

Tabela 17. Concentração sérica (ng/mL) de progesterona aos 13 dias após a ovulação de éguas mestiças submetidas a protocolos de sincronização de estro utilizando implante intravaginal de progesterona (P4; 1,9g) na estação reprodutiva e na estação de transição.

	Estação reprodutiva	Estação de transição	Total
Controle	6,10 ± 2,65	3,45 ± 2,30	4,78 ± 2,61
Ecg	5,57 ± 1,30	5,13 ± 2,10	5,35 ± 0,58
Total	5,84 ± 0,56	4,29 ± 0,63	5,22 ± 2,23

De acordo com Ginther e colaboradores (2008) existe íntima relação entre a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do CL equino . Os autores observaram aumento simultâneo na vascularidade luteal e na concentração plasmática de P4 entre os dias D1 e D5 de formação do CL, enquanto a luteólise funcional, a qual ocorreu entre os dias 15 e 16 onde foi acompanhada por uma diminuição progressiva na perfusão sanguínea do CL.

Embora na tabela 17 não tenha sido observada diferença estatística entre os grupos experimentais, foi interessante notar tendência estatística (P=0,0996) para maior quantidade de P4 aos 13 dias após a ovulação nos animais da fase reprodutiva (5,84 ±

0,56 ng/mL) em comparação aos animais do período de transição ($4,29 \pm 0,63$ ng/mL), sugerindo maior manutenção luteal nos animais durante o verão.

Outro dado interessante foi observar a relação dos valores da tabela 11 com os da tabela 17, onde na tabela 17 o grupo em que se observou numericamente menor ($P > 0,05$) quantidade de P4 no dia 13 após ovulação ($3,45 \pm 2,30$ ng/mL; Grupo controle – Estação de transição) foi o mesmo grupo em que se observou na tabela 11 estatisticamente menor ($P < 0,05$) período para ocorrência da regressão luteal ($11,60 \pm 1,52$ dias; Grupo controle – Estação de transição). De maneira semelhante, os dados da tabela 10 mostraram que o diâmetro médio do CL aos 13 dias após ovulação foi menor ($P < 0,05$) nas éguas que não receberam eCG no período de transição (controle/estação de transição: $22,78 \pm 3,28$ mm) em comparação com as éguas que receberam eCG ($26,60 \pm 4,44$ mm) nesta mesma época do ano.

Conforme anteriormente citado, os estágios do período luteínico compreendem desenvolvimento (luteogênese), manutenção e regressão (luteólise), onde mudanças na rede vascular do CL estão presentes durante toda a fase luteal, sugerindo que numerosos, mas ainda não definidos fatores angiogênicos são produzidos pelo CL equino durante toda a sua vida ativa. A densidade microvascular aumenta durante as fases de desenvolvimento e manutenção do CL, enquanto que uma diminuição da mesma é observada nos estágios pré-luteolítico e luteolítico (Ferreira-dias et al., 2006). Neste sentido, a importância da melhor manutenção do CL, assim como sua permanência em atividade prolongada, gera impactos significativos na fertilidade. Segundo McCue e McKinnow (2011), a insuficiência luteal primária é responsável pela diminuição na produção de progesterona pelo corpo lúteo primário e falha no reconhecimento materno da gestação. Ainda segundo Pinto (2011), as baixas concentrações de progesterona são associadas com a perda embrionária precoce na égua.

A relação da alta P4 e alta fertilidade se relacionam com o tônus uterino característico do diestro, sendo atribuído à P4, como indicam os estudos com suplementação de progesterona em éguas não cobertas durante a estação anovulatória e ovulatória (Bonafos et al., 1994). Já Carnevale e colaboradores (2000), realizaram uma associação entre o tônus uterino reduzido e a pior qualidade da receptora com baixas taxas de prenhez, sendo ainda possível detectar uma elevada taxa de perda embrionária. Com isso, puderam concluir que o tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não totalmente compatível com o crescimento e o desenvolvimento embrionário. Além disso, secreções do útero, chamadas de “leite uterino”, são citadas em relação a sua

importância na nutrição do conceito no início da gestação. A habilidade do endométrio em originar uma quantidade adequada de secreções depende em grande parte da P4. O total de proteína na secreção uterina ao longo do ciclo estral tem sido estudado e os resultados indicam que o conteúdo total cai abruptamente com o declínio da p4. Quando ocorre a manutenção do corpo lúteo e a produção de progesterona se mantém, o conteúdo protéico da secreção uterina permanece elevado (Zavy et al., 1979). Assim, fica evidenciado na literatura a importante relação da qualidade do corpo lúteo com a fertilidade das fêmeas mamíferas.

6. Considerações finais

No presente experimento foi possível observar que a utilização de progesterona intravaginal (1,9 g) permite controle folicular satisfatório e que a utilização de eCG parece auxiliar na manutenção do corpo luteo (CL) das éguas em período de transição.

Mesmo sendo utilizado implante de P4 em todos os animais, o desempenho reprodutivo referente a taxa de ovulação das éguas em período de estação reprodutiva se apresentou melhor ao das éguas em estação de transição primaveril.

Embora não tenha sido observada diferença na taxa de crescimento folicular entre as estações do ano, foi interessante observar que os animais ovularam mais precocemente (em número de horas) quando se encontravam na estação reprodutiva do que quando estes se encontravam no período de transição. Assim, os animais apresentaram menor tempo de ovulação após a aplicação de hCG ($31,5 \pm 2,79$ hs) quando comparados aos animais estação de transição ($40,50 \pm 2,85$ hs).

Foi possível notar que animais que receberam eCG na estação reprodutiva apresentaram menor diâmetro do folículo ovulatório do que os demais grupos experimentais, enquanto os animais que receberam eCG na estação de transição apresentam desempenho semelhante aos animais do grupo controle da estação reprodutiva. Assim, parece que a aplicação de eCG afetou negativamente o diâmetro do folículo ovulatório nas éguas durante a estação reprodutiva, sendo benéfico, porém, na estação de transição. Entretanto, as concentrações séricas de estrógeno (E2) não se demonstraram diferentes entre os grupos.

O diâmetro médio do corpo luteo (CL) aos 13 dias após a ovulação foi maior nas éguas que receberam eCG no período de transição em comparação as éguas

Controle da estação de transição, e foi maior do que das éguas que receberam eCG na estação reprodutiva. Ainda, o dia da regressão luteal ocorreu mais precocemente nas éguas do período de transição que não receberam eCG em comparação com as éguas que receberam eCG neste período. Porém, a aplicação de eCG na estação reprodutiva não beneficiou o desempenho reprodutivo dos animais desta estação.

Embora não tenha sido observada diferença na concentração de P4 ao nono e ao 13º após a ovulação entre os grupos experimentais, foi observada tendência para maior quantidade de P4 nos animais da fase reprodutiva em comparação aos animais do período de transição.

Outro dado interessante foi observar que o grupo em que se observou numericamente menor quantidade de P4 no dia 13 após ovulação foi o mesmo grupo em que se observou estatisticamente menor período para ocorrência da regressão luteal (Grupo controle – Estação de transição). Adicionalmente, o diâmetro médio do CL no dia 13 após ovulação foi menor nas éguas que não receberam eCG no período de transição em comparação com as éguas que receberam este hormônio neste período.

Portanto, éguas que não receberam eCG no período de transição apresentaram regressão luteal mais precoce do que os animais que receberam esse hormônio nessa época do ano. Assim, a aplicação de eCG parece ter auxiliado adequada manutenção do corpo luteo na fase de transição estacional dos animais. Porém, na estação reprodutiva, a aplicação de eCG parece refletir em parâmetros reprodutivos inferiores, embora mais estudos se façam necessários para confirmar estes achados.

7. Conclusão

A utilização de dispositivo intravaginal contendo 1,9g de progesterona permitiu adequado controle folicular, tanto na estação de transição como na estação reprodutiva. Porém, o desempenho ovulatório dos animais no verão foi superior ao dos animais em transição primaveril.

A aplicação de eCG no momento da retirada do implante de progesterona atrasou o momento da regressão luteal das éguas no período de transição, porém, sua aplicação se apresentou indiferente para as éguas da estação reprodutiva.

8. Referências Bibliográficas

- AGGARWAL, B.B., PAPKOFF, H (1981). Studies on the disappearance of equine chorionic gonadotrophin from the circulation in the rat: Tissue uptake and degradation. *Endocrinol.* 109, 1242-1247.
- ALLEN W.R., WILSHER S., TURNBULL C., STEWART F., OUSEY J., ROSSDALE P.D., FOWDEN A.L (2002). Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. *Development in utero. Reproduction*, 123, 445-453.
- ALLEN, W.R (1969). Factors influencing pregnant mare serum gonadotrophin production. *Nature* 223, 64-66.
- ALLEN, W.R (2005). The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 40, p. 310-329.
- ALLEN, W.R., GOWER, S., WILSHER, S (2007) Immunohistochemical localisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-1 and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 516-526.
- ALLEN, W.R., SKIDMORE, J.A., STEWART, F., ANCTZAK, D.F (1993). Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. *J. Reprod. Fert.* 97, 55-60.
- ALLEN, W.R., URWIN, V., SIMPSON, D.J., GREENWOOD, R.E., CROWHURST, R.C., ELLIS, D.R., RICKETTS, S.W., HUNT, M.D., DIGBY, N.J (1980). Preliminary studies on the use of an oral progestagen to induce estrus and ovulation in seasonally anestrous Thoroughbred mares. *Equin. Veterinary Journal*, v.12, p.141-145.
- ALVARENGA, M. A (1989). Efeito de alguns fatores sobre índices de coleta e transferência de embriões em eqüinos. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu.
- ALVARENGA, M.A (2010). Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v.38, p.319-333.
- ARBEITER, K., BARTH, U., JOCHLE, W (1994). Observations on the use of progesterone intravaginally and of deslorelin sti in acyclic mares for induction of ovulation. *J. Equine Vet. Sci.* v.14, n.1, p.21-25.
- AURICH, C., BUDIJK, S (2015). Early pregnancy in the horse revisited – does exception prove the rule? *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.6, n. 50 p. 1-8.
- BARREIROS, T.R., BLASCHI, W., SANTOS, G.M., MOROTTI, F., ANDRADE, E.R., BARUSELLI, OS., SENEDA, M.M (2014). Dynamics of follicular growth and

progesterone concentrations in cyclic and anestrus sucking Nelore cows (*Bos indicus*) treated with progesterone, equine chorionic gonadotropin, or temporary calf removal. *Theriogenology*, v.81, p.651-656.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD A.P., RAWLINGS N.C (1999). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, v.52, p.115-130.

BARUSELLI, P.S., JACOMINI, J.O., SALES, J.N.S., CREPALDI, G.A (2008). Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3, 2008, Londrina, PR. Anais... Londrina: SIRAA, p.146-167.

BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., MADUREIRA, E.H., COSTA NETO, W.P., GRANDINETTI, R.R; BÓ, G.A. (2000) Ovarian superovulation in embryo recipients to improve the number of corpus luteum, progesterone concentration and pregnancy rates. *Acta Sci Vet*, v.28, p.218.

BARUSELLI, P. S., JACOMINI, J. O., SALES, J. N. S., CREPALDI, G. A (2008). Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3, 146-167.

BARUSELLI, P. S., REIS, E. L., MARQUES, M. O., NASSER, L. F; BÓ, G. A (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, 82, 479-486.

BERGFELT, D.R (2009). Anatomy and physiology of the mare. In: SAMPER, J.C. 2ed. *Equine breeding management and artificial insemination*. Missouri: Saunders Elsevier, 113-131p.

BERGFETL, D., ADAMS, G (2011). Luteal Development. In: MCKINNON, A. et al. *Equine Reproduction*. 2. ed. p. 2055–2064.

BISINOTTO, R. S., IBIAPINA, B. T., PONTES, E. O., BERTAN, C. M., SATRAPA, R., BARROS, C. M., BINELLI, M (2012). Luteal Function and Follicular Growth Following Follicular Aspiration During the Peri-Luteolysis Period in *Bos indicus* and Crossbred Cattle. *Reproduction in domestic animals*, 47(2), 319-327.

BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D., SCHUMACHER, J., LOVE, C.C (2003). *Manual of Equine Reproduction*. St Luis: Mosby.

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

BOTELHO, J.H.V (2012). Indução hormonal de estro regular em éguas mangalarda marchador em transição primaveril. Dissertação (mestrado) em Ciências Veterinárias, 39p. Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras.

BRADEN, T.D., SAWYER, H.R., NISWENDER G.D (1989). Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. *J Reprod Fertil*, v.86, p.525-533.

BRENDEMUEHL, J. P (2002). Effect of oxytocin and cloprostenol on luteal formation, function and pregnancy rates in mares. *Theriogenology*, v. 58, p. 623–626.

BRINSKO, S. P (2011). Semen Collection Techniques and Insemination Procedures; In: McKINNON, A. O. et al. *Equine reproduction*. 2^a ed. Oxford: Wiley-Blackwell, v.2, cap. 123, p.1275-1276.

BRITO, L., BALDRIGHI, J., WOLF, C., GINTHER, O (2017). Effect of GnRH and hCG on 464 progesterone concentration and ovarian and luteal blood flow in diestrous 465 mares. *Anim Reprod Sci*; 176:64.

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

CAMPOS, J.T., MARINHO, L.S.R., LUNARDELLI, P.A., MOROTTI, F., SENEDA, M.M (2013). Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v.80, p.619-623.

CANISSO, I. F., GALLACHER, K., GILBERT, M. A., KORN, A., SCHWEIZER, C. M., BEDFORD-GUAUS, S. J., GILBERT, R (2013). O.Preovulatory progestagen treatment in mares fails to delay ovulation. *The Veterinary Journal*, 197(2), 324-328.

CARLUCCIO, A., PANZANI, S., COUNTRI, A., TOSI, U., AMICIS, I., VERONESI, M.C (2008). Luteal function in jennies following PGF_{2α} treatment 3 days after ovulation. *Theriogenology*, v. 70, p. 121–125.

CARNEVALE, E.M., RAMIREZ, R.J., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A., MCCUE, P.M (2000). Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.54, p.965-979.

CARVALHO, C.F.P.M., BORBA, H.R., RIBAS, J.A.S., BARROS, R.R (2011). Diagnóstico bacteriológico, citológico e histopatológico da endometrite equina. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 18, n. 1, p. 19-22.

- CATCHPOLE, H.R., COLE, H.H., PEARSON, P.B (1935). Studies on the rate of disappearance and fate of mare gonadotrophic hormone following intravenous injection. *Am. J. Physiol.* 112, 21-26.
- CHINAIT, J., CABRAL, C., GUALTIERI DE ANDRADE, E., NICHI, M (2008). Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. *Rev Bras Reprod Anim*, 32(2), 122-132.
- CHRISTENSEN, A.C.M., HARESIGN, W., KHALID, M (2014). Progesterone exposure of seasonally anoestrous ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles. *Theriogenology*, v.81, p.358-367.
- CLAYTON, H.M., LINDSAY, F.E.F., FORBES, A.C., HAY, L.A (1981). Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. *Applied Animal Ethology*, v. 7, p. 169-174.
- COLE, H.H., BIGELOW, M., FINKEL, J. AND RUPP, G.R (1967). Biological half-life of endogenous PMS following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinol.* 81, 927-930.
- CONSTANZO, L. S (1999) *Fisiologia*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 392p.
- CUERVO-ARANGO, J., CLARK, A (2010). The first of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). *Animal Reproduction Science*, v.118, p. 265-269, april.
- DIAS, L.M.K (2011). Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de 9 dias de sincronização de estros em ovelhas Santa Clara. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, São Paulo, Brasil, 96 p.
- DINGER, J.E., NOILES, E.E., BATES, M.J.L (1981). Effect of progesterone impregnated vaginal sponges and PMSG administration on estrus synchronization in mares. In: *Scientific Contribution N. 874*, Storrs Agricultural Experiment Station, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, v.16, n.2.
- DONADEU, F. X., GINTHER, O. J (2002). Follicular waves and circulating concentration of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction*, v. 124, p. 875-885.
- DONADEU, F.X., WATSON, E.D (2007). Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. *Animal Reproduction Science*, v.100, n.3-4, p.225-242.

ERENO, R.L., BARREIROS, T.R.R., SENEDA, M.M., BARUSELLI, P.S., PEGORER, M.F., BARROS, C.M (2007). Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica equina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.1288-1294.

EVANS, A.C.O., KOMAR, C.M., WANDJI, A.S., FORTUNE, J.E (1997). Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, Madison, v.57, p.394-401.

FACKLAM, R (2002). What happened to Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, n. 4, p. 613-630.

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

FLORES-FLORES, G., VELÁZQUEZ-CANTÓN, BOETA, M., ZARCO, L (2014). Luteoprotective Role of Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) During Pregnancy in the Mare. *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 420-426.

FURUKAWA, K., FUJIWARA, H., SATO, Y., ZENG, B., FUJII, H., YOSHIOKA, S., NISHI, E., NISHIO, T (2007). Platelets are novel regulators of neovascularization and luteinization during human corpus luteum formation. *Endocrinology*, v. 148, n. 7, p. 3056–3064.

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

GINTHER, O.J., RODRIGUES, B.L., FERREIRA, J.C., ARAUJO, R.R., BEG, M.A (2008). 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. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.684-693.

GINTHER, O.J., WOODS, B.G., MEIRA, C., BEG, M.A., BERGFELT, D.R (2003). Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. *Reproduction*, v.126, p.653-660.

GINTHER, O. J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., UTT, M.D., BEG, M.A (2006). Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal* 398.

- GINTHER, O. J., BEG, M.A., NEVES, A.P., MATTOS, R.C., PETRUCCI, B.P.L., GASTAL, M.O., GASTAL, E.L (2008). Miniature ponies: Endocrinology of oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*. V. 20, p. 386-390.
- GINTHER, O. J (1992). *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*, 2ed, Wisconsin: Equiservices Publishing. 642p.
- GINTHER, O. J (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.61-79.
- GINTHER, O. J., HANNAN, M. A., BEG, M. A (2011). Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF 2α , progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 41, p. 174–184.
- GINTHER, O. J (1990). Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J. Reprod. Fert.* v.90, p.311-320.
- GINTHER, O. J (1985). In: *Ultrasound imaging and reproductive events in the mare*. Madison: Equiservice, 377p, 1985.
- GINTHER, O. J (1992). *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*, 2nd ed. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, USA, pp.136–170.
- GINTHER, O. J., FIRST, N.L (1971). Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *American Journal of Veterinary Research*, v. 32, p. 1687-1691.
- GIOMETTI, I.C., CASTILHO, A.C.S., SÁ FILHO, O.G., PAPA, P.C., BURATINI, J.R. J (2009). Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. *Rev Bras Repr Anim*, v.33, p.34-52.
- GONZÁLEZ, F. H (2002). *Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária*. Porto Alegre: UFRGS.
- GRECO, G.M (2010). Avaliação de novos protocolos visando induzir e sincronizar a ovulação em éguas. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- GURGEL, J. R. C., VIANA, C. H. C., PEREZ, E. G. A., NICHI, M (2008). Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, p. 122-132.
- HAETINGER, C (2008). Uso comparativo de progesterona sintética P4 e PGF 2α na sincronização de cio em éguas da raça crioula. In: *Proceeding... 17th Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas*.
- HAFEZ, E. S. E (2004). *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 513p.

- HAFEZ, E. S. E., Jainudeen, M. R., Rosnina, Y (2004). Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. *Reprodução animal*, 7, 33-53.
- HALL, C.M (2003). Applied physiology: the control of puberty. *Current Paediatrics*. 13, 371—375.
- HANDLER, J., SCHONLIEB, S., HOPPEN, H.O., AURICH, C (2007). Influence of reproductive stage at PRIDTM insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Animal Reproduction Science*, n.97, p 382-393.
- HANLON, D. W., FIRTH, E. C (2012). The reproductive performance of Thoroughbred mares treated with intravaginal progesterone at the start of the breeding season. *Theriogenology*, 77(5), 952-958.
- HANLON, D.W., EVANS, M.J., FIRTH, E.C (2010). Effect of intravaginal progesterone on follicular dynamic and FSH, LH and progesterone concentrations in transitional mares. *Animal Reproduction Science*, 121S, p.32-34.
- HART, P. J., SQUIRES, E. L., IMEL, K. J., NETT, T. M (1984). Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin release hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH and pituitary content of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the mare. *Biology of Reproduction*, v. 30, p. 155-162.
- KHAN, T.H., HASTIE, P.M., BECK, N.F.G., KHALID, M (2003). hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. *Anim Reprod Sci*, 76, 81–89.
- KLUG, E., JOCHLE, W (2001). Advances in synchronizing estrus and ovulations in the mare: a mini review. *J. Equine Vet. Sci.* v.21, n.10.
- KULICK, L.J., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J (1999). Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, New York, v.52, p.913-921.
- LEBLANC, M. M (2005). An approach to the diagnosis of infertility in the mare. *Proceedings of the NAVC, North American Veterinary Conference*. Orlando, Florida, p. 216-219. Disponível em: <www.ivis.org>
- LEFRANC, A. C., ALLEN, W. R (2007). Endometrial gland surface density and hyperaemia of the endometrium during early pregnancy in the mare. *Equine vet. J.* v. 39, n. 6, p.511-515.
- LEITÃO, C. C. F., BRITO, I. R., FROTA, I. M. A., SILVA, J. R. V (2009). Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, p. 215-224.

- LOVE, C. C (2011). Endometrial Biopsy; In: McKINNON, A. O. et al. Equine reproduction. 2ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell, v.2, cap. 205, p.1929-1939.
- MALPAUX, B., VIGUIÉ, C., SKINNER, D.C., THIÉRY, J.C., PELLETIER, J., CHEMINEAU, P (1996). Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci*, 42, 109-117.
- MALPAUX, B., THIE'ry, J.-C., CHEMINEAU, P (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*. v.39, p.355– 366.
- MALSCHITZKY, E., MATTOS, R. C (2015). Efeito da endometrose no potro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.123-128.
- MANNING, A.W., RAJKUMAR, K., BRISTOL, F., FLOOD, P.F., MURPHY, B.D (1987). Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35, 389-397.
- MARCOLONGO-PEREIRA. C., ADRIEN, M.L., LADEIRA, S. R. L., SOARES, M.P., BRASIL, N.D.A., SCHILD, A.L (2012). Abortos em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul: estudo de 72 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 32(1):22-26.
- MARTINUK, S.D., BRISTOL, F., MURPHY, B.D (1990). Effects of the dam on equine chorionic gonadotropin concentrations during pregnancy. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 551-557.
- MAZIEIRO, R.R.D., MARTIN, I., MATTOS, M.C.C., FERREIRA, J.C.P (2012) Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. *Vet. e Zootec.*, v.19(3), p.366-372.
- MCCUE, P.M., MCKINNON, A,O (2011). Ovarian Abnormalities. In: McKinnon AO et al. *Equine Reproduction*. 2nd ed. Oxford: Wiley Blackwell. 2803-2819.
- MCCUE, P. M (2003). Induction of ovulation. In: ROBINSON, N.E. *Current therapy in equine medicine 5*. Philadelphia: Saunders, chap. 5.7, p. 240-242.
- MCCUE, P.M., HUDSON, J.J., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L (2004). Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: 50TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS.
- MCCUE, P.M (1996). Superovulation. In: Squires EI., editor. *Veterinary Clinics of North America. Equine Pract:Diagn Tech Assist Reprod Technol*; 12 (1); 1 13

McDOWELL, K. J., SHARP, D. C (2011). Maternal Recognition of Pregnancy; In: McKINNON, A. O. et al. Equine reproduction. 2^a ed. Oxford: Wiley-Blackwell, v.2, cap. 227, p.2200-2210.

MCKINNON, A. O., VOSS, J. L (1993). Equine Reproduction. 1ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1137p.

MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L (1988). Equine embryo transfer. Veto Clin. North Am. Equine Pract., v.4, p.305-33.

MEIDAN, R., GIRSH, E., MAMLUK, R., LEVY, N., FARBEROV, S (2017). Luteolysis in ruminants: Past concepts, new insights, and persisting challenges. In: MEIDAN, R. (Ed.). The life cycle of the corpus Luteum. Springer I ed. Jerusalem: [s.n.]. p. 159–182.

MOHKARI, A., KAFI, M., ZAMIRI, M. J., AKBARI, R (2016). Factors affecting the size of ovulatory follicles and conception rate in high-yielding dairy cows. Theriogenology, Shiraz, v. 85, p. 747-753.

MONGIAT, M., ANDREUZZI, E., TARTICCHIO, G., PAULITI, A (2016). Extracellular matrix, a hard player in angiogenesis. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 11, p. 1–26.

MURPHY, B.D., MARTINUK, S.D (1991). Equine chorionic gonadotrophin. Endocrine Rev, v.12, p.27-44.

MORGAN, P. J., HAZLERIGG, D. G (2008). Photoperiodic signaling through the melatonin receptor turns full circle. Journal of Neuroendocrinology, v. 20, p. 820-826.

MÜLLER, K., ELLENBERGER, C., SCHOON, H. A (2009). Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. Research in Veterinary Science, v. 87, n. 3, p. 421–431.

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

NAGY, P., GUILLAUME, D., DAELS, P (2000). Seasonality in mares. Animal Reproduction Science, v. 60/61, p.245–262.

NEWCOMBE, J. R., HANDLER, J., KLUG, E., MEYERS, P.J., JOCHLE, W (2002). Treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or hCG to assist ovulations. Journal of Equine Veterinary Science, v. 22, n. 2, p. 57-64.

NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K., MCINTUSH EW (2000). 424 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiol 425 Rev;80:1-29.

OKADA, A., KAMADA, S., JEON, C.W., MIYAMOTO, A., FUKUI, Y (2000). Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, p.397-402.

OKÓLSKI, A., BEZARD, J., DUCHAMP, G., DRIANCOURT, M., GOUDET, G., PALMER, E (1995). Successive Puncture of the Dominant Follicle followed by Ovulation and Fertilization: A New Experimental Model for the Study of Follicular Maturation in the Mare. *Biology of Reproduction*, v. 52, n. monograph_series1, p. 385–392.

OLIVEIRA FILHO, L. R., DANEZE, E. R., D'AURIA, E., SCHUTZER, C, G (2012). Efeito do implante intravaginal de progesterona sobre a ciclicidade de éguas em anestro da raça quarto de milha. *Nucleus Animalium*, v. 4, n. 2, p. 113-119.

OLIVEIRA, M.E.F., BARTLEWSKI, P.M., FELICIANO, M.A.R (2013). Controle do ciclo estral. In: Oliveira MEF, Teixeira PPM, Vicente WRR. (Eds). In: *Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos*. São Paulo: MedVet, p.71-89.

PALMER, E. GUILLAUME, D (1992). Photoperiodism in the equine species—what is a long night? *Animal Reproduction Science*, v.28, p.21–30.

PINTO, C.R.F (2011). Progestagens and Progesterone. In: McKinnon AO et al. *Equine Reproduction*. 2nd ed. Oxford: Wiley Blackwell.; 1811-1819.

PRESS, M. F., UDOVE, J. A., GREENE, G. L (1988). Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *The American journal of pathology*, 131(1), 112.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAO, C. V., LEI, Z. M. (2007). The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Molecular and cellular endocrinology*, 269(1-2), 2-8.

REDMER, D. A., REYNOLDS, L. P (1996). Angiogenesis in the ovary. *Reviews of reproduction*, v. 1, n. 3, p. 182–92.

BANDEIRA, S. R (2018). Uso de implante intravaginal de progesterona no período transicional de éguas da raça Crioula. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 15, 177-178.

SÁ FILHO, O.G., VASCONCELOS, J.L.M (2008). Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. *Rev Vet e Zootec*, v.15, p.220-233.

SÁ FILHO, M. F. D., CRESPILO, A. M., SANTOS, J. E. P., PERRY, G. A., BARUSELLI, P. S (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous

response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), 23-30.

SAMPER, J.C., JENSEN, S., SERGEANT, J., ESTRADA, A (2002). Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 22, p. 320-323.

SCHUTZER, C. G. D. C (2012). Utilização do implante de progesterona intra-vaginal e acetato de deslorelina em éguas acíclicas associados ou não a luz artificial para o controle da sazonalidade reprodutiva.

SENGER, P. L (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2ed. Washington: Current Conceptions, 368p.

SHARP, D.C (1980). Environmental influences on reproduction in horses. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice*, v. 2, p. 207–223.

SHRESTHA, K (2018). *Corpus Luteum Formation*. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc.

SISK, C.L., FOSTER, D.L (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience*. 7: 1040–1047.

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

SQUIRES, E.L., SHIDELER, R.K., VOSS, J.L., WEBEL, S.K (1983). Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. *J Anim Sci*, 56, 901-910.

STAEMPFLI, S. A., CLAVIER, S., THOMPSON, D. L (2011). O. Effect of a single injection of long-acting progesterone on the first ovulation in early and late spring transitional mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 31, n.1, p. 744-748.

STOCCO, C., TELLERIA, C., GIBORI, G (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 1, p. 117–149.

SUNDERLAND, S.J., CROWE, M.A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F., IRELAND, J.J (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.101, p.547-555.

TROEDSSON, M. H. T., ABABNEH, M. M., OHLGREN, A. F., MADILL, S., VETSCHER, N., GREGAS, M (2001). Effect of periovulatory prostaglandin F2a on pregnancy rates and luteal function in the mare. *Theriogenology*, v. 55, p. 1891–1899.

ULBRICH, S. E., KETTLER, A., EINSPANIER, R (2003). Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 84(2-3), 279-289.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F., SOUZA, M. I. L., OSORIO, J. H (2010). Resposta ovariana de cabras submetidas a implantes de progesterona seguidos de aplicações de gonadotrofina coriônica equina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(6), 1214-1222.

WECKER, F., THEDY, D.X., GONSIOROSKI, A.V., BORGES, J.B.S. (2012). Efeito da aplicação de eCG ou hCG 7 dias após a IATF no desenvolvimento das estruturas ovarianas e nas taxas de prenhez de vacas de corte. *Acta Sci Vet*, v.40, p.1072.

WILSHER, S., ALLEN, W. R (2011). Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. *Equine veterinary journal*, 43(4), 430-438.

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

XIAO, C.W., GOFF, A.K (1999). hormonal regulation of estrogen and progesterone receptor in culture bovine endometrial cells. *Journal of reproduction and fertility*, v.115, p.101-109.

ZAVY, M.T (1979). An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fert Suppl* 27, p.403-11

9.0 Anexos

Anexo 1:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Características reprodutivas de éguas sincronizadas com implante intravaginal de progesterona associado ou não ao eCG", protocolo do CEUA: 57/2018 sob a responsabilidade de Leticia Zoccolaro Oliveira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2018.

Vigência da Autorização	21/05/2018 a 20/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Equídeo / mestiço (SRD)
Nº de animais	15
Peso/idade	450kg / 4(anos)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda
*Espécie/linhagem	Equídeo / mestiço (SRD)
Nº de animais	15
Peso/idade	450kg / 4(anos)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda

Considerações posteriores:

21/05/2018	Aprovado com recomendação na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) recomenda-se utilizar uma análise estatística com um delineamento em parcelas subdivididas no tempo, pois um efeito temporal será introduzido (estação reprodutiva favorável e desfavorável), e geralmente ele participa do ensaio como subparcela. Entretanto é necessário atenção com a homocedasticidade exigida pela análise de variância (Ver Capítulo 11 - Estatística Aplicada à Experimentação Animal - Ivan Barbosa M. Sampaio).
------------	--

Belo Horizonte, 17/01/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Anexo 2:



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Pró-reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA PUC Minas

PARECER DA CEUA PUC MINAS

Protocolo no. 017/2018

Título: "Características reprodutivas de éguas sincronizadas com implante intravaginal de progesterona associado ou não ao eCG"

Responsável: Prof. Guilherme Ribeiro Valle

Curso de Origem: Medicina Veterinária – Unidade Betim

Parecer da CEUA PUC MINAS: Aprovado

Data da Reunião: 02.07.2018

Belo Horizonte, 03 de julho de 2018.

A handwritten signature in black ink, reading 'Gisele Pires M. Dantas'.

Profa. Gisele Pires de Mendonça Dantas
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais –
CEUA PUC Minas