

## USO DA eCG PARA FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO EQUINO E PRODUÇÃO DE PROGESTERONA

Tiago Gomes RODRIGUES<sup>1</sup>, José Frederico Straggiotti SILVA<sup>1</sup> e Bruni FAGUNDES<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense. CCTA/LRMGA. Campos dos Goytacazes, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Nova Iguaçu. Profº UNIG. Itaperuna. Brasil.

\*Autor para correspondência. tiagomvet@hotmail.com

### RESUMO

Este estudo foi conduzido com a finalidade de avaliar o uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) logo após a ovulação de éguas com o objetivo avaliar a formação do corpo lúteo e produção de progesterona. Utilizou-se 50 éguas durante 2 estações de monta 2011/2012 e 2012/2013. Com auxílio da ultrassonografia as éguas foram monitoradas as características dos órgãos genitais durante o estro até o dia da ovulação (D0) e no diestro em D2, D4 e D8. O experimento foi dividido em 2 tratamentos: **Tratamento I** (n=25) – éguas com ovulação natural e **tratamento II** (n=25) – éguas com ovulação induzida. Verificada a ovulação, os tratamentos foram sub divididas em 5 grupos de 5 animais, obedecendo a administração do fármaco estudado (eCG), sendo **GI**: controle; **GII**: 250 UI eCG no DO; **GIII**: 250 UI eCG no DO + 250 UI eCG no D2; **GIV**: 500 UI no Do; e **GV**: 500 UI eCG no D0 + 500 UI no D2. Para a avaliação do efeito dose resposta do fármaco e influência do eCG sob a glândula luteínica, foram coletados os dados: tônus uterino, ecogenicidade e tamanho do corpo lúteo (CL) e concentração de progesterona. Na análise estatística somente quando comparando o GV entre os dois tratamentos há diferença estatística para o D8 na concentração de progesterona. Portanto o uso da eCG no momento da ovulação, não produziu efeito significativo esperado, mas este trabalho inicial abre portas para novas investigações a respeito desta biomolécula, e que venha contribuir na biotecnologia reprodutiva equina.

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

### ABSTRACT

**Use of eCG training corps luteum equine and production of progesterone.** This study was conducted to evaluate the use of equine chorionic gonadotropin ( eCG ) after ovulation in mares in order to evaluate the formation of the corpus luteum and progesterone production . We used fifteen mares during two breeding seasons 2011/2012 and 2012/2013 . With the aid of ultrasound mares were monitored characteristics of the genitals during estrus to ovulation day (D0 ) and diestrus in D2 , D4 and D8 . The experiment was divided into 2 treatments : **Treatment I** ( n = 25 ) - mares with natural ovulation and **treatment II** ( n = 25 ) - mares with induced ovulation. Verified ovulation , the treatments were sub divided into 5 groups of 5 animals , following administration of the study drug ( eCG ) and **GI** : control , **GII** : 250 IU eCG on DO ; **GIII** : 250 IU eCG at 250 IU eCG + OF D2 ; **GIV** : From the 500 IU , and **GV** : 500 IU eCG + 500 IU D0 in the D2 . Uterine tone , echogenicity and size of the corpus luteum ( CL ) and progesterone concentration : For the evaluation of the dose response effect of drug and influence of eCG in the luteal gland, the data were collected . Statistical analysis only when comparing the GV between the two treatments there is statistical difference for the D8 progesterone levels . Therefore the use of eCG at the time of ovulation , produced no significant

effect expected , but this early work opens the door to further investigations regarding this biomolecule , and that will contribute in equine reproductive biotechnology.

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

## 1 – Introdução

A reprodução equina tem vindo a crescer exponencialmente nas últimas duas décadas, tanto em adeptos e quantidade de trabalho na área da biotecnologia assistida. Segundo a última publicação em 2012 do Comitê Estatístico da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), coloca o Brasil como o segundo maior produtor de embriões equinos do mundo, perfazendo mais de 12.000 inovulações, concentradas na região sudeste do país, com cerca de 40 centros de transferência de embriões eqüinos (TEE) registrados. Apesar do notório desenvolvimento, aperfeiçoamento e elevadas taxas de concepção aplicadas à espécie em assunto, sua aplicação comercial ainda é muito atrasada em relação a seu uso em bovinos, ovinos e suínos (RIERA, 2009).

Dos fatores que influenciam diretamente na TEE são eles, a qualidade do sêmen do garanhão, o dia da coleta, qualidade embrionária e um dos mais importante a ser considerado é a escolha da receptora e/ou barriga de aluguel apta a gestar o embrião, pois para uma boa seleção deve-se respeitar o limite de idade, o tamanho do animal, escore corporal, sanidade, estado reprodutivo, habilidade materna, docilidade, parâmetros indispensáveis ao sucesso da taxa de prenhez e redução da perda embrionária precoce, representando um empecilho de quase todos os programas de TEE. O manejo e alojamento das receptoras são sem dúvida um dos itens mais caros no planejamento econômico em um centro de reprodução, estando cada vez mais escassas pelo aumento exponencial da demanda, além da necessidade de grandes áreas para sua manutenção, o que mostra relevante o incremento em pesquisas direcionadas a eficiência da técnica no item relação doadoras/receptoras.

Pesquisadores há oitenta e quatro anos, descreveram que o soro de éguas prenhes estimulava o aumento do peso ovariano e o desenvolvimento sexual em ratas impúberes. A glicoproteína responsável por tal estímulo foi denominada PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrofin), com a evolução dos estudos imuno-histoquímicos, verificou-se que tal hormônio é sintetizado durante a gestação após a migração das células trofoblásticas do concepto para o endométrio materno, que formam os cálices endometriais (WOODING et al. 2001). Considerando a origem embrionária do PMSG e a semelhança de sua estrutura molecular com a gonadotropina coriônica humana (hCG), tal hormônio glicoprotéico tem sido designado, modernamente, de eCG (equine Chorionic Gonadotrofin). Nos eqüinos, a eCG é fundamental para a manutenção da prenhez, pois estimula a formação de corpos lúteos acessórios, mantendo a síntese de progesterona durante o período inicial da gestação, onde a placenta ainda não é capaz de sintetizá-la.

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

Portanto, o objetivo deste estudo consiste em expor o papel do eCG na reprodução equina, com intuito de formular hipóteses para uso deste hormônio na biotecnologia reprodutiva equina, fato este que tornaria o uso deste hormônio uma ferramenta fundamental em programas de reprodução equina assistida.

## **2 – Materiais e Métodos**

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

Todo o trabalho de amostragem (coletas e transferências) foi realizado durante duas estações de monta entre os meses de setembro/março de 2011/2012 e 2012/2013. Cinquenta (50) éguas, com idade variando de três a dezesseis anos e condição corporal compatível com a atividade reprodutiva foram utilizadas durante o experimento sendo mantidas em regime de campo, com pastagem de gramínea, água e sal mineral ad libidum, sendo suplementadas diariamente com volumoso e concentrado em bretes com cochos individuais.

### **2.1- Delineamento experimental**

As éguas foram divididas em 2 tratamentos: Tratamento I – éguas monitoradas sem indução da ovulação; Tratamento II – éguas cuja ovulação foi induzida com a administração endovenosa de 1 mg de acetato de deslorelina (análogo do GnRH). Verificada a ovulação os animais foram então sub divididos em 5 grupos, obedecendo a administração do fármaco, sendo para o tratamento I, éguas (25) sem indução da ovulação: controle, 250 UI eCG no DO, 250 UI eCG no DO + 250 UI eCG no D2, 500 UI no Do e 500 UI eCG no D0 + 500 UI no D2. O tratamento II seguiu a mesma ordem da sub divisão, a diferença foi a realização da indução da ovulação em todos os animais.

Determinada a ovulação das éguas em estudo e a administração do fármaco de acordo com o grupo que elas se encontravam, foi determinado o dia da coleta das amostras onde o D0 (dia da ovulação), D2 (dois dias após a ovulação), D4 (quatro dias após a ovulação) e D8 (oito dias após a ovulação). A coleta das amostras sanguíneas foi realizada no próprio brete de contenção, as características do trato reprodutivo foram avaliadas e minuciosamente anotadas, para posterior avaliação e comparação com a quantificação hormonal.

### **2.2 - Exame clínico dos órgãos reprodutivo**

Os animais foram monitorados através de ultrassonografia (US) de 48 em 48 horas a partir da detecção de comportamento de o cio e no momento que a égua apresentou um folículo  $\geq 35$  mm e um edema uterino grau 3; este intervalo de exame passou a ser de 12 em 12 horas até a ovulação. O exame dos órgãos genitais foi executado no próprio brete de suplementação

alimentar. O acompanhamento do trato reprodutivo, por meio de ultra-sonografia, Midray 2200vet® acoplado a um transdutor transretal linear de 5,0 MHz, auxiliou na avaliação da dinâmica folicular até a ovulação e posterior observação das características dos órgãos reprodutivos, nos respectivos dias de coleta sanguínea e avaliação reprodutiva, tais como: tamanho, morfoecogenicidade de corpo lúteo, tônus uterino, dissipação de edema e cérvix dos animais em estudo.

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

### **2.2.1 - Qualidade do corpo lúteo.**

Com intuito do acompanhamento e monitoramento da morfologia e ecogenicidade do corpo lúteo do D0 ao D8, imagens ultrassonográficas realizadas dos animais, foram capturadas e avaliadas. No quarto dia pós ovulação (D4) a imagem do corpo lúteo foi capturada e realizada a mensuração dos dois maiores diâmetros do CL, com a media destas duas aferições foi determinação do tamanho médio (mm) do corpo lúteo.

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

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

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

### **2.2.2 – Tônus uterino**

Para o desenvolvimento da turgidez uterina na égua está comprovada a necessidade de uma adequada produção de progesterona (KAMADA et al., 2011). A contratilidade uterina é determinada por meio de avaliação contínua do corpo uterino, visualizando uma secção longitudinal durante 1 minuto, com base nos movimentos de vai-e-vem dos pontos de reflexão do endométrio ou dos movimentos de onda observados na superfície ventral do corpo uterino (SILVA, 2003). A classificação do tônus uterino baseou-se na palpação do tecido uterino e com a complementação visual da imagem ecográfica do lúmen, conforme Rodrigues et al. (2012) que classifica o tônus uterino em uma escala de 4 diferentes graus:

- ✓ **Tônus 1-** Mínimo tônus verificado do anestro até o início da atividade cíclica. O formato e consistência do útero não são bem definidos ao exame de palpação retal.

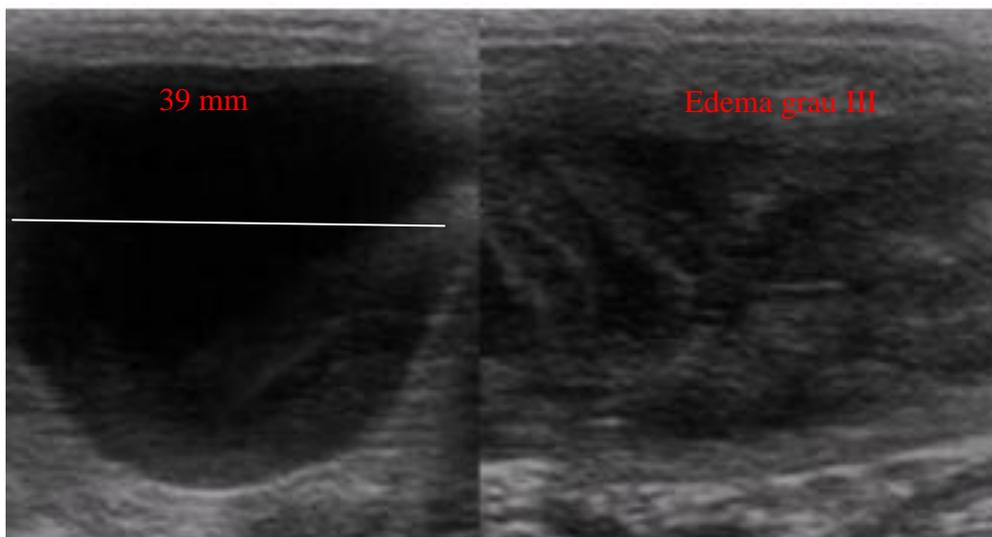
- ✓ **Tônus 2-** O tônus proporcionado pela fase estrogênica do ciclo estral (estro), com útero de consistência macia e formato quase tubular. As contrações do útero ainda não são perceptíveis ao toque.
- ✓ **Tônus 3-** O tônus da fase progesterônica do ciclo estral (diestro). O útero apresenta formato tubular bem definido, com aumento do tônus e consistência. As contrações uterinas são perceptíveis.
- ✓ **Tônus 4-** Máximo tônus do início da prenhez, após o décimo terceiro dia. As contrações uterinas são ainda mais perceptíveis. O útero mantém formato tubular e consistência mais firme.

### 2.2.3- Cervix

A cérvix no mesmo exame do trato reprodutivo foi verificada quanto a abertura ou o fechamento, pois de acordo com o toque retal realizado suas características eram anotadas. Verificada a flacidez, mudança de formato ao toque, características resultantes de uma baixa tonicidade, tínhamos uma cervix aberta e quando à cervix palpada apresentando formato tubular e consistência firme evidenciando uma alta tonicidade, tínhamos uma cervix fechada, podendo ser resultado da ação de progesterona no diestro e ou gestação.

### 2.2.4 - EDEMA UTERINO

A ecotextura uterina visualizado pela ultrassonografia foi classificada baseada no grau de edema das pregas endometriais e utilizando uma escala de escore que varia de 0 (ausência de edema) a 3 (grau máximo de edema, pico da fase estrogênica), fez-se a classificação e seleção das éguas (n=50) para a análise da hipótese proposta, animais que em estro (1 ou mais folículos  $\geq 35$  mm) apresentaram edema uterino grau 3 (fig. 1).



**Figura 1** – Associação da dinâmica folicular e ecogenicidade uterina (Fonte: Imagem US Midray 2200vet: autor)

### **2.3. – Dosagem progesteronica**

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular em tubos para coleta a vácuo tampa vermelha sem anti-coagulante. Realizada a coleta da(s) amostra(s), o(s) tubo(s) foi acondicionado em caixa isotérmica 8°C a 2°C e em seguida transportada para o laboratório de reprodução e melhoramento genético animal – LRMGA/CCTA/UENF. Chegada as amostras no laboratório, os tubos foram preparados para centrifugação (600g/10 minutos).

Após a centrifugação das amostras, o soro foi alíquotado em tubo Eppendorf®, volume de 2 mL, sempre em duplos exemplares, identificados e congelados em freezer a -20°C. No momento em que todas as amostras foram colidas, foi realizada a dosagem progesteronica, pela técnica de radioimuneensaio (RIE) em fase sólida. Um o conjunto diagnóstico comercial desenvolvido para dosagem hormonal de progesterona em soro humano (Immunotech® Beckman Coulter Laboratories, Marseille, France), foi validado e utilizado para dosagem progesterona, sendo os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante (ALAÇAM et al., 2009).

### **3- Análise estatística**

Para a metodologia da análise estatística do referido experimento, fez-se necessário a divisão de 2 tratamentos, resultando em duas variáveis independentes. Cada tratamento foi dividido em 5 unidades experimentais e/ou grupos diferindo pela administração ou não de um fármaco em concentração e dias diferentes, onde a concentração de progesterona (P4), tônus uterino, ecogenicidade e tamanho do corpo lúteo (CL), foram as variáveis aleatórias contínuas avaliadas de cada indivíduo dentro de cada unidade experimental, sendo realizada 5 repetições independentes para cada grupo estudado. Com um número de 50 animais avaliados para estudo da hipótese proposta.

Os resultados que envolvem frequência foram apresentados em tabelas de frequência, com número absoluto e a proporção dos casos observados. As características de concentração de progesterona, tônus uterino, tamanho e a morfoecogenicidade dos corpos lúteos foram estudados através de análises de variância pelo método dos quadrados mínimos, enquanto comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey. As análises de variância foram realizadas pelo aplicativo Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância.

### **4 - Resultados e Discussão**

As informações obtidas com a avaliação dos tecidos e órgãos do sistema reprodutivo equino através da ultrassonografia foram compilados e os resultados de distribuição e frequência das características de ecogenicidade, de morfo-ecometria dos corpos lúteos e o tônus uterino das éguas avaliadas (n=50), no quarto dia pós ovulação (D4) são apresentados nas tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

A partir da metodologia onde se criou uma escala de ecogenicidade para corpo lúteo variando de 1 a 4 e obedecendo o delineamento experimental para classificação desta característica, pode-se observar na tabela 2, 54% (n=27) dos animais apresentaram morfoecogenicidade escore 4, uma tendência fisiológica, pois no D4 as células luteínicas do

corpo lúteo já estão maduras e em máxima atividade funcional, fato observado e descritos por alguns pesquisadores (STOCCO et al., 2007; GINTHER et al., 2008; TAROUCO, 2012).

O exame ecográfico do corpo lúteo, aliado as características inerentes ao estagio de diestro do órgão reprodutivo representam um meio utilizado na prática para indicar a atividade da glândula luteínica, apesar de que, a dosagem de progesterona ser um método mais preciso, este não é utilizado para uma avaliação rotineira, pois além de apresentar um custo elevado, a avaliação da corpo lúteo precisa ser de cunho prático e rápido afim de predizer uma possível receptora apta a ser inovulada e utilizada em programas de transferência de embriões equinos.

Fazendo o uso da ecografia colorida Doppler Ferreira & Meira (2013) concordam que a vascularização de folículos pré-ovulatórios não esta relacionada com a posterior função secretora do corpo lúteo, afirmando que tanto folículos pré-ovulatórios com alta vascularidade quanto folículos com baixa vascularidade originam corpos lúteos funcionais e semelhantes, com os resultados apresentados por estes pesquisadores pode-se afirmar que a ultra-sonografia representa um método eficiente e rápido para a detecção e avaliação do desenvolvimento tanto de folículos quanto de corpos lúteos, os quais são reconhecidos via exame ecográfico pelo tamanho, forma e características de morfo - ecogenicidade.

Observa-se que 30% (n=15) dos animais (Tab. 2) apresentaram morfoecogenicidade luteínica escore 3, o que também é condizente com o dia e fase da avaliação (D4), pois as células destes animais, independentes do grupo experimental que se encontram, podem ainda estar em estagio final de maturação não determinando falha da funcionalidade da glândula luteínica, mas sim um atraso na maturação e condensação final.

A relação entre a ecogenicidade do CL e produção de P4 foi descrita por Arruda (2001) e Ginther et al. (2008), revelando não existir diferença estatística entre a variação de ecogenicidade da glândula luteínica e produção de P4, quando no referido estudo são analisados os resultados apresentados na tabela 2 e 7, confirma-se as conclusões expostas pelos pesquisadores acima. Portanto, a ecogenicidade do corpo lúteo não tem correlação com a produção de P4, a diferença em no máximo 1 ponto na escala de sub-divisão (tab. 1) para ecogenicidade não influencia em baixa produção de P4.

**Tabela 2-** Avaliação com ultrassonografia dos animais no quarto dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo a morfoecogenicidade do corpo lúteo dentro de cada grupo.

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

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

Verifica-se que a morfoecogenicidade escore 2, apresentada por 16% (n=8) dos animais se distribuem entre os tratamentos de forma homogênea, onde no tratamento I verifica-se 3

animais e no tratamento II 5 animais, resultados revelando corpos lúteos com imagens pouco definidas e irregulares, sugerindo falha na formação e condensação das células luteínicas. O baixo escore na ecogenicidade luteínica apresentada por estas oito éguas, não prediz uma baixa produção de P4, visto que não foi observado tal diminuição hormonal nestes animais, também pode-se afirmar que no dia da avaliação (D4) com US as células luteínicas poderiam ter falhas na maturação e neste momento ainda não apresentarem ecogenicidade máxima.

Analisando a tabela 2 é verificada uma distribuição homogênea no escore de ecogenicidade do CL dos animais avaliados, verifica-se a ecogenicidade escore 3, um total de 9 animais para o tratamento I e 6 animais para o tratamento II, já para o escore 4 a distribuição dos animais é bem próxima, sendo ordenados 13 éguas no tratamento I e 14 éguas no tratamento II.

Portanto, observa-se que a ecogenicidade luteínica entre os dois tratamentos estudados não houve diferença (sem ou com indução da ovulação). Nos grupos de cada tratamento também não se observou grande dispersão dos resultados apresentados, mesmo com a realização de diferentes protocolos de administração do eCG (tab. 2). Não verificando alterações na frequência de distribuição dos escores morfoecogenico do corpo lúteo das éguas avaliadas.

No entanto não houve presença de animais com escore 1 (Tab. 2), fato este, que pode ser explicado pela pré seleção dos animais avaliados, onde a fim de, diminuir as variáveis aleatórias analisadas, preconizou-se usar somente éguas que se apresentassem na fase estral com folículo  $\geq$  35 mm, edema uterino grau 3 e ausência de fluido uterino, ou seja, éguas que na avaliação ultrassonografica minuciosa estivessem morfofisiologicamente saudáveis, com relação a estes aspectos reprodutivos e fase do ciclo estral.

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

Na tabela 3 são apresentados os tamanhos dos corpos lúteos de cada animal (n=50) do experimento, as dimensões do CL, foram realizadas através da captura da imagem do corpo lúteo formado ao quarto dia pós ovulação, sendo o tamanho do corpo lúteo calculado fazendo-se a média entre os dois maiores diâmetros da glândula luteínica mensurada.

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

**Tabela 3** - Avaliação da ultrassonografia dos animais no quarto dia (D4) após a ovulação, distribuição das éguas segundo o tamanho (mm) do corpo lúteo dentro de cada grupo analisado.

Animal n = 50	Tratamento I					Tratamento II				
	G I	G II	G III	G IV	G V	G I	G II	G III	G IV	G V
<b>1</b>	20,8	20,4	20,2	20,3	24,1	16,3	19,3	18,8	18,5	22,3
<b>2</b>	19,4	21,7	19,8	17,8	20,2	21,3	18	19,5	19,3	19
<b>3</b>	18,7	17,2	19,2	19,4	19	18,4	20,4	21	20,3	20,4
<b>4</b>	20	19,8	18,9	18,6	18,9	21	21,7	19,8	17,6	20,2
<b>5</b>	23	18,6	23,3	21,1	17,9	21	18,6	20,3	21,4	19,7
<b>Média</b>	<b>20,38</b>	<b>19,54</b>	<b>20,28</b>	<b>19,44</b>	<b>20,02</b>	<b>19,06</b>	<b>19,06</b>	<b>19,88</b>	<b>19,42</b>	<b>20,32</b>

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

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

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstram o grau de tônus uterino dos animais em experimento, onde 84% (n=42) das éguas mostram tônus uterino grau 3, condizente com a fase de diestro influenciada pela produção de progesterona, o que também é demonstrado na tabela 6 onde no D4, momento da avaliação do tônus uterino, verifica-se uma concentração média de progesterona em torno de 7 ng/mL para toda população estudada. Também avaliando a tabela 4, verifica-se 16% (n=8) das éguas que permaneceram com tônus uterino grau 2, mesmo tônus da fase do estro e/ou recrutamento folicular até a ovulação. O elevado índice de animais com tônus uterino 3 deve-se ao fato da pré seleção dos animais (n=50) escolhidos aleatoriamente, em que todos estavam em condições morfofuncionais do aparelho reprodutivo condizentes a fase do ciclo estral (HAFEZ 2004).

O tônus uterino 1 não foi verificado na população estudada (tab. 4), pois todas as éguas estavam ciclando e o tônus 1 é característico da fase fisiológica de anestro, também, não foi verificado tônus 4 nos animais estudados pois este tônus é característico de prenhez precoce em equinos e começa a se desenvolver a partir do décimo quinto dia pós ovulação.

Como um dos objetivos do trabalho é de criar mais uma ferramenta para utilização de éguas destinadas a serem receptoras de embrião e apoiado a pesquisas neste sentido é importante a afirmação de que as receptoras necessitam ter um ciclo estral normal e serem livres de problemas reprodutivos (LOOSINO et al, 2006; RORIGUES et al., 2012). É de fundamental importância que as mesmas apresentem características de funcionalidade da glândula luteínica, detecção de um CL visível, produção de progesterona (Fig. 3), ausência de líquido intra-uterino, cistos e dobras endometriais e tônus uterino (grau 3 – tab. 4) combinadas com o fechamento

cervical determinados pela palpação retal, sendo estes os principais critérios utilizados para a seleção da receptora na fase de diestro entre os dias 4 e 8 pós ovulação.

Comparando o tônus uterino entre os tratamentos onde a diferenciação foi a indução ou não da ovulação também não houve diferença estatística no que se refere a tônus uterino, já que os animais foram escolhidos aleatoriamente e ordenados mediante a ovulação que acontecia.

Observa-se no grupo três (GIII) de ambos os tratamentos uma maior dispersão na característica tônus uterino, no GIII do tratamento I, 40% (n=2) dos animais como tônus uterino 2, valendo a mesma característica e condição para GIII do tratamento II que apresenta 60% (n=3) dos animais. Esta maior dispersão não tem relação com os tratamentos (indução x não indução) e grupos experimentais envolvidos, uma vez que para os outros parâmetros reprodutivos apresentados os todos os animais estudados dos diferentes grupos apresentam o mesmo comportamento. Para os grupos que são manipulados com doses de eCG menores e os que são administrados doses maiores de eCG não apresentam tal magnitude de dispersão. Tais observações são válidas para o momento de seleção de receptoras para transferência de embrião equino, pois um tônus uterino de baixo escore pode estar aliado a uma deficiência na produção de progesterona e/ou falta de receptores para o esse hormônio nas células endometriais (RODRIGUES et al., 2012).

Pode-se afirmar através da análise das médias apresentadas na tabela 5, sobre os parâmetros reprodutivos avaliados que também esta maior dispersão na tonicidade uterina do GIII de ambos os tratamentos não tem relação com a ecogenicidade e tamanho do corpo lúteo.

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

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

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

A relação entre a ecogenicidade luteínica, tônus uterino e tamanho do corpo lúteo pode ser visualizada na tabela 5, onde para tais características foram comparadas as médias entre grupos para cada tratamento, não sendo observadas diferenças estatísticas na análise de variância ( $p > 0,05$ ), teste Tuckey, das médias e entre tratamentos para cada grupo.

As informações sobre a relação entre ecotextura e morfologia do corpo lúteo e a concentração plasmática de P4 são controversas. Arruda et al. (2001) citam que o tamanho e a ecogenicidade luteal podem refletir na produção de P4. Entretanto, Nagy et al. (2004) verificaram que o tamanho do CL parece não ter efeito significativo sobre a concentração plasmática de P4, o que é observado quando comparadas a tabela 5 e 6, mostrando não haver diferenças estatísticas das variáveis analisadas na análise de variância ( $p > 0,05$ ), teste Tuckey.

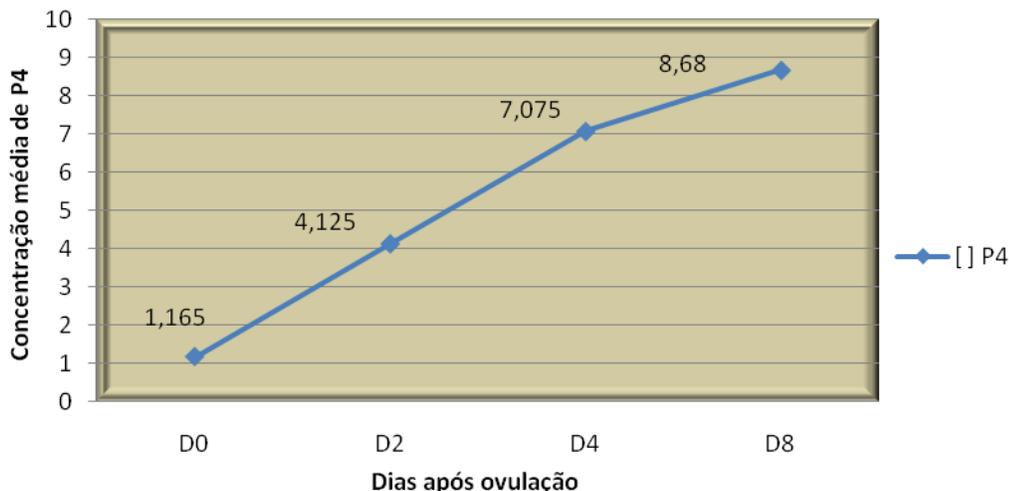
**Tabela 5** – Análise estatística da ecogenicidade do CL, tônus uterino e tamanho do corpo lúteo, comparação das médias entre grupos com mesma manipulação farmacológica e tratamentos. Análise de variância para cada tratamento das características analisadas ( $p \leq 0,05$ ).

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

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

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

Arruda et al. (2001) afirmam que a concentração de progesterona aumenta significativamente após a ovulação e se estabiliza em torno do quarto dia. Segundo Nagy et al. (2004), o aumento da concentração de progesterona ocorre até o quinto dia após ovulação e mantém um platô até a luteólise, fato este que pode ser visualizado na figura 2, onde a concentração média de progesterona entre os animais (n=50) estudados cresce em maior ritmo maior até o D4 e após este período mantém um platô de concentração.



**Figura 2** - Representação gráfica da concentração média de P4 de todas as éguas (n=50), nos dias de coleta amostrais, independente da administração farmacológica submetidas.

A concentração média de progesterona da população estudada independentemente de tratamento ou grupo experimental pode ser visualizada na figura 3. A afirmativa de que mesmo com os diferentes grupos analisados e as variações na concentração do fármaco (eCG) administrados nos diferentes grupos os resultados obtidos estão de acordo com os dados apresentados por Caiado et al. (2007) onde os animais em diestro com a manipulação farmacológica de um progestagênio apresentam níveis de P4 acima de 4 ng/ml 48 horas após o final dos sintoma de estro.

Vários autores revelam variadas concentrações de progesterona dentro de cada raça equídea. Citado por Caiado (2007), Fathalla et al.(1988), trabalhando com éguas da raça BH, descreveram a média de progesterona da fase luteínica ser de 10,29 ng/ml. Já em éguas Puro Sangue Árabe, Lopate e TherelfallL (1991) encontraram níveis máximos de progesterona durante o diestro são de  $6,68 \pm 4,56$  ng/ml e em éguas mestiças de  $6,56 \pm 1,83$  ng/ml, sendo aceitos como normais os níveis de 4,0 a 12,0 ng/ml para animais em diestro e 9,0 a 30,0 ng/ml para animais entre 15 e 30 dias de gestação e em seu trabalho demonstraram acontecer uma secreção pulsátil de progesterona, revelando que a concentração média de progesterona foi de 7,26 ng/mL. Caiado (2007) encontrou níveis séricos médios de progesterona de 7,0 ng/mL em receptoras que foram selecionadas para receberem embriões, entre os dias quatro e oito após a ovulação.

Quando comparado a concentração de progesteronica média entre os grupos estudados e relacionando entre os tratamentos I e II, pode-se afirmar, observando os dados apresentados na tabela 6, que as médias seguidas por letras diferentes representam diferenças de médias entre tratamentos para um mesmo grupo e um mesmo dia. Portanto realizando a análise do tratamento I, independente do tratamento II não houve diferença entre os grupos de cada tratamento para nenhum dos dias. Já a avaliação entre os grupos de tratamentos diferentes somente os grupos V, no D8 mostrou diferença estatística entre os tratamentos.

É importante observar que a indução da ovulação com análogo do GnRH não influenciaram os níveis de P4 entre os tratamentos analisados, mas quando no tratamento II, realizada a indução da ovulação e a administração concomitante de 500 UI de eCG no D<sub>0</sub> e 500 UI de eCG no D<sub>2</sub>, foi demonstrada uma diferença estatística, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student, entre as médias na concentração de P4 do grupo V para o D8 de cada tratamento analisado.

**Tabela 6-** Comparação da concentração de progesterona (ng/ml) das médias entre os grupos estudados para cada tratamento, sub-divididos nos dias de coleta, realizando uma análise de variância (teste t) entre as médias. ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo	Tratamento	Dia			
		0	2	4	8
Grupo I	Trat I	1,74±0,67	6,90±1,88	7,88±2,13	7,88±4,84
	Trat II	1,04±0,41	3,86±1,08	8,76±1,93	13,44±2,00
Grupo II	Trat I	1,32±0,39	3,92±0,91	6,62±1,56	6,68±1,87
	Trat II	1,20±0,58	3,56±0,86	5,12±1,33	6,00±1,24
Grupo III	Trat I	0,68±0,15	1,88±0,47	4,98±1,78	11,26±2,00
	Trat II	0,48±0,07	2,16±0,20	6,64±1,01	8,60±0,73
Grupo IV	Trat I	0,76±0,17	5,02±1,60	5,82±1,63	7,74±3,58
	Trat II	1,04±0,43	3,48±1,06	7,20±1,73	9,42±2,86
Grupo V	Trat I	2,52±1,24	7,36±3,15	10,34±2,51	<b>3,86±1,85b</b>
	Trat II	0,88±0,09	3,10±0,13	7,40±1,11	<b>11,92±0,99a</b>
Média	Trat I	1,40±0,30	5,02±0,86	7,13±0,88	7,48±1,34
	Trat II	0,93±0,02	3,23±0,34	7,02±0,65	9,88±0,89

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

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

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

No quarto dia (D4) após a ovulação os níveis médios de P4 para o tratamento I 7,13±0,88 ng/mL e tratamento II 7,02±0,65 ng/mL são bem próximos sendo tais resultados também é encontrada por Caiado et al. (2007) que verificam um valor médio de 7 ng/mL em éguas destinadas a receptoras de embrião.

As concentrações médias de P4 no oitavo dia (D8) entre as éguas não induzidas 7,48±1,34 ng/mL e as induzidas 9,88±0,89 ng/mL mostra um valor um pouco mais elevado para éguas induzidas em função, principalmente, das dosagens de P4 encontradas no grupo V, oitavo dia (D8), porém sem diferença estatística ao se analisar os tratamentos em conjunto, sem levar em consideração os grupos de forma independente.

## 5 – Conclusão

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

Não foram encontradas relações com a administração do eCG e a qualidade do corpo lúteo, necessitando de mais estudos para teste e confirmação da hipótese, mostrando a relevância deste trabalho inicial em abrir portas para novas investigações a respeito desta biomolécula, e que venha contribuir na biotecnologia reprodutiva equina.

## 6 – Referências

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

ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.38, p.319-333, 2010.

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; CELEGHINI, E. C. C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos. *Brazilian J. veterinary resarch animal science*, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 233-239, 2001.

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

FERREIRA, J.C.; Avaliação ultrassonográfica Doppler pré e pós-cobertura do trato reprodutivo de éguas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.108-114, abr./jun. 2013. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br)

GINTHER, O. J. et al. Miniature ponies: 2. Endocrinology of oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*. V. 20, p. 386-390.2008.

GORETTI, RAFAEL GUEDES, M.S., Colheita de embriões equinos 48 h após a aplicação de luteolítico: parâmetros reprodutivos, concentrações sérica de progesterona e de proteínas do fluido uterino. *Dissertação UFV – 2005*

HAFEZ, E. S. E. *Reprodução animal.*, 7<sup>a</sup>. ed. Ed. Manole. São Paulo. p.509, 2004.

KAMADA, A.M.; GAGLIOTTI I.P., DOMINGOS, C., JUNIOR, W.R.P.F., COLA S., JARDINI F.H.M., BOCCIA J.P., CAVALCANTIP.V., Tratamento de folículo anovulatório persistente em égua: relato de caso. *Journal Health Sci Inst*. 2013. V31, 109-112.

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

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

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

TAROUCO, K. A. Fisiologia reprodutiva da égua. *Estacionalidade Reprodutiva: A estacionalidade dos acasalamentos, na maioria das espécies, pucrs. campus2. br/~thompson/FISIOLOGIAREPRODUTIVADAEGUA*. Acesso:05/11/2012

RIERA F.L. General techniques and organization of large commercial embryo transfer programs. *Clinical Theriogenology*. v.3, p. 318-324, 2011.

Rodrigues, T. G.; Caiado J. R. C.; Faundes B.; Silva J. F. S.; Uso de progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação. *Acta Biomedica Brasiliensia / Volume 3/ nº 1/ Junho de 2012*

Romano RM, Ferreira JC, Canesin HS, Ignácio FS, Novaes Filho LF, Barros AMR, Meira C. Influence of hCG on the vascular perfusion of preovulatory follicle. *Anim Reprod*, v.9, p.975, 2012. Resumo

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

SILVA L.A. Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões eqüinos. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado, p123, 2003.

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