

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITO DA SUBDOSE DE hCG NO ACUPONTO *Hou Hai* NA
DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM
EQUIDEOS**

Márcio de Oliveira Ribeiro

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2018**

**EFEITO DA SUBDOSE DE hCG NO ACUPONTO *HOU HAINA*
DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM
EQUIDEOS**

Márcio de Oliveira Ribeiro

Médico Veterinário

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITO DA SUBDOSE DE hCG NO ACUPONTO *HOU HAINA*
DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM
EQUIDEOS**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Márcio de Oliveira Ribeiro

Defendida em: 30 de janeiro de 2018

Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Presidente

Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Membro

Dra. Ana Lúcia Almeida Santana
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Membro

EFEITO DA SUBDOSE DE hCG NO ACUPONTO *HOU HAI* NA DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM EQUIDEOS

RESUMO: O objetivo com o estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica humana (hCG) no acuponto *Hou Hai*, como indutor de ovulação em éguas e jumentas. Foram realizados dois experimentos: no primeiro, utilizou-se 15 éguas mestiças; e no segundo 11 jumentas da raça Pêga. As éguas e jumentas foram distribuídas em Delineamento em Blocos Casualizados, em três tratamentos (T), sendo: T1= aplicação de 1500UI de hCG (100% da dose), por via intravenosa (IV); T2= 450UI de hCG (30% da dose) em falso acuponto (IV) e T3: 450UI de hCG (30% da dose) aplicada no acuponto *Hou Hai*. Os animais foram monitorados por ultrassonografia modo B, até que o folículo pré-ovulatório estivesse com diâmetro ≥ 35 mm para as éguas e ≥ 30 mm para jumentas e edema uterino grau 3, quando se procedeu a indução da ovulação com hCG e avaliação com Doppler colorido. Após aplicação do indutor de ovulação, os exames modo B foram realizados duas vezes ao dia para detectar o momento da ovulação (D0). O diâmetro médio do CL e sua vascularização foram acompanhados modo B e Doppler no D0, D2, D4 e D8 após ovulação, com coleta de sangue no D8 para determinação da concentração sérica de progesterona (P_4). Os dados foram submetidos à análise de normalidade, seguido dos testes estatísticos adequados para cada variável. Para éguas e jumentas, não houve diferença ($P > 0,05$) para diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios ($38,2 \pm 1,3$ mm e $34,5 \pm 1,3$ mm); taxa de ovulação (91,11% e 96,97%); intervalo entre indução e ovulação ($43,48 \pm 2,48$ h e $58,07 \pm 16,82$ h) respectivamente; diâmetro médio de CL em éguas (D0= $25,3 \pm 2,3$; D2= $31,1 \pm 0,7$; D4= $29,0 \pm 0,4$ e D8= $25,6 \pm 1,3$ mm) e em jumentas (D0= $23,0 \pm 0,6$; D2= $27,7 \pm 1,9$ e D8= $28,2 \pm 0,8$ mm); concentrações séricas de P_4 ($5,02 \pm 0,52$ ng/mL) em éguas e ($10,50 \pm 2,99$ ng/mL) em jumentas. Houve diferença ($P < 0,05$) para taxa de ovulação acima de 48h após indução, com taxas de 0 (T1); 13,33 (T2) e 33,33% (T3) para éguas e de 18,18 (T1); 36,36 (T2) e 72,73% (T3) para jumentas, com superioridade do T3 em relação aos outros tratamentos nas duas espécies; diâmetro do CL no D4 em jumentas, com superioridade de T3 em relação ao T1 (T1= $25,8 \pm 4,4$; T2= $27,0 \pm 4,5$ e T3= $30,7 \pm 5,1$ mm); valor numérico de pixel mínimo do folículo pré-ovulatório (T1= $40,33 \pm 2,57$; T2= $36,84 \pm 2,24$ e T3= $39,31 \pm 3,36$) das éguas e valor numérico de pixel mínimo do CL no D8 (T1= $41,91 \pm 1,17$; T2= $37,63 \pm 6,27$ e T3= $37,89 \pm 4,28$) para as jumentas. A utilização de subdose de hCG na dose de 450UI por via IV ou em acuponto *Hou Hai* foi eficiente em promover a indução de ovulação em éguas e jumentas, mostrando que a dose padrão de hCG atualmente utilizada para estas espécies está superestimada.

Palavras chave: Doppler; éguas; farmacopuntura; hormonioterapia; jumentas; progesterona

EFFECT OF HCG SUBDOSE ON HOU HAI ACUPUNCT IN FOLLICULAR DYNAMICS AND LUTEAL DEVELOPMENT IN EQUIDE

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of human chorionic gonadotrophin (hCG) subdivision in the *Hou Hai* acupuncture as an inducer of ovulation in mares and donkeys. Two experiments were carried out: in the first one, 15 crossbred mares were used; and the second 11 asses of the Pêga breed. The mares and donkeys were distributed in a randomized block design in three treatments (T): T1= application of 1500IU of hCG (100% of the dose), intravenously (IV); T2= 450IU of hCG (30% of the dose) in false acupoint (IV) and T3= 450IU of hCG (30% of the dose) applied in *Hou Hai* acupoint. The animals were monitored by mode B ultrasonography until the preovulatory follicle was ≥ 35 mm in diameter for mares and ≥ 30 mm for donkeys and grade 3 uterine edema, when ovulation induction was performed with hCG and color Doppler evaluation. After the ovulation inducer was applied, mode B exams were performed twice a day to detect the time of ovulation (D0). The mean diameter of the CL and its vascularization were monitored in D0, D2, D4 and D8 mode after ovulation, with D8 blood collection to determine the serum progesterone concentration (P₄). Data were submitted to normality analysis, followed by appropriate statistical tests for each variable. For mares and donkeys, there was no difference ($P > 0.05$) for mean preovulatory follicle diameter (38.2 ± 1.3 mm and 34.5 ± 1.3 mm); ovulation rate (91.11% and 96.97%); interval between induction and ovulation (43.48 ± 2.48 h and 58.07 ± 16.82 h) respectively; mean diameter of CL in mares (D0= 25.3 ± 2.3 , D2= 31.1 ± 0.7 , D4= 29.0 ± 0.4 and D8= 25.6 ± 1.3 mm) and on donkeys (D0= 23.0 ± 0.6 , D2= 27.7 ± 1.9 and D8= 28.2 ± 0.8 mm); serum concentrations of P₄ (5.02 ± 0.52 ng/mL) in mares and (10.50 ± 2.99 ng/mL) in donkeys. There was a difference ($P < 0.05$) for ovulation rate above 48h after induction, with rates of 0 (T1); 13.33 (T2) and 33.33% (T3) for mares and 18.18 (T1); 36.36 (T2) and 72.73% (T3) for donkeys, with superiority of T3 in relation to the other treatments in the two species; (T1= 25.8 ± 4.4 , T2= 27.0 ± 4.5 and T3= 30.7 ± 5.1 mm); number of the preovulatory follicle (T1= 40.33 ± 2.57 , T2= 36.84 ± 2.24 and T3= 39.31 ± 3.36) of the mares and the minimum pixel value of the CL at D8 (T1= 41.91 ± 1.17 , T2= 37.63 ± 6.27 and T3= 37.89 ± 4.28) for donkeys. The use of hCG subdivisions at a dose of 450IU/IV or *Hou Hai* acupuncture was efficient in promoting the induction of ovulation in mares and donkeys, showing that the standard dose of hCG currently used for these species is overestimated.

Keywords: Doppler; mares; pharmacopuncture; hormone therapy; donkeys; progesterone

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL	Corpo lúteo
D0	Dia da ovulação
D2	Dois dias após ovulação
D4	Quatro dias após ovulação
D8	Oito dias após ovulação
E ₂	Estrógeno
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EPE	Extrato de pituitária eqüina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g/animal	Gramas por animal
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligrama
miRNAs	Micrnas
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
ng/mL	Nanograma por mililitro
NPVs	Valores numéricos de pixels
°C	Graus Celsius
P ₄	Progesterona
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ alfa
PRF	Frequência de repetição de pulso
reLH	Hormônio luteinizante recombinante equino
SC	Subcutâneo
TE	Transferência de embrião
UI	Unidade internacional
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VG1	Vaso governador 1

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

	Página
Figura 1. Local de inserção da agulha no acuponto <i>Hou Hai</i>	26
Figura 2. Metodologia experimental.....	287
Figura 3. Imagens ultrassonográficas de avaliação do grau de edema uterino de éguas pelo modo B	28
Figura 4. Imagens ultrassonográficas modo B e Doppler colorido do folículo no momento da indução e do corpo lúteo após ovulação de éguas	28
Figura 5. Imagens ultrassonográficas modo B e Doppler colorido do corpo lúteo em desenvolvimento de éguas.....	29
Figura 6. Imagem do corpo lúteo de éguas no Image ProPlus®	30
Figura 7. Valor numérico de pixel mínimo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas.....	34
Figura 8. Valor numérico de pixel médio do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas.....	35
Figura 9. Valor numérico de pixel máximo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas.....	35
Figura 10. Heterogeneidade do valor numérico de pixel do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas.....	36
Figura 11. Correlação positiva moderada entre diâmetro do corpo lúteo no D8 e concentração sérica de progesterona oito dias após ovulação para éguas com ovulação induzida com 1500UI de gonadotrofina coriônica humana por via intravenosa	37
Figura 12. Correlação positiva moderada entre valor numérico de pixel médio e concentração sérica de progesterona oito dias após ovulação para égua com ovulação induzida com 450UI de gonadotrofina coriônica humana por via intravenosa	38

CAPÍTULO 2

	Página
Figura 1. Local de inserção da agulha no acuponto <i>Hou Hai</i>	45

Figura 2. Metodologia experimental.....	46
Figura 3. Imagens ultrassonográficas de avaliação do grau de edema uterino de jumentas pelo modo B.....	47
Figura 4. Imagens ultrassonográficas modo B e Doppler colorido do folículo no momento da indução e do corpo lúteo após ovulação de jumentas	48
Figura 5. Imagens ultrassonográficas em modo B e Doppler colorido do corpo lúteo em desenvolvimento de jumentas	49
Figura 6. Imagem do corpo lúteo de jumentas no Image ProPlus®	50
Figura 7. Valor numérico de pixel médio do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas	54
Figura 8. Valor numérico de pixel mínimo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas	54
Figura 9. Valor numérico de pixel máximo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas	55
Figura 10. Heterogeneidade do valor numérico de pixel do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas	55
Figura 11. Correlação positiva moderada entre valor numérico de pixel médio e concentração sérica de progesterona oito dias após ovulação para jumenta com ovulação induzida com 450UI de gonadotrofina coriônica humana por via intravenosa	57
Figura 12. Correlação positiva moderada entre valor numérico de pixel médio e concentração sérica de progesterona oito dias após ovulação para jumenta com ovulação induzida com 450UI de gonadotrofina coriônica humana no acuponto <i>Hou Hai</i>	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

	Página
Tabela 1. Folículo ovulatório, taxa e momento de ovulação de éguas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana no acuponto <i>Hou Hai</i>	31
Tabela 2. Desenvolvimento do corpo lúteo e concentração sérica de progesterona de éguas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana em acuponto <i>Hou Hai</i>	33

CAPÍTULO 2

	Página
Tabela 1. Folículo ovulatório, taxa e momento de ovulação de jumentas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana no acuponto <i>Hou Hai</i>	51
Tabela 2. Desenvolvimento do corpo lúteo e concentração sérica de progesterona de jumentas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana em acuponto <i>Hou Hai</i>	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Ciclo estral da égua e jumenta	3
2.2	Dinâmica folicular e desenvolvimento luteal.....	6
2.3	Hormonioterapia e farmacopuntura na reprodução da fêmea equina e asinina.....	10
2.3.1	Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	11
2.3.2	Farmacopuntura	13
2.4	Ultrassonografia na reprodução equina e asinina	16
2.4.1	Modo Bidimensional	17
2.4.2	Doppler colorido	18
CAPÍTULO 1. EFEITO DA SUBDOSE DE HCG NO ACUPONTO HOU HAI NA DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM ÉGUAS.....		
	RESUMO	23
	ABSTRACT	23
	INTRODUÇÃO	24
	MATERIAL E MÉTODOS	25
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2. EFEITO DA SUBDOSE DE HCG NO ACUPONTO HOU HAI NA DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM JUMENTAS.....		
3	RESUMO	42
	ABSTRACT	42
	INTRODUÇÃO	43
	MATERIAL E MÉTODOS	44
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	58
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
	APÊNDICES	74

1 INTRODUÇÃO

O uso de indutores de ovulação é essencial para aumentar os índices reprodutivos na equideocultura, principalmente por proporcionar vantagens, como: única inseminação artificial (IA) ou cobertura por ciclo estral, acarretando na redução da contaminação uterina; coberturas programadas para fêmeas que são transportadas até o reprodutor; IA próximo ao momento da ovulação quando utilizado sêmen resfriado ou criopreservado; garantia de intervalo adequado entre coberturas naturais para reprodutores com grande demanda; sincronização entre doadoras e receptoras em programas de transferência de embriões (TE) e redução de mão de obra e custo do médico veterinário (SAMPER, 2008).

Vários hormônios vêm sendo utilizados como indutores de ovulação para equídeos. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o acetato de deslorelina (análogo do hormônio liberador de gonadotrofina, GnRH) são os agentes farmacológicos comumente utilizados para indução de ovulação em éguas e jumentas, podendo ser utilizados associados ou não. Outros análogos de GnRH estão sendo testados com eficácia em éguas e jumentas, como: acetato de buserelina (CAMILLO *et al.*, 2014), acetato de lecorelina (AWAN *et al.*, 2016) e acetato de triptorelina (SINCLAIR *et al.*, 2015).

Destes, a hCG possui ação similar ao hormônio luteinizante (LH), iniciando a maturação do oócito e ovulação. As dosagens mais utilizadas de hCG, para induzir a ovulação em éguas e jumentas, são de 1500 a 2500UI de hCG, mas doses entre 750 a 4000UI já foram testadas (MCKINNON e VOSS, 1992; PERES *et al.*, 2006; BEAL *et al.*, 2011; ROMANO *et al.*, 2015), não sendo ainda estabelecida a menor dose efetiva.

A aplicação dos indutores de ovulação pode ser realizada por via intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutânea (SC), em implante subcutâneo e em acupontos, utilizando a farmacopuntura, sendo os dois primeiros os mais utilizados na rotina da reprodução das éguas e jumentas. Ainda pouco utilizada na medicina veterinária, a farmacopuntura é uma opção válida para utilizar

subdoses hormonais com os benefícios de reduzir os efeitos secundários indesejáveis e de resíduos em produtos de origem animal, além do baixo custo do tratamento (LUNA *et al.*, 2008; FARIA, 2007).

O acuponto *Hou Hai* atua na atividade cíclica ovariana e está situado na área entre a distância média da base ventral da cauda e o limite dorsal do ânus (LIN *et al.*, 2006), inserindo a agulha de forma angular, com profundidade variando (pelo porte do animal) de 3 a 18cm (HWANG e LIMEHOUSE, 2006).

Segundo Lin *et al.* (2006), apesar de ter poucos resultados utilizando protocolos hormonais no acuponto *Hou Hai* para controle do ciclo estral, a sua localização anatômica é uma vantagem na implementação da prática a campo, após sua eficácia ser comprovada com mais estudos.

A utilização da farmacopuntura no acuponto *Hou Hai* permite o uso de doses reduzidas de hCG, obtendo-se valores melhores ou semelhantes as doses maiores aplicadas na reprodução equina e asinina. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da aplicação da subdose de hCG no acuponto *Hou Hai*, como indutor de ovulação em éguas e jumentas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral da égua e jumenta

As fêmeas das espécies equina e asinina apresentam mais de um ciclo estral durante uma determinada estação do ano, compreendendo o período de maior intensidade de luz (fotoperíodo positivo), sendo consideradas poliéstricas estacionais de dias longos (FARIA e GRADELA, 2010) e possuindo também fatores nutricionais como reguladores da atividade reprodutiva (SAMPER, 2008). Em regiões de latitudes maiores, as jumentas demonstram possuir menor influência da sazonalidade na estação reprodutiva, comparado com as éguas (TABERNER *et al.*, 2008), podendo ciclar durante todo o ano nas regiões mais próximas a linha do equador (FIELDING, 1988). Henry *et al.* (1987) detectaram o período reprodutivo das jumentas de $197,8 \pm 63,4$ dias durante o ano.

Nas quatro estações climáticas do ano, o momento em que ocorre maior tempo de incidência solar durante o dia é na primavera e verão (de outubro a março), período no qual as éguas apresentam máxima atividade ovariana, conhecida como estação ovulatória (DONADEU e GINTHER, 2002) ou período de competência sexual (FARIA e GRADELA, 2010).

Em regiões onde há grande variação fotoperiódica durante o ano (FARIA e GRADELA, 2010), antes de entrar na estação reprodutiva, existe a fase denominada de transição de primavera (agosto a outubro), quando as éguas começam a ciclar apresentando estros prolongados e anovulatórios. Após essa fase de transição, inicia-se a estação reprodutiva e as éguas apresentam ciclos estrais com intervalos regulares (ANDRADE MOURA, 2012). Finalizando com a fase denominada de transição de outono (de março a maio), elas começam a parar de ciclar tornando os estros semelhantes da transição primaveril. Após a transição de outono, as éguas entram no período de anestro, compreendido de maio a agosto (OLIVEIRA e SOUZA, 2003), com mínima atividade ovariana (DONADEU e GINTHER, 2002).

Nas jumentas, os estros anovulatórios são mais frequentes durante a transição de primavera, passam do anestro para o período de atividade sexual, podendo ser encontrados durante todo ano (VENDRAMINI *et al.*, 1998).

Le Blanc *et al.* (2003) definiram o ciclo estral como a série de alterações comportamentais, anatômicas e endócrinas que preparam a fêmea para a ovulação, tendo em média duração de 21 dias na espécie equina. Já nas jumentas tem duração média de 24 dias. Na égua, o ciclo estral pode ser dividido em fase folicular, com duração média de 6 dias (proestro e estro) e a fase luteal, com duração média de 14 dias (metaestro e diestro). Nas fêmeas asininas, esses períodos são aproximadamente de 7 dias para fase folicular e 17 dias para fase luteal (TABERNER *et al.*, 2008).

Iniciando a estação reprodutiva das éguas e jumentas, o proestro é a fase de recrutamento folicular, influenciado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), com duração de 2 a 6 dias, dependendo da resposta ovariana ao aumento do fotoperíodo (TABERNER *et al.*, 2008; PIMENTEL *et al.*, 2014).

Ainda na etapa folicular, o estro é o momento em que a égua e a jumenta estão receptivas sexualmente e no qual ocorre a ovulação. Neste período, os elevados níveis de estrógenos (E_2) secretados pelo folículo pré-ovulatório induz o comportamento de estro (HENRY *et al.*, 1987; PIMENTEL *et al.*, 2014). Também é responsável pelo aumento da vascularização uterina e extravasamento de líquido dos vasos para a área intersticial ocasionando edema endometrial nas éguas e jumentas, que permite o recebimento e transporte do sêmen para a tuba uterina (BERGFELT, 2000).

O edema endometrial ou também chamado de edema estral é detectado com maior intensidade durante o período do 17º ao 20º dia do ciclo estral e se desfaz após ovulação (ANDRADE MOURA e MERKT, 1996), estando relacionado seu aparecimento e desaparecimento com o início do estro e a ovulação, respectivamente (SAMPER, 1997). Para poder avaliar o edema endometrial, Samper (1997) classificou o método subjetivo com variação de 0 a 5, onde: 0 = representava o útero na fase de diestro (sem edema); 1 = leve edema; 2 = moderado; 3 = marcante em todo o útero; 4 = máximo, às vezes pequena quantidade de líquido no lúmen uterino e edema marcante no corpo

do útero; 5 = anormal, ecotextura padrão descaracterizada (irregular e desorganizada).

Segundo Henry *et al.* (1987), as jumentas precisam demonstrar mais de um dos sinais de estro (mastigação, micção frequente, levantamento da cauda e as orelhas tocarem o pescoço) para serem consideradas em estro. Os principais sinais em éguas são a exposição do clitóris, micção frequente, vocalização e interesse pelo garanhão.

Algumas fêmeas podem não apresentar sinais evidentes de estro sendo apenas detectado pela dinâmica folicular, por meio da ultrassonografia (PIMENTEL *et al.*, 2014). Essa falta de alteração comportamental é denominada de estro silencioso, que ocorre rotineiramente no período entre 5° e 15° dia pós-parto nas éguas, também conhecido como cio do potro (ROMANO, 1998). Nas jumentas, esse cio ocorre de cinco a 11 dias após o parto (FIELDING, 1988).

Com duração média de seis a sete dias, é no terço final do estro que ocorre a ovulação das éguas e jumentas (SAMPER, 2008; TABERNER *et al.*, 2008), entre 24 a 48 horas antes do final da receptividade sexual (PORTO, 2007; ANDRADE MOURA, 2012), acarretando na redução dos níveis de E₂ a concentrações basais (GASTAL, 2009).

Após a ovulação, inicia-se a fase luteal com o metaestro, com a formação de corpo lúteo (CL) em três a quatro dias, elevando os níveis de P₄ e com o declínio do E₂ (PIMENTEL *et al.*, 2014). Concluindo a fase luteal, o diestro tem duração de cinco a seis dias e é o período da presença do CL funcional com os maiores níveis de P₄ (15,5ng/mL, em éguas e >20ng/mL, em jumentas) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009b; ROMANO *et al.*, 2015), mantendo um platô até a luteólise (NAGY *et al.*, 2004). O perfil de P₄ da jumenta é similar ao da égua, aumenta até o 8° dia após a ovulação e mantém o platô até o 14° dia (HENRY *et al.*, 1987; MEIRA *et al.*, 1995; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009b).

Caso não ocorra à fertilização, o CL regride a partir do 14° dia após a ovulação, decaindo rapidamente a concentração plasmática de P₄ para menos de 1ng/mL nas éguas e jumentas, que retornam ao estro e recomeçam um novo ciclo estral (MEIRA *et al.*, 1995; ARRUDA *et al.*, 2001; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009b; AURICH, 2011; ROMANO *et al.*, 2015).

O anestro é o período de inatividade ovariana, com baixos níveis séricos de P_4 , perda do tônus uterino e atrofia gonadal (PIMENTEL *et al.*, 2014). Eventos estressantes como redução do fotoperíodo e da nutrição, estão relacionados com a parada reprodutiva devido à liberação de cortisol e inibição da secreção dos hormônios secretados no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (WAGENMAKER *et al.*, 2009). O aumento da produção de melatonina e a redução da produção das gonadotrofinas resultam em diminuição da atividade folicular e ausência de ovulação (BERGFELT, 2009).

Por meio do fotoperíodo crescente, o hipotálamo aumenta a secreção de GnRH, estimulando a frequência dos pulsos das gonadotrofinas FSH e LH, que aumentam gradativamente, caracterizando o final do anestro com a primeira ovulação do ano (ATAYDE, 2008). Após passar pela transição de primavera com ciclos longos e anovulatórios (ANDRADE MOURA, 2012), as éguas e jumentas tendem a ciclar regularmente (NAGY *et al.*, 2000; TABERNER *et al.*, 2008; ANDRADE MOURA, 2012).

2.2 Dinâmica folicular e desenvolvimento luteal

As características do desenvolvimento folicular, durante o ciclo estral, vêm sendo pesquisadas detalhadamente por meio da ultrassonografia transretal em éguas, há aproximadamente 37 anos (PALMER e DRIANCOURT, 1980; GINTHER e PALMER, 1983; GINTHER e PALMER, 1984; GINTHER *et al.*, 2004a). Os eventos reprodutivos das jumentas começaram a serem descritos por pesquisadores como Ginther *et al.* (1987); Meira *et al.* (1995) e Blanchard *et al.* (1999), incluindo eventos de dinâmica folicular, como emergência de ondas foliculares, crescimento folicular comum, divergência/dominância folicular, ovulação, luteogênese e luteólise.

O FSH é o responsável pelo crescimento de folículos antrais, iniciando o ciclo estral com recrutamento de folículos sensíveis de aproximadamente 6mm de diâmetro (GINTHER, 2000; DRIANCOURT, 2001), com nível sérico máximo de 23,7ng/mL no 12º dia do ciclo para as éguas jovens de 5 a 6 anos;

24,8ng/mL no 14^o dia para adultas de 10 a 14 anos e 28,5ng/mL no 14^o dia para idosas com idade maior de 18 anos (GINTHER *et al.*, 2009). Quando um ou mais folículos obtêm aproximadamente 13mm de diâmetro, ocorre o período de emergência folicular (GINTHER *et al.*, 2003). Os níveis de FSH diminuem para 7ng/mL até 24h antes da ovulação (GINTHER *et al.*, 2009), pelo *feedback* negativo gerado pela inibina, produzida pelos folículos emergentes (GINTHER *et al.*, 2003).

A inibina é uma glicoproteína produzida pelas células da granulosa do folículo em desenvolvimento pela influencia do FSH. Antes da ovulação, a inibina secretada pelo folículo dominante provoca o declínio do FSH (GINTHER, 2000). A ação específica da inibina é de *feedback* negativo na produção de FSH, modulando a hipófise anterior na resposta ao GnRH e reduzindo a produção de FSH (GINTHER, 1992).

Em seguida, inicia-se a fase de crescimento folicular comum, responsivo principalmente ao FSH, com desenvolvimento folicular médio de 3mm por dia, durante aproximadamente 6 dias para éguas (GINTHER *et al.*, 2004a; GINTHER *et al.*, 2009) e 1,3mm por dia, em jumentas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009a).

O aumento dos níveis de E₂ inicia quando o folículo mede 18mm de diâmetro e coincide com o processo de desvio folicular (GINTHER *et al.*, 2001). Alterações intrafoliculares foram relacionadas às funções do E₂, como o aumento da atividade enzimática da esteroidogênese e aromatização das células da granulosa, elevando a quantidade de receptores para LH e tornando o folículo mais sensível aos hormônios gonadotróficos (HILLIER, 1985; BELIN *et al.*, 2000). A aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa ocorre logo após o desvio na onda de crescimento folicular, sendo fundamental para o papel desse hormônio na maturação final do oócito (HYTTEL *et al.*, 1997) e na própria ovulação do folículo.

A supressão dos níveis séricos de FSH pode ser influenciada tanto pela atuação dos níveis de E₂ circulante, quanto pelas frações protéicas do fluido folicular (BERGFELT *et al.*, 2000). O pico de E₂ ocorre dois dias antes da ovulação e decresce após esse período (GINTHER *et al.*, 2006).

Algumas alterações na foliculogênese, como maior sensibilidade ao FSH, indução da expressão de receptores para LH, aumento da atividade enzimática de esteroidogênese e aromatização, crescimento e proliferação celular, têm sido associadas aos fatores de crescimento intrafoliculares, principalmente ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (GINTHER, 2000; GINTHER *et al.*, 2001). Estudos realizados por Schauer *et al.* (2013) detectaram altas concentrações de IGF-1 em folículos dominantes quando comparado às concentrações em folículos subordinados ou anovulatórios.

A divergência folicular ocorre quando o maior folículo alcança em média 23mm de diâmetro (GINTHER *et al.*, 2004a), designado de dominância folicular (JACOB *et al.*, 2009), o qual possui crescimento contínuo de aproximadamente 3 a 5mm por dia em éguas e de 2,2 a 2,7mm em jumentas (DADARWAL *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009a). Por ter mais receptores para FSH e LH, o folículo dominante continua crescendo e elevando os níveis de E₂ e inibina (GINTHER, 1992). Consequentemente, a atresia dos outros folículos ocorre por serem menores e possuírem menos receptores gonadotróficos (GINTHER, 1992), sendo assim chamados de subordinados (GINTHER *et al.*, 2004a; JACOB *et al.*, 2009).

O LH não é responsável pelo processo de divergência folicular, porém se torna necessário para o desenvolvimento do folículo dominante após o início do desvio folicular (GINTHER *et al.*, 2001). Após a fase de divergência, ocorre um aumento das concentrações séricas do LH, que é responsável pelo crescimento, maturação folicular e ovulação, atingindo concentrações máximas de 31,3ng/mL um dia após ovulação (GINTHER *et al.*, 2001; GINTHER *et al.*, 2009).

O dia da emergência do folículo ovulatório pode ser estimado pela taxa de crescimento pré e pós-desvio (GASTAL *et al.*, 1997; GINTHER *et al.*, 2004a). Na pesquisa realizada por Ginther *et al.* (2004a), nas ondas ovulatórias com folículos na fase de crescimento comum, ocorrem sobreposição de ondas anteriores em regressão, em aproximadamente 25% das ovulações em éguas. Nelas, uma grande onda anovulatória (folículo dominante ≥ 28 mm) precede a onda ovulatória em 20-30% dos ciclos estrais. Ondas sem folículo dominante

são denominadas ondas menores (JACOB *et al.*, 2009). Isso também ocorre com as jumentas, 15% dos ciclos estrais terminam com ovulação na segunda onda folicular que surgiu do 15^o ao 21^o dia do diestro (MEIRA *et al.*, 1995).

De acordo com Conceição *et al.* (2009a), para as jumentas a emergência e o desvio folicular ocorrem nos dias 10 e 14 do ciclo estral, respectivamente. A taxa de crescimento do folículo dominante antes e depois do desvio é de $1,31 \pm 0,47$ mm e $2,27 \pm 0,31$ mm, respectivamente, obtendo o diâmetro máximo de $37,8 \pm 1,40$ mm.

Nos equídeos, é possível prever o momento próximo à ovulação devido às deformações estruturais do folículo pré-ovulatório na maioria das fêmeas (GINTHER, 1988). Mudanças também ocorrem dentro do folículo, como um aumento expressivo de receptores de LH pelas células da teca, deste modo tornando o folículo responsivo ao LH hipofisário (WEBB *et al.*, 1999).

Segundo Ginther (1987), as éguas ovulam após uma constante e lenta elevação na concentração circulatória de LH, diferente de muitas espécies que a ovulação ocorre mediante o pico de LH.

Por ação do LH, ocorre a formação do primeiro corpúsculo polar e síntese de prostaglandina pelas células da granulosa, que contribui para a ruptura dos lisossomos das células epiteliais no ápice folicular, junto com a plasmina e a colagenase. Pela ação da prostaglandina, aumenta a pressão no interior do folículo, favorecendo a ruptura do mesmo após adelgaçar o ápice folicular. O oócito é expelido, seguindo para a fossa de ovulação, onde é recolhido pelas fímbrias e liberado no infundíbulo da tuba uterina até ocorrer a fertilização (FRITZ e SPEROFF, 1982; BRANNSTROM e HELLBERG, 1989).

Após a ovulação, a circulação sanguínea assume um papel importante no funcionamento do CL, devido a uma neovascularização essencial para carrear substrato para biossíntese de P_4 (CARR *et al.*, 1982). Com a formação do CL, os níveis séricos de P_4 aumentam e inibem a secreção de LH, que permanece em baixos níveis (SQUIRES *et al.*, 2003). A concentração sérica de P_4 aumenta imediatamente atingindo o seu nível máximo no 6^o ao 8^o dia e decresce lentamente até o 14^o dia, momento da luteólise para as éguas e jumentas (ROBERTO da COSTA *et al.*, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009b).

Segundo Romano *et al.* (2015), a concentração plasmática de P_4 aumenta gradativamente de valores abaixo de 1ng/mL no D0 para 15,5ng/mL no D8, em éguas tratadas com 1500UI de hCG no D0. O mesmo estudo evidenciou correlação positiva entre a concentração plasmática de P_4 e o número de pixels coloridos no CL, avaliados pela ultrassonografia Doppler, e também encontrou uma área média do CL de 603mm², do D0 ao D8 em éguas com ovulação espontânea. Nas jumentas, também ocorre correlação positiva entre as concentrações de P_4 e o tempo de formação do CL, atingindo a máxima no 7º dia após ovulação (>20ng/mL) e o diâmetro máximo do CL ocorre no 5º dia, com média de 26,2mm (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009b).

Ao final da fase luteal, a redução dos níveis de progesterona permite a estimulação do hipotálamo e do útero pelo E_2 (MCCRACKEN *et al.*, 1999), determinando o aumento da liberação de ocitocina pela hipófise posterior e do aumento da expressão de receptores de ocitocina no endométrio (SPENCER e BAZER, 1996). Por sua vez, a ligação da ocitocina com seu receptor estimula a síntese e secreção de $PGF_{2\alpha}$, responsável pelo início da luteólise (WATHES e LAMMING, 1995) e recomeço de um novo ciclo estral (AURICH, 2011).

De acordo com Ginther (1974), a $PGF_{2\alpha}$ produzida no útero atinge os ovários pelo mecanismo de contra corrente estabelecido entre a veia uterina e a artéria ovariana. Na égua esse mecanismo não é muito eficiente, tendo a ação sistêmica uma via importante para a lise de CL.

2.3 Hormonioterapia e farmacopuntura na reprodução da fêmea equina e asinina

A utilização de hormônios na reprodução equina tem diversos benefícios, como: prolongamento da estação reprodutiva; maior número de ciclo estral; superovulação; mais embriões/ciclo; a possibilidade de tornar o ambiente uterino propício ao desenvolvimento embrionário; a indução de parto e aborto; o auxílio no tratamento de infecções uterinas; e a contribuição na utilização de biotécnicas reprodutivas de IA, TE, criopreservação de embriões,

fertilização *in vitro* (FIV), vitrificação de embriões e indutores de ovulação (FARIA e GRADELA, 2010).

Vários hormônios vêm sendo utilizados como indutores de ovulação para equídeos. A hCG e o acetato de deslorelina (análogo do GnRH) são os agentes farmacológicos comumente utilizados para indução de ovulação em éguas e jumentas, podendo ser utilizados associados ou não. Outros análogos de GnRH estão sendo testados com eficácia em éguas e jumentas, como: acetato de buserelina (CAMILLO *et al.*, 2014), acetato de lecirelina (AWAN *et al.*, 2016) e acetato de triptorelina (SINCLAIR *et al.*, 2015).

Segundo Yoon *et al.* (2007), o hormônio luteinizante recombinante equino (reLH) é confiável e eficiente para induzir ovulação em éguas.

2.3.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)

A hCG é sintetizada pelas células trofoblásticas sinciciais da vesícula coriônica da placenta humana e é eliminada pela urina poucas semanas após a concepção, atingindo concentrações máximas em 50 dias de gestação e decrescendo a níveis insignificantes em seguida (MCDONALD, 1988).

É uma glicoproteína hormonal que promove a manutenção do CL durante o início da gestação e da secreção de progesterona na espécie humana (HANSEL e BLAIR, 1996). É composta por subunidades α e β , com peso molecular de 30.000 daltons e tempo de meia vida entre 8 a 12 horas (NEWCOMBE, 2011). A subunidade β possui atividade biológica semelhante ao LH, aproximadamente 80% (COLE, 2009) e apresenta alguns efeitos semelhantes ao FSH (KAYISLI *et al.*, 2003).

Foi o primeiro hormônio a ser utilizado como indutor de ovulação em éguas (DAY, 1939) e tem sido usada com eficácia, reduzindo o número de inseminações ou de coberturas necessárias por estro das éguas e jumentas (BERGEFELT, 2000; LEY, 2006; CARLLUCIO *et al.*, 2007). A utilização da hCG sincroniza o estro e a ovulação, elevando os índices de fertilidade, as concentrações plasmáticas de P_4 e a taxa de gestação em éguas (OLIVEIRA e

SOUZA, 2003) e jumentas (CARLLUCIO *et al.*, 2007). Consequentemente ao aumento da P₄, os tónus uterino e cervical, a morfoecogenicidade uterina e luteal e o diâmetro do corpo lúteo melhoram, sendo as características reprodutivas desejáveis para a transferência de embrião equino (FLEURY *et al.*, 2007).

Para que ocorra eficácia na indução da ovulação utilizando hCG, é necessária a presença de um folículo dominante com tamanho ≥ 35 mm para as éguas e ≥ 30 mm para jumentas, além de edema uterino grau 2 a 3 (BERGFELT, 2000; LEY, 2006; CARLLUCIO *et al.*, 2007). Com essas características, a ovulação ocorre em até 48 horas após o tratamento (LEY, 2006; DAVIES MOREL e NEWCOMBE, 2008). A dose de hCG para indução da ovulação em éguas pode variar de 750 a 4000UI (MCKINNON e VOSS, 1992; PERES *et al.*, 2006; DAVIES MOREL e NEWCOMBE, 2008; BEAL *et al.*, 2011; ROMANO *et al.*, 2015).

A utilização da hCG, como agente indutor, resultou em características uterinas desejáveis em receptoras de embrião (SOUSA *et al.*, 2007), mesmo não tendo diferença nas concentrações plasmáticas de progesterona, comparando com éguas de ovulação espontânea (URQUIETA *et al.*, 2009).

O uso de hCG foi associado com melhores taxas de prenhez decorrente ao aumento da perfusão sanguínea e do diâmetro do folículo pré-ovulatório, entre o momento da indução da ovulação e 30 horas após (SILVA *et al.*, 2006). Quando utilizado 2500UI de hCG, 11 de 13 éguas ovularam entre 36 a 48 horas e duas ovularam de 96 a 120 horas (PERES *et al.*, 2006).

Após administrar 1000; 1500 e 2000UI de hCG, Beal *et al.* (2011) concluíram que uma única dose de 1000UI de hCG é eficiente para induzir a ovulação em éguas Crioulas. Romano *et al.* (2015) verificaram ovulações de 24 a 48 horas após indução com diferentes doses de hCG (750; 1500 e 2500UI) em folículos >35 mm. Davies Morel e Newcombe (2008) também utilizaram a dose de 750UI e 1500UI de hCG em éguas por via SC, obtendo 92,5% e 92,4% de ovulações em até 48 horas.

Utilizando 2500UI de hCG por via IV em 27 jumentas, divididas em dois grupos conforme o diâmetro do folículo pré-ovulatório hCG1=30 a 35mm (n=12) e hCG2=36 a 40mm (n=15), Carluccio *et al.* (2007) detectaram 11 ovulações

para hCG1 e 15 ovulações para hCG2 até 48 horas após aplicação. No mesmo estudo, observaram a relação entre diâmetro e tempo de ovulação, onde quanto maior o folículo, menor é o tempo de ovulação após aplicação do hCG e formularam a equação: Tempo de ovulação = 136,85 – (2,65 x Diâmetro).

As vias de administração da hCG mais comumente utilizadas em éguas e jumentas são a IM (CARD *et al.*, 1997), IV (BEAL *et al.*, 2011; ROMANO *et al.*, 2015) ou SC (DAVIS MOREL e NEWCOMBE, 2008).

2.3.2 Farmacopuntura

A acupuntura é uma técnica milenar baseada no estímulo de pontos específicos (acupontos), com o objetivo de produzir efeitos terapêuticos ou homeostáticos. Os acupontos são considerados portas de entrada e saída de energia vital circulante, denominada de Qi (ALTMAN, 1997).

A acupuntura veterinária é quase tão antiga quanto à técnica utilizada em humanos. Apesar disso, no Brasil seu início efetivo só se deu em meados da década de 1980 (SCOGNAMILLO-SZABÓ *et al.*, 2006), em 1988 com a Resolução Nº 5/88, da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (Ciplan), tendo as suas normas fixadas para o atendimento nos serviços públicos de saúde. Posteriormente, em 1995 foi reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina, e posteriormente pela Associação Médica Brasileira e pela Comissão Nacional de Residência Médica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Os pontos da acupuntura, denominados de acupontos, possuem algumas características, como propriedades elétricas especiais (ALTMAN, 1997), maior temperatura (MA, 1992; VETERINARY ACUPUNCTURE, 1992) e concentração maior de mastócitos (KENDALL, 1989a; KENDALL, 1989b; HWANG, 1992). Pontos de acupuntura se localizam próximos a nervos, vasos sanguíneos, tendões, periósteos e cápsulas articulares (WU, 1990).

Na reprodução, a acupuntura é utilizada devido sua ação na liberação de neurotransmissores que estimula a secreção de gonadotrofinas, o fluxo

sanguíneo do útero e a produção de opioides endógenos que inibem o sistema nervoso central na resposta ao estresse biológico (LACEY *et al.*, 2009).

A injeção de fármacos no acuponto, denominada de farmacopuntura, é uma opção interessante para acupuntura em animais, potencializando os efeitos de hormônios e medicações (ZHOU *et al.*, 2005; WANG *et al.* 2007; FARIA *et al.*, 2008).

A redução da dose aplicada tem os benefícios de reduzir os efeitos secundários indesejáveis, os resíduos em produtos de origem animal e os custos (ZHOU *et al.*, 2005; LUNA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2007). Em animais, a hormonioterapia pela farmacopuntura pode ser empregada em protocolos de indução e/ou sincronização de estro (MARTINEZ *et al.*, 2007). Segundo Wang *et al.* (2007), em muitas situações o uso de subdoses, produz um efeito longo e similar à dose convencional, com a vantagem de causar menos efeitos colaterais.

Pelos princípios da medicina oriental, os órgãos internos (principalmente rim, baço, pâncreas, fígado e coração) e meridianos (canais de energia) abastecem o útero, o feto, a placenta, os ovários e as glândulas mamárias em lactação com o Qi e o sangue, que são os elementos essenciais para a manutenção vital e funcional dos seres vivos (Lin *et al.*, 1999).

Por não apresentar um meridiano próprio para tratar o sistema reprodutor, são escolhidos pontos relacionados aos órgãos, meridianos ou funções mais próximas. Segundo Lin *et al.* (1999), os principais pontos indicados para o tratamento de disfunções reprodutivas, independente da sua causa, são o *Bai hui*, VG2 (*Weiken*), VG1 (*Hou Hai*), B23, B25 e *Yanchi*.

Existem duas teorias para explicar os mecanismos da acupuntura na reprodução que promovem alterações nos níveis plasmáticos de LH, FSH, E₂ e P₄. A primeira teoria sugere que o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal sofre ação da endorfina, que tem sua liberação provocada pelo estímulo da acupuntura, promovendo uma depressão temporária na secreção de LH e após o estímulo ocorra um efeito compensatório, tornando a hipófise mais reativa ao GnRH. A segunda se refere em estimular a produção e liberação de adrenalina, catecolaminas, estrogênios e fatores de crescimento, provocando efeitos

diretos sobre o controle gonadal parácrino e autócrino da esteroidogênese (LIN *et al.*, 2006).

Um dos acupontos com ação no sistema reprodutor é o *Hou Hai*, também conhecido como Vaso Governador 1 (VG1), Chang Qiang ou Mar Caudal. Localizado na depressão entre a distância média da base ventral da cauda e o ânus, é indicado para tratar desordens reprodutivas e pode ser utilizado em protocolos de biotécnicas da reprodução em fêmeas mamíferas, com efeitos na ciclicidade ovariana (LIN *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008).

A aplicação de 30% da dose de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no acuponto *Hou Hai* em cabras para sincronização de estro e ovulação, realizado por Cardoso *et al.* (2014), obteve taxa de crescimento folicular de $2,14 \pm 0,09$ mm/dia, diâmetro médio do maior folículo foi de $7,39 \pm 0,16$ mm e diâmetro médio do segundo maior folículo de $5,83 \pm 1,56$ mm, estando estes dentro dos limites para a espécie caprina. No mesmo estudo, foi obtido 70,6% para taxa de gestação.

Também foi eficiente a utilização de subdoses hormonais de eCG (30% da dose normalmente utilizada) aplicadas no acuponto *Hou Hai* em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para vacas de corte, equiparando os resultados de induzir o crescimento folicular e ovulação, momento de ovulação, área de corpo lúteo e taxa de gestação com o grupo controle (ARAÚJO, 2014).

Em vacas, podem ser usadas injeções de prostaglandina, no caso de persistência de corpo lúteo, ou ainda eletroacupuntura no ponto VG1 em ambos os casos (LIN *et al.*, 1999).

Testando outro ponto, Alvarenga *et al.* (1998) utilizaram 10% da dose recomendada de $\text{PGF}_2\alpha$ no acuponto *Bai Hui* para induzir luteólise em éguas. Utilizando o mesmo acuponto, subdoses de $\text{PGF}_2\alpha$ induziu a luteólise em 4% e 20% de vacas que receberam 10% e 25% da dose recomendada, respectivamente (PESSOA *et al.*, 2004).

Costa *et al.* (2000) trataram éguas virgens com retardo na manifestação de estro utilizando o ponto *Bai Hui* com estimulação elétrica, obtendo taxa de gestação à primeira cobertura de 88,8% no grupo tratado, contra 58,3% no

grupo controle. Por outro lado, Nie *et al.* (2001) não obtiveram resultados positivos no tratamento pela acupuntura na indução de estro em éguas.

2.4 Ultrassonografia na reprodução equina e asinina

A utilização do ultrassom como instrumento diagnóstico passou a ser disponível à comunidade médica somente no início dos anos 70. Por apresentar imagens em tempo real ou dinâmicas, tornou-se uma tecnologia importante e adaptável para o estudo do trato reprodutivo de grandes animais pela via transretal, que era acessível apenas pelo sentido tátil (PIERSON *et al.*, 1988).

Porém, foi na década de 80 que a técnica revolucionou as pesquisas dos eventos reprodutivos e patológicos em programas de reprodução assistida, sendo a espécie equina a mais utilizada no exame *in vivo* do trato reprodutivo (FERREIRA e MEIRA, 2011).

O exame ultrassonográfico acrescentou conhecimentos sobre diversos acontecimentos da fisiologia reprodutiva. Pode ser realizado diversas vezes, por vários dias de forma alternada ou em observação contínua de um evento dinâmico, já que não é invasivo e prejudicial aos tecidos (PEIXOTO, 2010). A evolução da técnica é responsável pela compreensão dos eventos fisiopatológicos, tornando melhor o desempenho das biotecnologias (ANDRADE MOURA, 2012). Na espécie equina, é realizado pela técnica transretal que proporciona imagens detalhadas do sistema reprodutivo, devido à proximidade com a parede retal (PIMENTEL *et al.*, 2014).

A dinâmica folicular ovariana, assim como o desenvolvimento embrionário, são acontecimentos reprodutivos fisiológicos da fêmea que necessitam do acompanhamento ultrassonográfico seriado para serem compreendidos. O CL, por exemplo, no terceiro dia após a ovulação é inicialmente hipoecoico comparado com a fase funcional, na qual se apresenta como estrutura hiperecogênica com limites demarcados, podendo apresentar

uma cavidade central anecoica. Quando detectada a redução do diâmetro do CL, inicia a fase de luteólise (MAIA, 2011).

2.4.1 Modo Bidimensional

Consiste de um conjunto de ecos ultrassonográficos dispostos num plano lado a lado, produzindo uma determinada imagem bidimensional de um “corte” de tecido em tempo real (GINTHER, 1986). O modo-B utiliza escalas de cinza e é primordialmente empregado para a identificação anatômica de estruturas (FERREIRA e MEIRA, 2011).

A ultrassonografia modo-B baseia-se na emissão de ondas sonoras de alta frequência, mediante a estimulação elétrica de cristais piezelétricos presentes no transdutor. Ao se chocarem com uma interface, as ondas geram um eco que é refletido ao transdutor e visualizado em forma de pontos brilhosos ao monitor. O vigor do brilho depende da densidade dos tecidos que atravessa e da profundidade a que chega a onda sonora (WILLIAM *et al.*, 2001).

Existem transdutores de uma única frequência (fixa) e de multifrequência, que pode ser controlada pelo operador. As ondas sonoras são emitidas em impulsos, permitindo a recepção de um eco de retorno antes de outro pulso ser enviado. O intervalo entre pulsos é chamado de frequência de repetição de pulso (PRF) e em ultrassom Doppler está sob o controle do operador (GINTHER e UTT, 2004).

As imagens formadas em cor negra (anecoicas ou anecogênicas) são de estruturas que não refletem o som, tais como folículos ovarianos, vesículas embrionárias e a bexiga. Estruturas de menor densidade geram imagens mais cinzas (hipoecoicas ou hipoecogênicas) como o útero e rim. Já as mais densas se mostram de cor branca no monitor (imagens hiperecoicas ou hiperecogênicas), tais como a superfície dos ossos pélvicos (WILLIAM *et al.*, 2001; MOELLER, 2002).

Utilizando a ultrassonografia modo-B, é possível avaliar o grau de edema uterino, a presença de líquido no lúmen uterino, a mensuração de folículos ovarianos e caracterizar o CL em tamanho, forma e consistência (ANDRADE MOURA *et al.*, 2014).

A aparência ultrassonográfica do útero e das estruturas presentes nos ovários auxilia a determinação do estágio do ciclo estral (PEREIRA *et al.*, 2014). Segundo Gastal *et al.* (2006), é possível prever o momento da ovulação pelo modo-B, levando-se em consideração alterações morfoecológicas do folículo dominante.

A detecção da presença de líquido intrauterino pelo modo-B, é primordial para realizações de exames mais específicos com o objetivo de diagnosticar a endometrite (PEREIRA *et al.*, 2014).

A detecção do momento da ovulação em éguas com 24 horas de antecedência pode ser estimada na ultrassonografia modo-B pela combinação de espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa, perda do contorno esférico do folículo, destacamento de segmentos da granulosa e manchas ecogênicas no antro, associado à diminuição do edema uterino (CARNEVALE *et al.*, 1988).

2.4.2 Doppler colorido

O Doppler é definido como o princípio físico que ocorre quando o objeto (corpo) refletor se move em relação ao transdutor, alterando a frequência das ondas sonoras refletidas (GINTHER, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008). Considerado uma ferramenta associada à ultrassonografia convencional (modo-B), fornece informações da vascularização em tempo real das estruturas em análise (CARVALHO *et al.*, 2008).

A frequência Doppler é a diferença entre as ondas emitidas pelo transdutor e os ecos recebidos. Se o objeto em estudo estiver se aproximando do transdutor, a frequência de deslocamento Doppler é positiva, e se estiver se afastando, é negativa (ZAGZEBSKI, 2000). Essa frequência é audível aos

seres humanos, após serem processadas por um autofalante, podendo ser uma ferramenta adicional para avaliações qualitativas no momento da análise (ZWIEBEL, 2000).

Na ultrassonografia Doppler, o PRF deve ser ajustado alto quando é direcionado a vasos que estão próximos ao transdutor ou o fluxo sanguíneo é grande. Quando o PRF é ajustado baixo para os vasos que estão longe do transdutor ou o fluxo é lento, aumenta a probabilidade de artefatos na imagem (GINTHER e UTT, 2004).

Importantes características morfofuncionais podem ser captadas pelo Doppler, obtendo informações sobre o fluxo sanguíneo de órgãos, tecidos ou diretamente de vasos sanguíneos específicos (GINTHER, 2007; SILVA, 2010).

De acordo com a área alvo a ser avaliada, pode ser escolhido o modo de ação da técnica, que são: o Doppler espectral e o colorido. Quando o foco de estudo são vasos sanguíneos específicos, o Doppler espectral é utilizado para avaliação das velocidades, da pulsatividade e resistência do fluxo sanguíneo. Nesta análise, o resultado é a produção de um gráfico espectral, gerado pela mensuração das velocidades. Para evitar o fluxo laminar e ter melhores resultados, a janela de captação do Doppler espectral deve ser direcionada para o centro do vaso (GINTHER e UTT, 2004).

Bollwein *et al.* (2004) utilizaram avaliações Doppler espectral da artéria ovariana para caracterizar a perfusão vascular dos ovários. Observaram que durante o diestro, os ovários com presença de CL possuíam maior fluxo sanguíneo, não tendo diferença durante o estro.

Já quando o intuito é avaliar uma estrutura ou órgãos como um todo, o Doppler colorido é utilizado para análise geral da perfusão sanguínea (SILVA, 2010). Nesse modo, a imagem obtida representa a área de fluxo sanguíneo em pontos coloridos adicionados em uma imagem ultrassonográfica no modo-B em uma área delimitada pelo operador (box). Este apresenta duas funções: a Color-flow e Power-flow (GINTHER, 2007).

Os feixes de ultrassom são emitidos separadamente do transdutor para o Color-flow (fluxo colorido) e o modo-B, sendo que o Doppler colorido necessita de 8 a 10 vezes mais ciclos (1 ciclo= 1 pulso e os ecos resultantes). Os ecos resultantes do impulso podem ser móveis ou não, porém ocorre a

eliminação das partes dos sinais imóveis e os ecos refletidos em movimento são submetidos a um autocorrelador. O processo de autocorrelação calcula a velocidade média e a variância, indicando a direção e a intensidade do fluxo sanguíneo por variação nos pixels de cor (GINTHER e UTT, 2004).

Na função Color-flow, os pixels coloridos indicam a direção e o fluxo sanguíneo, sendo a velocidade caracterizada pela cor mais escura (baixa velocidade) e a clara (alta velocidade). O fluxo em direção ao transdutor é diferenciado por cores, vermelho se aproximando e o azul se afastando, não sendo representações de fluxo sanguíneo venoso ou arterial, devido à direção ser relacionada ao transdutor e não considera a anatomia corporal (GINTHER e UTT, 2004).

A configuração de cor em relação à direção de deslocamento do objeto pode ser alterada nos aparelhos ultrassonográficos (ZWIEBEL, 2000). Uma legenda é exibida no monitor de ultrassom, mostrando as variações de cores. Para determinar a direção verdadeira, é necessário se referir a um vaso sanguíneo conhecido (GINTHER e UTT, 2004).

A função Power-flow é mais sensível (3 a 5 vezes) e permite uma avaliação mais precisa dos pequenos vasos sanguíneos ou com baixo fluxo. Os pixels coloridos são exibidos em escala de uma cor com intensidades variadas de acordo com a velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

Os artefatos de imagens são comuns no modo-B e Doppler (GINTHER, 1995). A principal dificuldade em exames com Doppler do trato reprodutivo equino são os movimentos dos animais e a motilidade intestinal, já que ferramenta é sensível ao movimento de glóbulos vermelhos, porém responde a movimentos do animal ou dos tecidos (GINTHER, 2007).

A avaliação com Doppler pode ser estimada adotando pontuações de forma subjetiva no momento das avaliações. Porém a subjetividade pode ser convertida em objetividade especialmente para a pesquisa, utilizando as imagens salvas para posterior análise pelo examinador ou por outro operador (GINTHER, 1992).

Os pontos coloridos ou agregados de pixels podem ser selecionados a partir das imagens, extraídos e salvos usando um programa de edição de

imagem. Alguns softwares podem ser utilizados para calcular o número total de pixels coloridos para cada imagem selecionada (GINTHER e UTT, 2004).

Pela via transretal, é utilizada para caracterização da hemodinâmica do sistema reprodutor em equinos (GINTHER e UTT, 2004; MIYAMOTO *et al.*, 2006; HERZOG e BOLLWEIN, 2007). Pelo meio da avaliação de fluxo sanguíneo pelo Doppler colorido, foi possível estudar a seleção folicular (ACOSTA *et al.*, 2004b), folículo não ovulatório durante os períodos de transição (ACOSTA *et al.*, 2004a), comparar a primeira ovulação com as posteriores do ano (GASTAL *et al.*, 2007), a maturidade do folículo e proximidade com a ovulação (GASTAL *et al.*, 2006a; GASTAL *et al.*, 2006b; PALMER *et al.*, 2006; GINTHER *et al.*, 2007a), a taxa de recuperação, maturidade e qualidade de oócitos (GINTHER *et al.*, 2007b), os efeitos relacionados com a idade (GINTHER *et al.*, 2009) e estabelecimento da gestação (SILVA *et al.*, 2006; SIDDIQUI *et al.*, 2009a). Segundo Pereira *et al.* (2014), a ultrassonografia Doppler é apropriada para complementar o diagnóstico da endometrite bacteriana.

Com o intuito de melhorar a vascularização ovariana sob influência hormonal, Bollwein *et al.* (2004) utilizaram aplicações de P₄ diária e E₂ a cada 5 dias após a ovulação. Os ovários das éguas tratadas apresentaram uma menor perfusão sanguínea comparada ao controle. Altermatta *et al.* (2012) não verificaram aumento na vascularização ovariana e folicular após administrarem FSH e LH individualmente.

Gastal *et al.* (2006a) descreveram aumento progressivo da vascularização folicular no momento da indução da ovulação após o tratamento com hCG e diminuindo bruscamente nas quatro horas que antecederam a ovulação, detectadas com avaliações com intervalo de uma hora.

Após aplicações com diferentes doses de hCG comparada com éguas de ovulações espontâneas, Romano *et al.* (2015) não verificaram diferença para área, volume, perfusão sanguínea luteal e concentração de P₄ sérica.

CAPÍTULO 1. EFEITO DA SUBDOSE DE HCG NO ACUPONTO HOU HAI NA DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM ÉGUAS

[Effect of hcg sub-dose no acupoint hou hai in dynamic and follicular luteal development in mares]

Manuscrito a ser submetido ao Periódico Equine Veterinary Journal, Qualis A1 na Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

M. O. RIBEIRO¹, R. F. BITTENCOURT², L. P. BARBOSA*¹

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

²Universidade Federal da Bahia - UFBA

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

RESUMO

O objetivo com o estudo foi avaliar os efeitos da subdose de gonadotrofina coriônica humana (hCG) no acuponto *Hou Hai*, como indutor de ovulação em éguas. Utilizou-se 15 éguas mestiças distribuídas em Blocos Casualizados em três tratamentos (T), sendo: T1= aplicação de 1500UI de hCG (100% da dose), por via intravenosa (IV); T2= 450UI de hCG (30% da dose) em falso acuponto (IV) e T3= 450UI de hCG (30% da dose) aplicada no acuponto *Hou Hai*. Os animais foram monitorados por ultrassonografia modo-B, até que o folículo pré-ovulatório estivesse com diâmetro ≥ 35 mm e edema uterino grau 3, quando se procedeu a indução da ovulação com hCG e avaliação com Doppler colorido. Após aplicação do indutor de ovulação, os exames modo-B foram realizados duas vezes ao dia para detectar o momento da ovulação (D0). O diâmetro médio do CL e sua vascularização foram acompanhados modo-B e Doppler no D0, D2, D4 e D8 após ovulação, com coleta de sangue no D8 para determinação da concentração sérica de progesterona (P_4). Os dados foram submetidos à análise de normalidade, seguido dos testes estatísticos adequados para cada variável. Não houve diferença ($P > 0,05$) para diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios ($38,2 \pm 1,3$ mm); taxa de ovulação (91,11%); intervalo entre indução e ovulação ($43,48 \pm 2,48$ h); diâmetro médio de CL (D0= $25,3 \pm 2,3$; D2= $31,1 \pm 0,7$; D4= $29,0 \pm 0,4$ e D8= $25,6 \pm 1,3$ mm); concentrações séricas de P_4 ($5,02 \pm 0,52$ ng/mL). Houve diferença ($P < 0,05$) para taxa de ovulação acima de 48h após indução, com taxas de 0 (T1); 13,33 (T2) e 33,33% (T3), com superioridade do T3 em relação aos outros tratamentos; valor numérico de pixel mínimo do folículo pré-ovulatório (T1= $40,33 \pm 2,57$; T2= $36,84 \pm 2,24$ e T3= $39,31 \pm 3,36$). A utilização de subdose de hCG por via IV ou em acuponto *Hou Hai* foi eficiente em promover a indução de ovulação em éguas, mostrando que a dose padrão de hCG atualmente utilizada para a espécie está superestimada.

Palavras chave: Doppler; eqüino; farmacopuntura; hormonioterapia; progesterona

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effects of human chorionic gonadotrophin (hCG) subdose in *Hou Hai* acupuncture as an inducer of ovulation in mares. Fifteen crossbred mares distributed in randomized blocks were used in three treatments (T): T1= application of 1500IU of hCG (100% of the dose), intravenously (IV); T2=450IU of hCG (30% of the dose) in false acupoint (IV) and T3= 450IU of hCG (30% of the dose) applied in *Hou Hai* acupoint. The animals were monitored by B-mode ultrasonography until the preovulatory follicle was ≥ 35 mm in diameter and grade 3 uterine edema, when ovulation induction with hCG and color Doppler evaluation were performed. After application of the ovulation inducer, the B-mode exams were

performed twice a day to detect the moment of ovulation (D0). The mean diameter of CL and its vascularization were monitored in B-mode and Doppler in D0, D2, D4 and D8 after ovulation, with blood collection in D8 to determine serum progesterone concentration (P₄). Data were submitted to normality analysis, followed by appropriate statistical tests for each variable. There was no difference (P>0.05) for the mean diameter of the preovulatory follicles (38.2±1.3mm); ovulation rate (91.11%); interval between induction and ovulation (43.48±2.48h); mean diameter of CL (D0=25.3±2.3, D2=31.1±0.7, D4=29.0±0.4 and D8=25.6±1.3mm); serum concentrations of P₄ (5.02±0.52ng/mL). There was a difference (P<0.05) for ovulation rate above 48h after induction, with rates of 0 (T1); 13.33 (T2) and 33.33% (T3), with T3 superiority in relation to the other treatments; minimum number of preovulatory follicles (T1=40.33±2.57, T2=36.84±2.24 and T3=39.31±3.36). The use of hCG subdose IV or *Hou Hai* acupuncture was efficient in promoting ovulation induction in mares, showing that the standard dose of hCG currently used for the species is overestimated.

Keywords: Doppler; equine; hormone therapy; pharmacopuncture; progesterone

INTRODUÇÃO

Para obter melhores resultados com as técnicas de manejo reprodutivo na equideocultura; como a inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado ou criopreservado; transferência de embrião ou de oócito; o uso de indutores de ovulação tem se tornado essencial, visto que nesta espécie o período de estro é prolongado [1].

A gonadotrofina coriônica humana (hCG), por possuir semelhança com o hormônio luteinizante (LH), é o indutor mais utilizado em éguas, promovendo a ovulação em até 48 horas após aplicação. Porém, seu uso repetitivo e doses excessivas podem estimular o desenvolvimento de anticorpos e reduzir a eficácia como indutor de ovulação [2].

A utilização de subdoses de hCG, além de permitir aplicações sucessivas durante a estação reprodutiva [3], reduz custos e talvez a preocupação com formação de anticorpos [4].

Além das vias tradicionalmente utilizadas, intravenosa (IV), intramuscular (IM) e subcutânea (SC) [4–6], a farmacopuntura é a aplicação de medicamentos em um ponto específico da acupuntura, que possibilita utilizar doses menores que as convencionais, ocasionando resultados similares [7–9]. Por ser de fácil acesso, o acuponto *Hou Hai*, localizado na área entre a distância média da base ventral da cauda e o limite dorsal do ânus, pode ser utilizado na rotina a campo, viabilizando a técnica [10].

A utilização da farmacopuntura permite o uso da subdose de hCG como indutor de ovulação em éguas, obtendo resultados semelhantes ou melhores as doses superiores aplicadas pela via intravenosa. Desta forma, objetivou-se verificar a eficiência da subdose de hCG administrada no acuponto *Hou Hai* como indutor de ovulação em éguas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na cidade de Entre Rios – Bahia, na Fazenda Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia-UFBA, durante o período de setembro de 2016 a fevereiro de 2017. O município está localizado, em latitude 11°56'31" Sul, longitude 38°05'04" Oeste e altitude de 152 metros ao nível do mar. O clima é tropical com estação seca no verão (classificação climática de Köppen-Geiger), o período chuvoso ocorre entre os meses de abril a julho, com pluviosidade anual média de 1550mm e temperatura média de 24°C, chegando a mínima de 16,8°C e máxima de 32,5°C [11].

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, sob registro nº 67/2016.

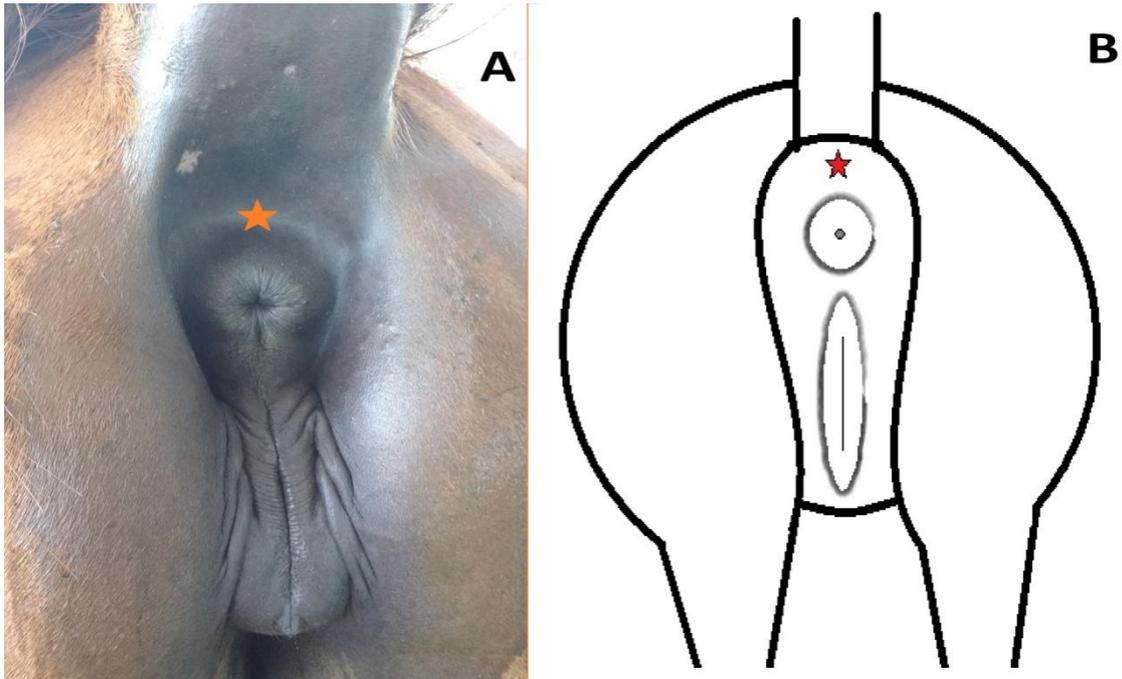
Foram utilizadas 15 éguas mestiças em atividade reprodutiva, consideradas híginas após exame físico (frequência cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, coloração das mucosas e hidratação) e obstétrico (conformação de vulva, avaliação ultrassonográfica do útero e ovário).

Os animais apresentaram escore de condição corporal entre 4 (moderadamente magra) e 6 (moderadamente carnuda), de acordo com Henneke *et al* [12]. As fêmeas foram submetidas a sistema semi-intensivo de produção, em pasto de capim pangola (*Digitaria decumbens*) e brachiaria (*Brachiaria decumbens*), com suplementação à base de milho moído (57,7%), farelo de soja (40,8%) e sal mineral (1,5%), ofertado 500g/animal duas vezes ao dia, com água *ad libitum*.

As éguas foram distribuídas em Delineamento em Blocos Casualizados (n=45), em três tratamentos e quinze repetições por tratamento, sendo 1 animal por unidade experimental, e o período utilizado como fator de blocagem. Os tratamentos (T) foram: T1 (n=15): 1500UI de hCG (Chorulon[®], MSD, Brasil) por via intravenosa (IV) na jugular; T2 (n=15) (falso acuponto): 450UI de hCG/IV na jugular e T3 (n=15): 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai* (Fig. 1).

Foi realizada antissepsia prévia às aplicações de hCG por IV na jugular e no acuponto *Hou Hai* com álcool 70% assim como nas coletas de sangue para dosar concentração sérica de P₄.

Figura 1. Local de inserção da agulha no acuponto *Hou Hai*

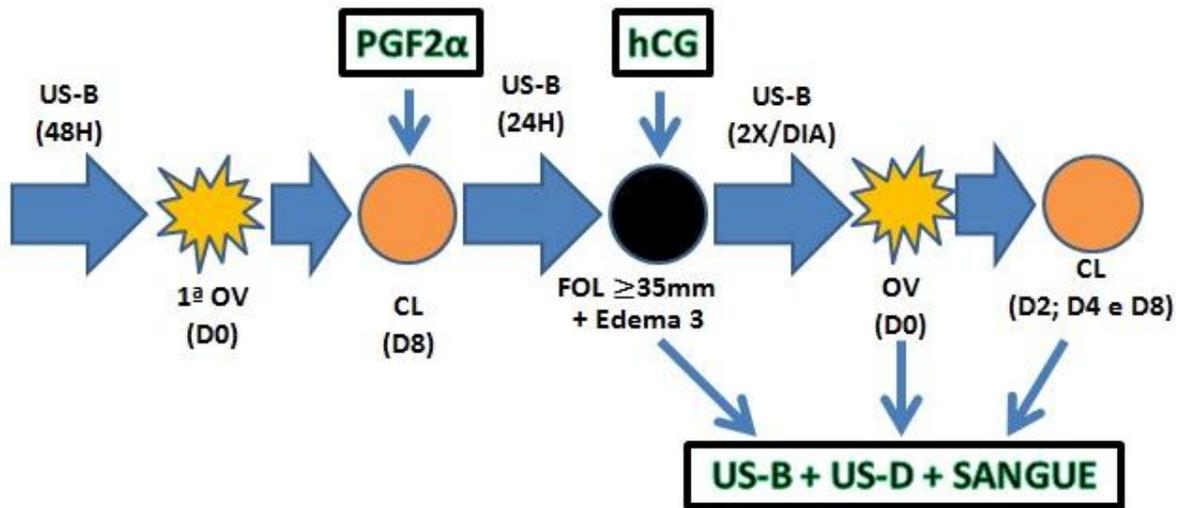


Note em A e em B a estrela vermelha identificando o local de inserção da agulha no acuponto *Hou Hai*.

Para as aplicações no acuponto *Hou Hai* (entre a base ventral da cauda e o ânus), foi utilizada uma seringa de 1mL, acoplada a um cateter 16G e inserida a 45°, com a profundidade de 45mm (tamanho do cateter).

Os parâmetros avaliados foram: diâmetro médio (média entre a maior medida horizontal e a maior medida vertical) e vascularização (valores numéricos de pixels mínimo, máximo, médio e heterogeneidade) do folículo pré-ovulatório e do CL nos momentos D0, D2, D4 e D8; taxa de ovulação; intervalo entre indução e ovulação; taxa de ovulação acima de 48 horas após indução e concentração sérica de P₄ no D8.

Figura 2. Metodologia experimental

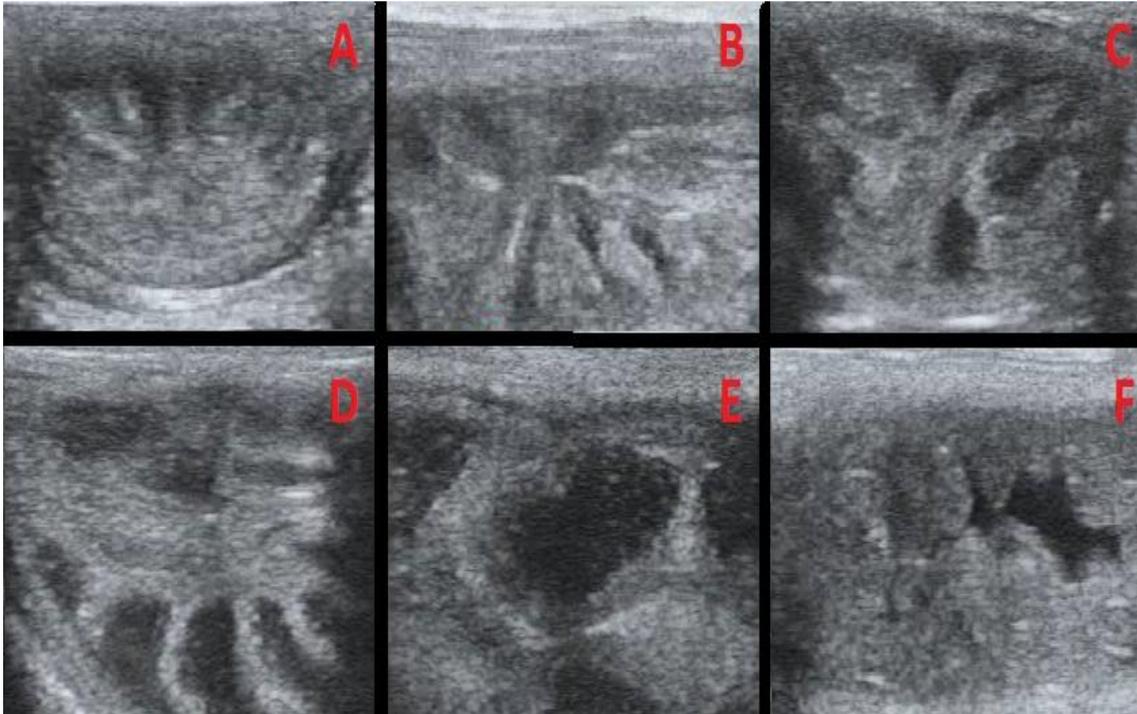


Todas as fêmeas foram monitoradas a cada 48 horas por meio de exame ultrassonográfico, tendo a primeira ovulação da estação reprodutiva descartada, para evitar a fase de transição e confirmar o restabelecimento da atividade reprodutiva na estação de monta. Oito dias após a primeira ovulação, todas as éguas receberam 5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Pfizer, Estados Unidos da América) por via IM, como agente luteolítico.

Após aplicação da $PGF_{2\alpha}$, as fêmeas foram monitoradas pelo modo-B diariamente. Quando o folículo dominante alcançou um diâmetro $\geq 35\text{mm}$ e presença de edema uterino grau 3 [13] (Fig. 3); foi realizado exame ultrassonográfico do folículo pré-ovulatório no modo Doppler colorido para avaliar a vascularização perifolicular (Fig. 4) e a ovulação foi induzida com hCG, segundo dose e via de cada tratamento específico.

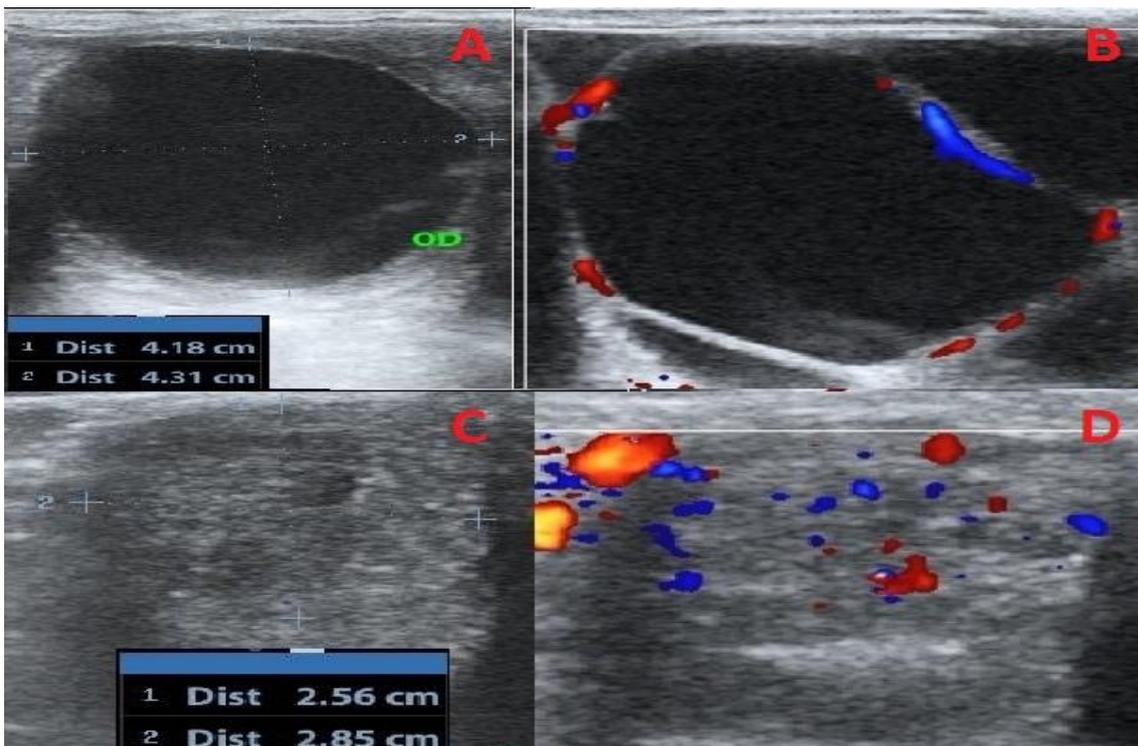
Após a aplicação do indutor de ovulação, as avaliações modo-B foram realizadas duas vezes ao dia (manhã e tarde) para determinar o momento aproximado da ovulação, com o desaparecimento da imagem do folículo (anecogênica) e substituído pela imagem do CL (hipoecogênico) (Fig. 4).

Figura 3. Imagens ultrassonográficas de avaliação do grau de edema uterino de éguas pelo modo-B



Note em: A = edema uterino grau 1; B = edema uterino grau 2; C = edema uterino grau 3; D = edema uterino grau 4; E = edema uterino grau 5; F = líquido intrauterino.

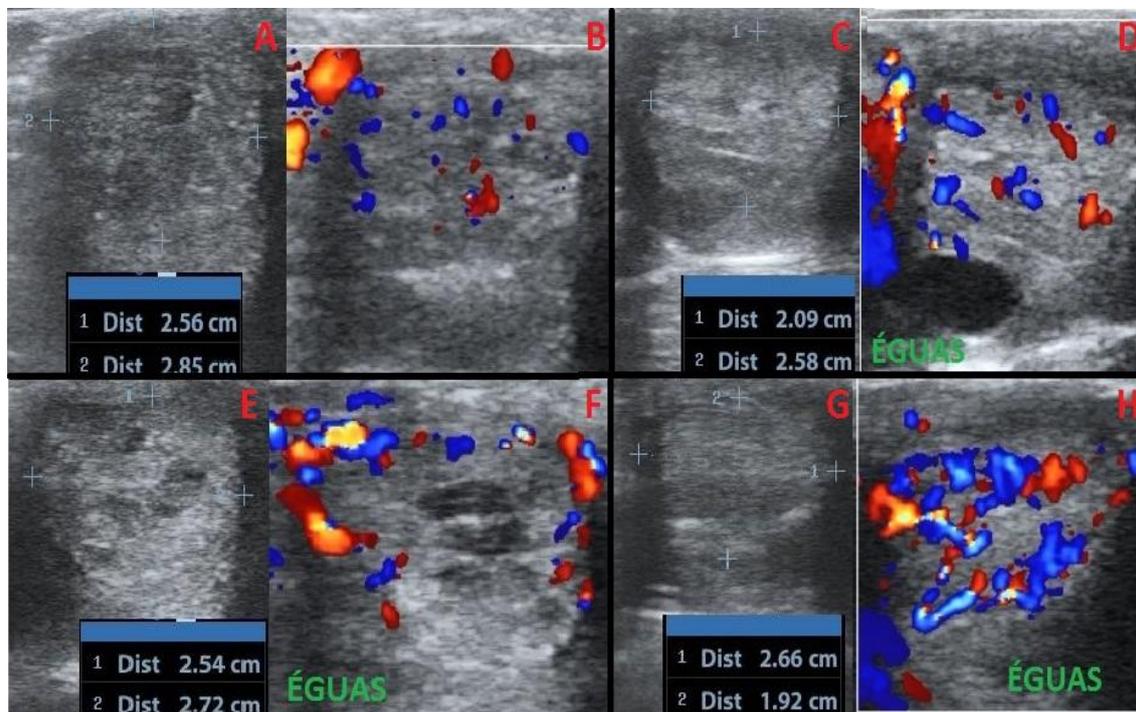
Figura 4. Imagens ultrassonográficas modo-B e Doppler colorido do folículo no momento da indução e do corpo lúteo após ovulação de éguas



Note em A e B= folículo pré-ovulatório (anecogênico); C e D= CL no dia da ovulação (hipocogênico).

Para acompanhar o desenvolvimento do CL, foram realizadas medidas do diâmetro médio no modo-B e vascularização no Doppler nos dias 0 (dia da ovulação, D0); 2 (D2); 4 (D4) e 8 (D8) após a ovulação (Fig. 5).

Figura 5. Imagens ultrassonográficas em modo-B e Doppler colorido do corpo lúteo em desenvolvimento de éguas



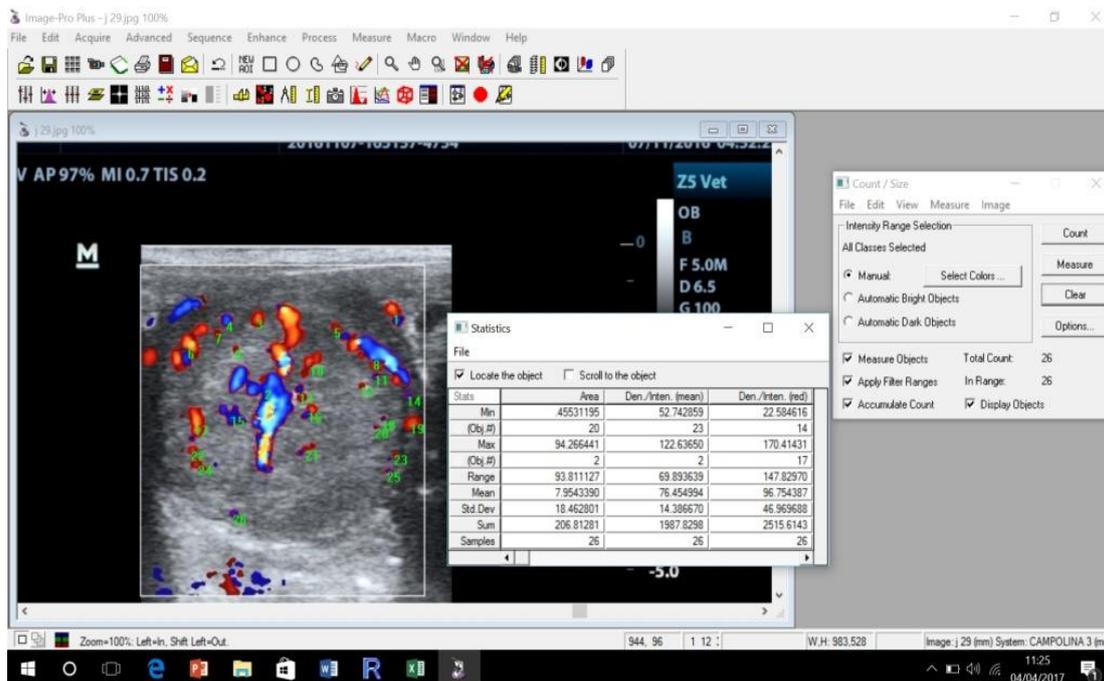
Note em A e B= dia da ovulação; C e D= dois dias após ovulação; E e F= quatro dias após ovulação; G e H= oito dias após ovulação.

Foi utilizado o ultrassom modelo Mindray Z5[®] acoplado a um transdutor transretal linear com a frequência de 5,0MHz. Foram realizadas imagens modo-B e Doppler colorido contendo as estruturas avaliadas, salvas como imagens digitais (.jpeg) e transferidas para um computador.

As imagens obtidas pelo Doppler colorido de vascularização do folículo pré-ovulatório e CL (D0, D2, D4 e D8) foram analisadas com o software Image ProPlus[®] (Media Cybernetics Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos) no Laboratório de Ultrassonografia do Setor de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. No software, foi utilizada uma ferramenta para contornar as áreas de vascularização do folículo pré-ovulatório e do CL para obter os valores médios numéricos de pixel (NPVs; dados

ecotexturais), heterogeneidade de pixel (desvio padrão de NPVs), bem como os valores de pixel mínimo e máximo (Fig. 6).

Figura 6. Imagem do corpo lúteo de éguas no Image ProPlus®



Para determinação das concentrações séricas de P_4 , amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular em tubos para coleta a vácuo sem anticoagulante, oito dias após a ovulação. Após as coletas, o sangue foi centrifugado (300G/15minutos) para obtenção do soro, o qual foi transferido para microtubos de polipropileno com capacidade para 2mL de volume. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise, que foi realizada utilizando o método de quimioluminescência, no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com o kit comercial (Access Progesterone®, Beckman Coulte, California, Estados Unidos), seguindo às orientações recomendadas pelo fabricante.

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SPSS 13.0 (2003), avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido de Análise de Variância e Teste de Tukey a 5% de probabilidade para os dados paramétricos (diâmetro médio e vascularização do folículo no momento da indução, intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação, diâmetro médio e vascularização do CL nos momentos D0, D2, D4 e D8). Para os dados não paramétricos (taxa de ovulação e taxa de ovulação após 48 horas da aplicação do

indutor), foi utilizado o teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade. Para as correlações entre diâmetro médio do CL no D8, fluxo sanguíneo do CL no D8 e progesterona sérica no D8, foi utilizada a correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas éguas que não foram domadas, não houve dificuldades na administração no acuponto *Hou Hai*, diferente das aplicações venosas na jugular, podendo ser uma via de escolha para receptoras de embrião.

Não houve diferença ($P>0,05$) para diâmetro médio do folículo pré-ovulatório, para taxa de ovulação e intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação, com a redução da dose e via de aplicação da hCG na espécie equina, porém houve diferença ($P<0,05$) para taxa de ovulação acima de 48 horas (Tab. 1).

Tabela 1. Folículo ovulatório, taxa e momento de ovulação de éguas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana no acuponto *Hou Hai*

Parâmetros	T1	T2	T3	Valor de P
Fol Pré (mm) ¹	37,0±3,40	38,0±3,80	39,6±4,50	0,774
Tx Ov (%) ²	100,00	86,67	86,67	0,342
IEIO (h) ¹	41,60±6,19	42,55±18,87	46,29±24,84	0,744
Ov>48h (%) ^{2*}	0,00	13,33	33,33	0,043

Fol Pré = Diâmetro médio do folículo pré-ovulatório; Tx Ov = taxa de ovulação; IEIO = intervalo entre indução e ovulação; Ov>48h = Ovulação acima de 48 horas após indução. T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. ¹Dados paramétricos, referem-se a média ± desvio padrão e não foram influenciados pelos tratamentos, ANOVA ($P>0,05$). ²Dados não paramétricos. *Houve diferença Kruskal Wallis ($P<0,05$).

Como não houve diferença entre os tratamentos utilizados, a dose de 450UI pode ser utilizada sem alteração no tamanho do folículo pré-ovulatório, na taxa de ovulação e no intervalo entre indução e a ovulação, tornando a dose de 1500UI superestimada para éguas. Por acelerar a maturação folicular e a ovulação, a aplicação de hCG em éguas com folículos ≥ 35 mm antecipa a ovulação, obtendo diâmetro folicular pré-ovulatório normalmente menor do que nas ovulações espontâneas.

Foi encontrado diâmetro médio do folículo pré-ovulatório de 38,2mm entre os tratamentos, semelhante aos valores encontrados em outros estudos, como: 36,9mm [14]; 37,6mm [15] e 38,9mm [16] para ovulações espontâneas. Gastal et al [3] encontraram diâmetros médios foliculares de 38,3mm e 39,1mm quando utilizaram 2500 e 1500UI/IV de hCG, respectivamente. Resultados diferentes dos citados anteriormente foram detectados

quando Gastal et al [3] acompanharam a ovulação espontânea (44,9mm) ou induzida com 500UI/IV de hCG (43,6mm) em éguas.

A taxa de ovulação média das éguas foi de 91,11% no presente estudo, semelhante à Blanchard et al [17], com 91% de ovulações em éguas tratadas com 2500UI de hCG, por via subcutânea. Davies Morel e Newcombe [5] induziram a ovulação de éguas com hCG e detectaram taxa de ovulação de 92,5% com 750UI e 92,4% com 1500UI de hCG. Utilizando dose maior de hCG (3000UI), Vanderwall et al [18] detectou 97% de ovulações em éguas tratadas.

Da taxa de ovulação obtida; 84,45% ocorreram até 48h, corroborando com Barbacini et al [19] e Samper et al [20] que obtiveram 90% e 83,3% de ovulações até 48h após indução com 2000UI e 2500UI de hCG, respectivamente. Superior aos trabalhos descritos, Urquieta et al [21] conseguiram 100% de taxa de ovulação de éguas tratadas com 2500UI de hCG no mesmo intervalo.

Os resultados obtidos nesse estudo para intervalo entre a indução e a ovulação (43,48h em média) estão de acordo com Romano et al [6], ao induzirem a ovulação em éguas com 750UI, 1500UI e 2500UI por via IV, encontraram 41h, 38h e 41h, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por Figueiredo et al [22], com intervalo de 45,6h entre indução com 1700UI de hCG e a ovulação.

Houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos para taxa de ovulação acima de 48h após a aplicação do indutor, com valores de 0%; 13,33% e 33,33%, para o T1; T2 e T3, respectivamente (Tab. 1), com superioridade do T3 em relação aos outros tratamentos. Com resultado menos eficiente, Gastal et al [23] induziram éguas com subdoses de 500UI por via IV de hCG e obtiveram 52% da taxa de ovulação acima de 48h. O resultado obtido no T2 corroborou com Samper et al [20], quando utilizou 2500UI de hCG para indução de ovulação em éguas e obteve 16,7% de ovulações acima de 48h após o tratamento.

O estudo deste parâmetro se faz necessário, por que é importante que as ovulações ocorram entre 24-48h após a indução, principalmente quando se utiliza sêmen resfriado na inseminação artificial, que deve ser usado de 12-24h antes da ovulação [24]. A depender do garanhão a ser utilizado, as coletas não são realizadas diariamente, por isso é necessário que o médico veterinário tenha uma previsão do momento da ovulação e realize a solicitação do

sêmen. O intervalo entre o pedido e a entrega do sêmen é geralmente de 24h (coleta e transporte), tornando essencial a informação do dia que pode solicitar para depois realizar a indução em sincronia com a ovulação [25].

As éguas que ovulam antes das 24 horas após administração de hCG são considerados animais que não responderam ao tratamento, e sim ao aumento endógeno de LH, sendo consideradas portanto, ovulações espontâneas [26].

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para diâmetro médio do CL nos momentos D0, D2, D4, D8 e concentração sérica de progesterona das éguas (Tab. 2).

Tabela 2. Desenvolvimento do corpo lúteo e concentração sérica de progesterona de éguas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana em acuponto *Hou Hai*

Parâmetros	T1	T2	T3	Valor de P
CL D0 (mm)	22,9±3,4	25,5±5,0	27,4±6,2	0,062
CL D2 (mm)	30,4±6,8	31,7±5,0	31,2±7,1	0,884
CL D4 (mm)	28,9±6,3	29,5±5,1	28,7±5,2	0,939
CL D8 (mm)	26,9±4,6	24,4±3,7	25,6±5,1	0,397
P ₄ D8 (ng/mL)	5,24±2,23	4,43±3,81	5,40±2,81	0,687

Corpo lúteo no dia da ovulação (CL D0); corpo lúteo 2 dias após ovulação (CL D2); corpo lúteo 4 dias após ovulação (CL D4); corpo lúteo 8 dias após ovulação (CL D8); concentração de progesterona 8 dias após ovulação (P₄ D8). T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. Não houve diferença entre os tratamentos, ANOVA ($P>0,05$). Os dados referem-se a média ± desvio padrão.

O diâmetro médio encontrado para os CLs avaliados foi de 27,75mm; sendo o maior diâmetro de CL encontrado no D2 e decrescendo até o D8, corroborando com Arruda et al [27] que obteve diâmetro médio do CL do D0 ao D8 de 29,01mm.

Os diâmetros médios encontrados nesse estudo foram menores do que os resultados encontrados por Urquieta et al [21], sendo CL D2= 31,1mm e 35mm; CL D4= 29,0mm e 37mm; CL D8= 25,6mm e 36mm; respectivamente. Diferente do encontrado, Urquieta et al [21] obtiveram o maior diâmetro do CL no D4, com posterior decréscimo até o D8. Porém, tamanhos menores de CL D2 foram observados, com média de 25,7mm [28].

Para verificar o efeito da eCG sobre a qualidade do CL, Rodrigues et al [29] utilizaram 250UI ou 500UI de eCG no D0 e no D2 após ovulação induzida ou espontânea e obtiveram diâmetro médio de CL variando de 19,06mm a 20,38mm, quatro dias após ovulação.

Existe relação entre tamanho do CL e a concentração sérica de P₄ para alguns autores [27] e para outros não [29; 30]. Desta forma, a utilização de área ou diâmetro de CL para prever funcionalidade deste, está cada vez menos sendo utilizada isoladamente. Entretanto,

quando se avalia tamanho do CL somado a ecogenicidade ou perfusão vascular, é possível ponderar quanto à funcionalidade do mesmo.

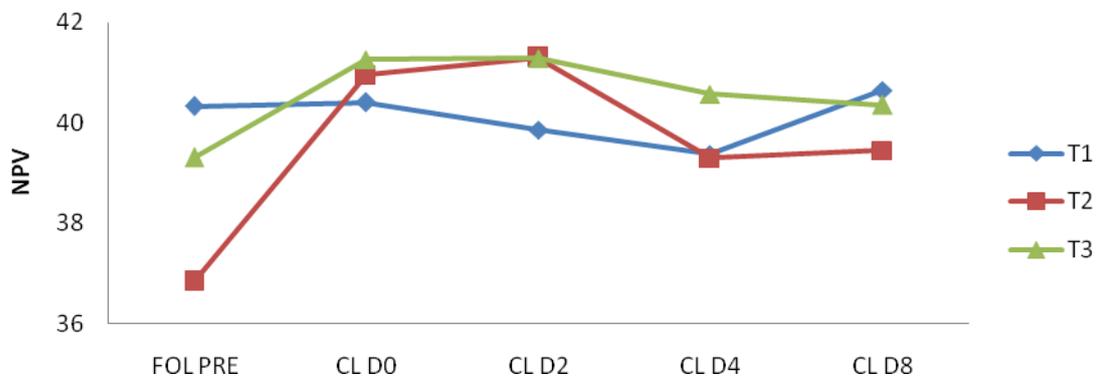
Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para os níveis de P_4 sérica no D8 (Tab. 2). Nesse estudo, foram detectados P_4 menores que 2ng/mL em apenas 3/45 éguas (T1=1/15; T2=2/15 e T3=0/15), significando que apenas 6,66% das éguas avaliadas possuíam CL não funcional.

De acordo com Grizendi e Fernandes [31] e Sieme et al [32], os níveis de P_4 maiores do que 2ng/mL são característicos de insuficiência luteal e devem ser suplementadas as éguas com P_4 exógena para manter a gestação. A média obtida de P_4 sérica em todos os tratamentos foi maior do que 4ng/mL, nível adequado para manter a gestação no terço inicial [32], similar ao resultado obtido por Arruda et al [27] de $4,21\pm 0,19$ ng/mL no D8 de éguas receptoras de embrião. Lopate e Therelfall [33] concluíram que no diestro as éguas possuem níveis normais de P_4 entre 4 e 12ng/mL.

Assim como no estudo realizado por Romano et al [6], a utilização de hCG como indutor de ovulação não influencia na concentração sérica de P_4 , independente da dose a ser utilizada.

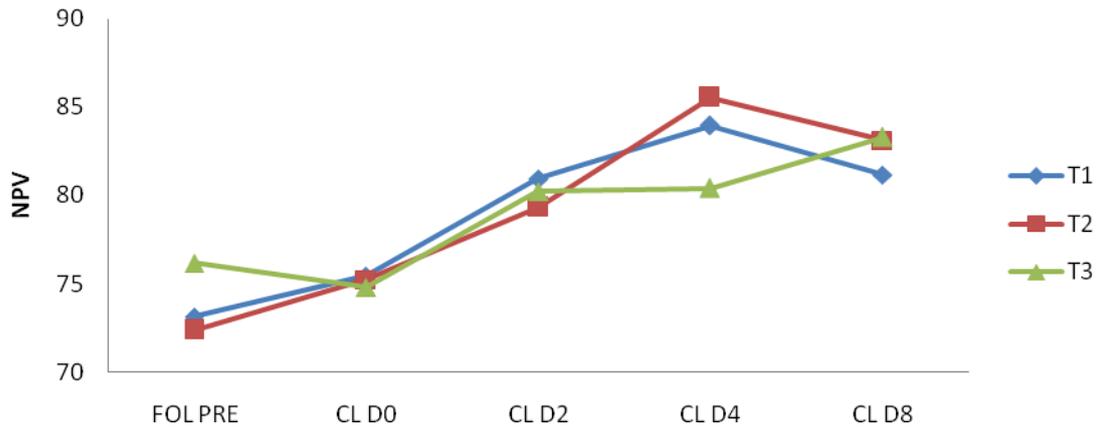
Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para os NPVs médios, máximo e heterogeneidade do NPV (Fig. 7; 8 e 9). Porém, houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos para o NPV mínimo do folículo pré-ovulatório das éguas (Fig. 6).

Figura 7. Valor numérico de pixel mínimo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas



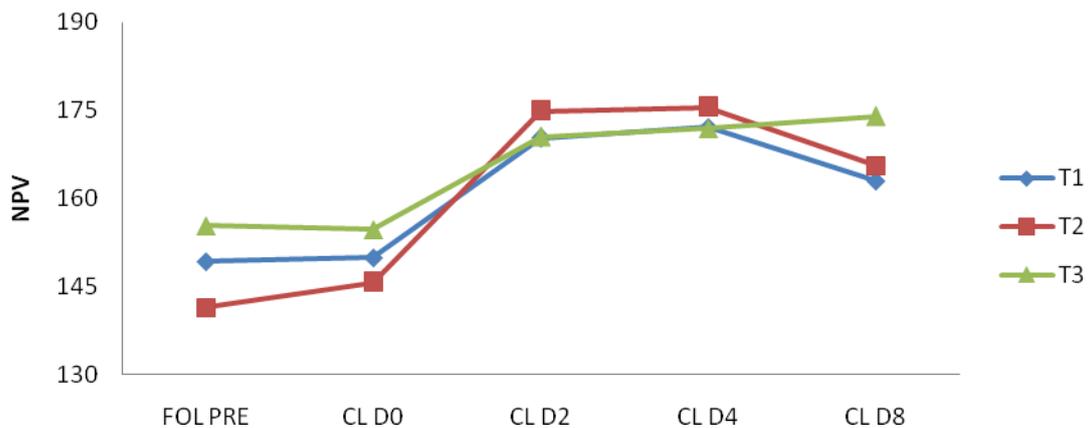
Folículo pré-ovulatório =FOL PRE; Corpo lúteo no dia da ovulação=CL D0; corpo lúteo 2 dias após ovulação=CL D2; corpo lúteo 4 dias após ovulação=CL D4; corpo lúteo 8 dias após ovulação=CL D8; T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. Houve diferença estatística em FOL PRE, Tukey ($P<0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos para CL D0; CL D2; CLD4 e CL D8, ANOVA ($P>0,05$).

Figura 8. Valor numérico de pixel médio do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas



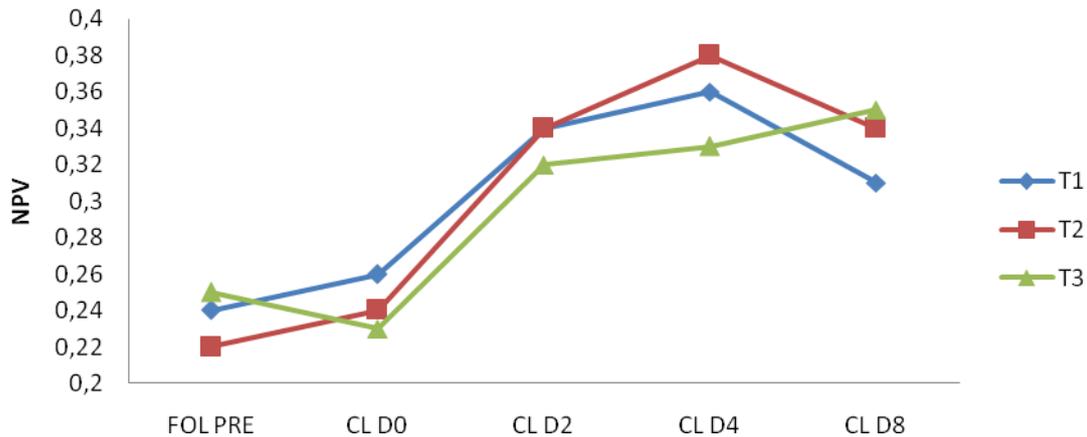
Folículo pré-ovulatório =FOL PRE; Corpo lúteo no dia da ovulação=CL D0; corpo lúteo 2 dias após ovulação=CL D2; corpo lúteo 4 dias após ovulação=CL D4; corpo lúteo 8 dias após ovulação=CL D8; T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. Não houve diferença entre os tratamentos, ANOVA ($P>0,05$).

Figura 9. Valor numérico de pixel máximo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas



Folículo pré-ovulatório =FOL PRE; Corpo lúteo no dia da ovulação=CL D0; corpo lúteo 2 dias após ovulação=CL D2; corpo lúteo 4 dias após ovulação=CL D4; corpo lúteo 8 dias após ovulação=CL D8; T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. Não houve diferença entre os tratamentos, ANOVA ($P>0,05$).

Figura 10. Heterogeneidade do valor numérico de pixel do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das éguas



Folículo pré-ovulatório =FOL PRE; Corpo lúteo no dia da ovulação=CL D0; corpo lúteo 2 dias após ovulação=CL D2; corpo lúteo 4 dias após ovulação=CL D4; corpo lúteo 8 dias após ovulação=CL D8; T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. Não houve diferença entre os tratamentos, ANOVA ($P>0,05$).

Os NPVs foram similares entre os tratamentos, apresentando um leve aumento do folículo pré-ovulatório para o CL no D0, com elevação progressiva até o CL no D8. Dessa forma, apesar da hCG influenciar na maturação folicular e ovulação, nesse estudo não promoveu aumento na perfusão vascular do CL, independente da via de administração ou dosagem utilizada. Resultados semelhantes foram obtidos por Romano et al [6], quando utilizaram diferentes doses e momentos de aplicação.

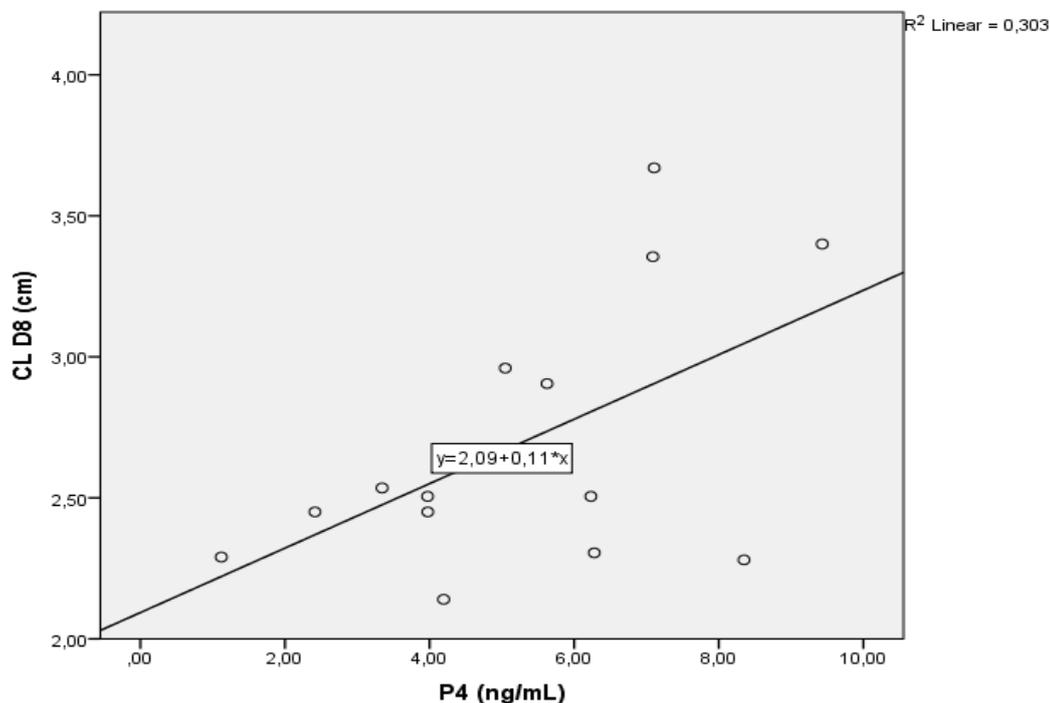
A permeabilidade vascular das estruturas ovarianas está relacionada com o desenvolvimento e maturação folicular e oocitária, bem como, com a qualidade do corpo lúteo, consequentemente a fertilidade da égua [6]. Segundo Smith et al [34], as éguas em atividade total e parcial possuem menor perfusão sanguínea no ovário, diminuindo sua fertilidade ou recuperação embrionária.

O empecilho da técnica de contagem de pixel coloridos na imagem, é que os equipamentos comerciais de ultrassom não possuem essa ferramenta, sendo necessário transferir a imagem desejada para um computador, onde podem ser contabilizados os pixels coloridos em programas específicos de análise de imagens, como o utilizado nesse estudo.

Houve correlação significativa ($P<0,05$) entre o diâmetro do CL no D8 e a concentração sérica de P_4 no D8 para o T1 (Fig. 10). Já para o T2, houve correlação significativa ($P<0,05$)

entre o NPV med no D8 e a concentração de P_4 no D8 (Fig. 11). Para o T3, não houve correlação ($P>0,05$) entre diâmetro do CL D8, NPV med no D8 e concentração de P_4 no D8.

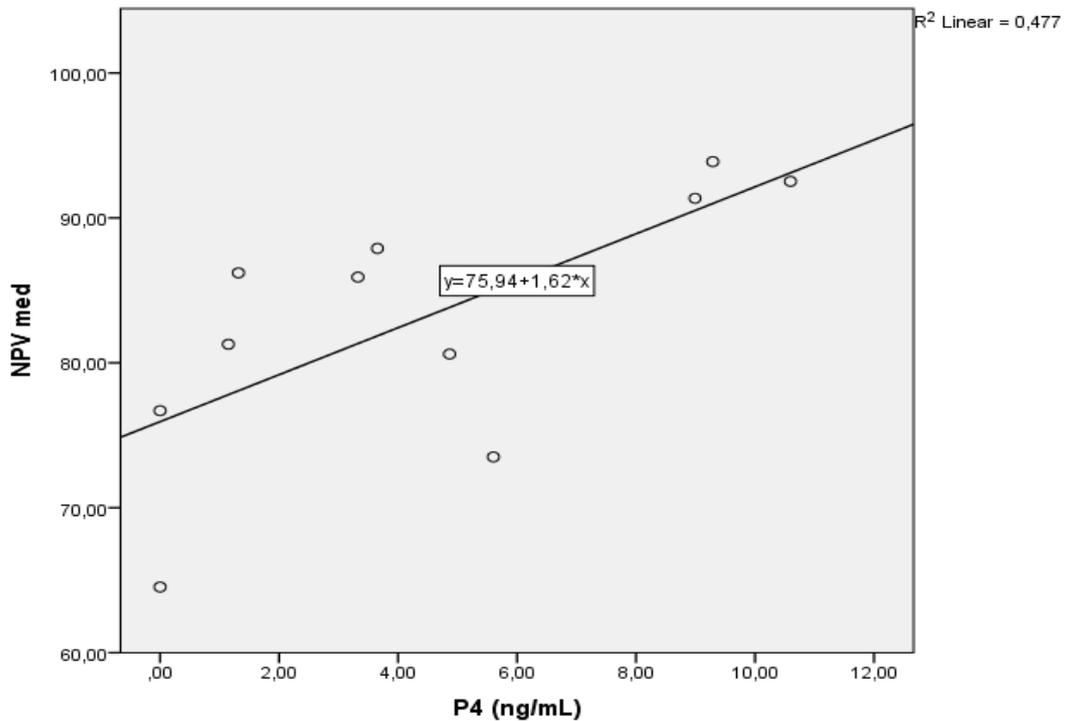
Figura 11. Correlação positiva moderada entre diâmetro do corpo lúteo no D8 e concentração sérica de progesterona oito dias após ovulação para éguas com ovulação induzida com 1500UI de gonadotrofina coriônica humana por via intravenosa



Este achado está contrário ao observado por Romano et al [6], que concluíram que o tamanho do CL não tem correlação com os níveis de P_4 , assim como Arruda et al [27], que observaram influência da morfoecogenicidade do CL na produção de P_4 , independente do tamanho do CL. Entretanto, Ginther et al [35] obtiveram correlação na redução do tamanho do CL com declínio das concentrações de P_4 durante a luteólise.

Assim como os outros autores acima descritos, Nagy et al [30] também não encontraram correlação entre o tamanho do CL e a concentração de P_4 , porém afirmaram que a variação das médias encontradas de P_4 pode ser influenciada por fatores individuais, como peso, idade, metabolismo e quantidade de receptores para o hormônio. A correlação encontrada no presente estudo pode ter sido causada por esses fatores individuais. Alguns autores detectaram padrão similar entre tamanho do CL e a concentração de P_4 sanguínea, porém não houve correlação significativa [21].

Figura 12 Correlação positiva moderada entre valor numérico de pixel médio e concentração sérica de progesterona oito dias após ovulação para égua com ovulação induzida com 450UI de gonadotrofina coriônica humana por via intravenosa



A neovascularização formada após a ovulação é essencial para carrear suprimentos para o desenvolvimento das novas células, além da síntese e secreção de P_4 [36,37]. Nesse estudo, assim como nos realizados por Bollwein et al [38]; Ginther et al [35] e Romano et al [6], houve correlação positiva entre o fluxo sanguíneo e concentração sérica de P_4 .

A correlação positiva entre o valor de pixel e a dosagem sérica de P_4 demonstra que a ultrassonografia Doppler pode ser utilizada para detectar um CL funcional com a contagem de pixel coloridos, associada à avaliação morfoecogênica do CL, já que não é possível realizar a quantificação imediata de concentração sérica de P_4 .

CONCLUSÃO

A utilização de subdose de hCG na dose de 450UI por via IV ou em acuponto *Hou Hai* foi eficiente em promover a indução de ovulação em éguas, mostrando que a dose padrão de hCG atualmente utilizada para esta espécie está superestimada.

REFERÊNCIAS

- [1] Ferris, R.A., Hatzel, J.N., Lindholm, A.R.G., Scofield, D.B., McCue, P.M. (2012) Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, **32**, 285–8.
- [2] Ley, W. (2006) Reprodução em éguas para veterinários de equinos. 1st edn, Rocca, São Paulo, 220p.
- [3] Gastal, E.L., Gastal, M.O., Ginther, O.J. (2006) Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*, **131**, 699–709. doi:10.1530/rep.1.01011.
- [4] Card, C.E., Manning, S.T., Bowman, P., Leibel, T. (1997) Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *Canadian Veterinary Journal*, **38**, 171–174.
- [5] Davies Morel, M.C.G., Newcombe, J.R. (2008) The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Animal Reproduction Science*, **109**, 189–199.
- [6] Romano, R.M., Ferreira, J.C., De Siqueira Canesin, H., Boakari, Y.L., Ignácio, F.S., Novaes Filho, L.F. et al. (2015) Characterization of Luteal Blood Flow and Secretion of Progesterone in Mares Treated With Human Chorionic Gonadotropin for Ovulation Induction or During Early Diestrus. *Journal of Equine Veterinary Science*, **35**, 591–597.
- [7] Zhou, W., Fu, L.W., Tjen-A-Looi, S.C., Li, P., Longhurst, J.C. (2005) Afferent mechanisms underlying stimulation modality-related modulation of acupuncture-related cardiovascular responses. *Journal of Applied Physiology*, **98**, 872–880.
- [8] Luna, S.P.L., Angeli, A.L., Ferreira, C.L., Lettry, V., Scognamillo-Szabó, M. (2008) Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **5**, 267–272.
- [9] Wang, X.L., Zhang, T.F., Zhang, H.X., Mao, H.R., Huang, G.F. (2007) Acupuntura para tratar distúrbios reprodutivos. In: Schoen, A.M. *Acupuntura veterinária: da arte antiga a moderna*, São Paulo: Rocca, cap. 21, p. 258-264.
- [10] Lin, J.H., Chan, W.W., Wu, L.S. (2006) Therapeutic effects of acupoint injection at cervical Jiaji points and effects on ET and CGRP in the patient of ischemic stroke. *Zhongguo Zhen Jiu = Chinese Acupuncture & Moxibustion*, **27**, 93–95
- [11] Somar Meteorologia. Tempo Agora. Disponível Em: <<http://www.tempoagora.com.br/previsaodotempo.html/brasil/EntreRios-BA/>> 2012.
- [12] Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L., Yeates B. (1983) Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, **15**, 371–372.
- [13] Samper, J.C. (1997) Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*. **43**, 189–191.
- [14] Davies Morel, M.C.G., Newcombe, J.R., Hayward, K. (2010) Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: The effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology*, **74**, 1241–1247.

- [15] Carnevale, E.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J. (1993) Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Animal Reproduction Science*, **31**, 287–99.
- [16] Ginther, O.J., Gastal, M.O., Gastal, E.L., Jacob, J.C., Beg, M.A. (2009) Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. *Theriogenology*, **71**, 780–788.
- [17] Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Rigby, S.L. (2002) Effects of deslorelin or hCG administration on reproductive performance in first postpartum estrus mares. *Theriogenology*, **58**, 165–169.
- [18] Vanderwall, D.K., Juergens, T.D., Woods, G.L. (2001) Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with HCG or ovuplantTM (Deslorelin). *Journal of Equine Veterinary Science*, **21**, 539–542.
- [19] Barbacini, S., Zavaglia, G., Gulden, P. (2000) Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinary Journal*, **12**, 312–317.
- [20] 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*, **22**, 320–323.
- [21] Urquieta, B., Durán, M.C., Coloma, I., Parraguez, V.H. (2009) HCG-induced ovulation in thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals*, **44**, 859–864.
- [22] Figueiredo, T., Paiva, R., Kozicki, L.E., Kaercher, F., Weiss, R.R., Dos Santos, I.W. et al. (2011) Induction of ovulation in quarter horse mares through the use of deslorelin acetate and human chorionic gonadotrophin (hCG). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **54**, 517–521.
- [23] Gastal, E.L. (2009) Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. *Animal Reproduction*, **6**, 144–158.
- [24] Samper, J.C. (2008) Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, **70**, 445–447.
- [25] Brinsko, S.P. (2006) Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology*, **66**, 543–50.
- [26] McCue, P.M., Hudson, J.J. (2004) Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Denver, Colorado, **50**, 15–18.
- [27] Arruda, R.P., Visintin, J.A., Fleury, J.J., Garcia, A.R., Madureira, E.H., Celeghini, E.C.C. et al. (2001) Existem relações entre tamanho e morfoecogenecidade do corpo lúteo detectados pela ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **38**, 233–239.
- [28] Cuervo-Arango, J., Newcombe, J.R. (2013) Ultrasound Confirmation of Ovulation in Mares: A Normal Corpus Luteum or a Haemorrhagic Anovulatory Follicle? *Reproduction in Domestic Animals*, **48**, 105–111.
- [29] Rodrigues, T.G., Silva, F.S., Fagundes, B., Estadual, U., Fluminense, N., Igua, U.N. (2014) Uso da ecg para formação do corpo lúteo equino e produção de progesterona. *Acta Biomedica Brasiliensia*, **5**, 56–70.

- [30] Nagy, P., Huszenicza, G., Reiczigel, J., Juhász, J., Kulcsár, M., Abaváry, K. et al. (2004) Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology*, **61**, 203–214.
- [31] Grizendi, B.M., Fernandes, C.B. (2015) Éguas em idade avançada : perda embrionária relacionada à deficiência de progesterona e à doença endometrial. *Rev Acad Ciênc Anim*, **13**, 23–29.
- [32] Sieme, H., Oldenho, F.H., Wolkers, W.F. (2016) Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, **169**, 2–5.
- [33] Lopate, C., Threlfall, W.R. (1991) Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the horse mare. *Theriogenology*, **35**, 83–90.
- [34] Smith, R.L., Vernon, K.L., Kelley, D.E., Gibbons, J.R., Mortensen, C.J. (2012) Impact of moderate exercise on ovarian blood flow and early embryonic outcomes in mares. *Journal of Animal Science*, **90**, 3770–3777.
- [35] Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O. (2007) Spatial Relationships between Serrated Granulosa and Vascularity of the Preovulatory Follicle and Developing Corpus Luteum. *Journal of Equine Veterinary Science*, **27**, 20–27.
- [36] Al-zi'abi, M.O., Watson, E.D., Fraser, H.M. (2003) Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*, **125**, 259–270.
- [37] 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*, **30**, 247–259.
- [38] Bollwein, H., Mayer, R., Weber, F., Stolla, R. (2002) Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, **65**, 2043–51.

CAPÍTULO 2. EFEITO DA SUBDOSE DE HCG NO ACUPONTO HOU HAI NA DINÂMICA FOLICULAR E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM JUMENTAS

[Effect of hCG subdose on hou hai acupunct in follicular dynamics and luteal development in donkeys]

Manuscrito a ser submetido ao Periódico Equine Veterinary Journal, Qualis A1 na Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

M. O. RIBEIRO¹, R. F. BITTENCOURT², L. P. BARBOSA*¹

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

²Universidade Federal da Bahia - UFBA

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

RESUMO

O objetivo com o estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica humana (hCG) no acuponto *Hou Hai*, como indutor de ovulação em jumentas. Foram utilizadas 11 jumentas da raça Pêga distribuídas em Blocos Casualizados em três tratamentos (T), sendo: T1= aplicação de 1500UI de hCG por via intravenosa (IV) na jugular; T2= 450UI de hCG em falso acuponto (IV na jugular) e T3: 450UI de hCG aplicada no acuponto *Hou Hai*. As jumentas foram monitoradas por ultrassonografia modo-B, até que o folículo pré-ovulatório estivesse com diâmetro ≥ 30 mm e edema uterino grau 3, quando se procedeu a indução da ovulação com hCG e avaliação com Doppler colorido. Após aplicação do indutor de ovulação, os exames modo-B foram realizados duas vezes ao dia para detectar o momento da ovulação (D0). O diâmetro médio do CL e sua vascularização foram acompanhados modo-B e Doppler no D0, D2, D4 e D8 após ovulação, com coleta de sangue no D8 para determinação da concentração sérica de progesterona (P_4). Os dados foram submetidos à análise de normalidade, seguido dos testes estatísticos adequados para cada variável. Não houve diferença ($P > 0,05$) para diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios ($34,5 \pm 1,3$ mm); taxa de ovulação (96,97%); intervalo entre indução e ovulação ($58,07 \pm 16,82$ h); diâmetro médio de CL ($D0 = 23,0 \pm 0,6$; $D2 = 27,7 \pm 1,9$ e $D8 = 28,2 \pm 0,8$ mm); concentrações séricas de P_4 ($10,50 \pm 2,99$ ng/mL). Houve diferença ($P < 0,05$) para taxa de ovulação acima de 48h após indução, com taxas de 18,18 (T1); 36,36 (T2) e 72,73% (T3), com superioridade do T3 em relação aos outros tratamentos; diâmetro do CL no D4, com superioridade de T3 em relação ao T1 ($T1 = 25,8 \pm 4,4$; $T2 = 27,0 \pm 4,5$ e $T3 = 30,7 \pm 5,1$ mm) e valor numérico de pixel mínimo do CL no D8 ($T1 = 41,91 \pm 1,17$; $T2 = 37,63 \pm 6,27$ e $T3 = 37,89 \pm 4,28$). A utilização de subdose de hCG por via IV ou em acuponto *Hou Hai* foi eficiente em promover a indução de ovulação em jumentas, mostrando que a dose padrão de hCG atualmente utilizada para esta espécie é superestimada.

Palavras chave: Acupuntura; asinino; Doppler; progesterona; raça Pêga; reprodução

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effects of human chorionic gonadotrophin (hCG) subdivision in the *Hou Hai* acupoint, as an inducer of ovulation in donkeys. A total of 11 Pêga herds distributed in randomized blocks were used in three treatments (T): T1= application of 1500IU of hCG intravenously (IV) in the jugular; T2=450IU of hCG in false acupuncture (IV in jugular) and T3= 450IU of hCG applied in acupoint *Hou Hai*. The donkeys were monitored by B-mode ultrasonography until the preovulatory follicle was ≥ 30 mm in diameter and grade 3 uterine edema was observed when ovulation induction was performed with hCG and color Doppler evaluation. After application of the ovulation inducer, the B-mode exams were performed twice a day to detect the moment of ovulation (D0). The mean diameter of CL and its vascularization were monitored in B-mode and Doppler in D0, D2, D4 and D8 after ovulation, with blood collection in D8 to determine serum progesterone concentration (P_4). Data were submitted to normality analysis, followed by appropriate statistical tests for each variable. There was no difference ($P>0.05$) for mean preovulatory follicle diameter (34.5 ± 1.3 mm); ovulation rate (96.97%); interval between induction and ovulation (58.07 ± 16.82 h); mean diameter of CL ($D0=23.0\pm 0.6$, $D2=27.7\pm 1.9$ and $D8=28.2\pm 0.8$ mm); serum concentrations of P_4 (10.50 ± 2.99 ng/mL). There was a difference ($P<0.05$) for ovulation rate above 48h after induction, with rates of 18.18 (T1); 36.36 (T2) and 72.73% (T3), with T3 superiority in relation to the other treatments; ($T1=25.8\pm 4.4$, $T2=27.0\pm 4.5$ and $T3=30.7\pm 5.1$ mm) and numerical value of the pixel minimum of CL at D8 ($T1=41.91\pm 1.17$, $T2=37.63\pm 6.27$ and $T3=37.89\pm 4.28$). The use of hCG subdose IV or *Hou Hai* acupuncture was efficient in promoting the induction of ovulation in donkeys, showing that the standard dose of hCG currently used for this species is overestimated.

Keywords: Acupuncture; asinine; Doppler; Pêga breed; progesterone; reproduction

INTRODUÇÃO

A utilização de asininos no trabalho agropecuário sempre foi importante, por serem rústicos e adaptados a regiões semiáridas. Porém, poucas pesquisas foram realizadas para entender a fisiologia reprodutiva desses animais, que foram equivocadamente comparados com equinos [1,2].

Os aspectos fisiológicos do ciclo reprodutivo das jumentas têm recebido uma atenção especial pelos pesquisadores, principalmente após o desenvolvimento de programas de conservação de raças e populações com risco de extinção [3,4].

O acompanhamento do desenvolvimento folicular, ovulação e gestação auxiliam a manipulação artificial de controle exógeno das atividades ovarianas, porém a falta de informações na esfera reprodutiva da espécie asinina dificulta o uso de novas biotecnologias [5]. Para tal, o uso da ultrassonografia auxilia as observações, tornando mais preciso os tamanhos e características das estruturas ovarianas e uterinas, porém, as jumentas são geralmente tratadas como “éguas pequenas”, devido à escassez de informações para a espécie [6].

Com as informações ovarianas e uterinas obtidas pela ultrassonografia, a hormonioterapia pode ser usada de forma mais eficiente e proporcionar melhores resultados [7]. Assim como na espécie equina, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) é bastante utilizada em jumentas como indutor de ovulação. Comumente aplicada por via intravenosa (IV), intramuscular (IM) ou subcutânea (SC) [8–10], a dose a ser utilizada na espécie asinina é a mesma indicada pelo fabricante para as éguas.

Uma via alternativa para aplicação de hCG é a farmocopuntura (uso de medicamentos ou hormônios em pontos específicos da acupuntura), podendo ser utilizadas doses reduzidas e ter resultados similares as doses convencionais [11–13]. Além dos mesmos resultados obtidos, a subdose de hCG reduz custos e pode ser utilizada aplicações sucessivas durante a estação reprodutiva [14,9].

Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de subdose de hCG administrada no acuponto *Hou Hai* como indutor de ovulação em jumentas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na cidade de Entre Rios – Bahia, na Fazenda Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia-UFBA, durante o período de setembro de 2016 a fevereiro de 2017. O município está localizado, em latitude 11°56'31" Sul, longitude 38°05'04" Oeste e altitude de 152 metros ao nível do mar. O clima é tropical com estação seca no verão (classificação climática de Köppen-Geiger), o período chuvoso ocorre entre os meses de abril a julho, com pluviosidade anual média de 1550mm e temperatura média de 24°C, chegando a mínima de 16,8°C e máxima de 32,5°C [15].

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, sob registro nº 67/2016.

Foram utilizadas 11 jumentas da raça Pêga em atividade reprodutiva, consideradas híginas após exame físico (frequência cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, coloração das mucosas e hidratação) e obstétrico (conformação de vulva, avaliação ultrassonográfica do útero e ovário).

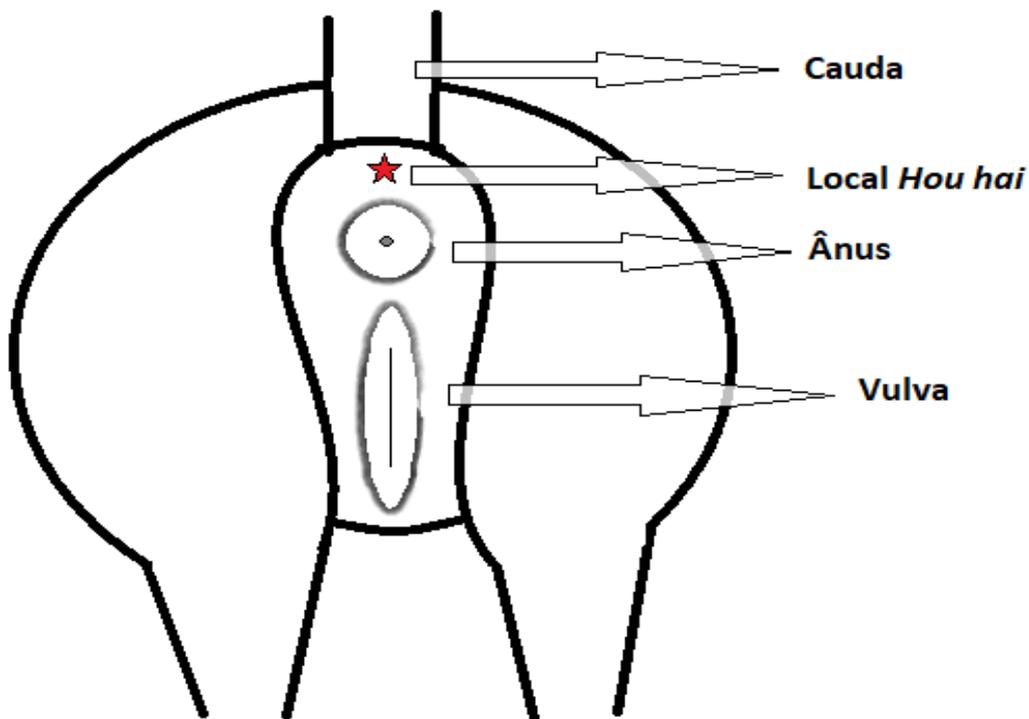
Os animais apresentaram escore de condição corporal entre 4 (moderadamente magra) e 6 (moderadamente carnuda) de acordo com Henneke et al. [16]. As fêmeas foram

submetidas a sistema semi-intensivo de produção, em pasto de capim pangola (*Digitaria decumbens*) e brachiaria (*Brachiaria decumbens*), com suplementação à base de milho moído (57,7%), farelo de soja (40,8%) e sal mineral (1,5%), ofertado 500g/animal duas vezes ao dia, com água *ad libitum*.

As jumentas foram distribuídas em Delineamento em Blocos Casualizados (n=33), em três tratamentos e onze repetições por tratamento, sendo 1 animal por unidade experimental, e o período utilizado como fator de blocagem. Os tratamentos (T) foram: T1 (n=11): 1500UI de hCG (Chorulon[®], MSD, Brasil) por via intravenosa (IV) na jugular; T2 (n=11) (falso acuponto): 450UI de hCG/IV na jugular e T3 (n=11): 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai* (Fig. 1).

Foi realizada antissepsia prévia às aplicações de hCG por IV na jugular e no acuponto *Hou Hai* com álcool 70% assim como nas coletas de sangue para dosar concentração sérica de P₄.

Figura 1. Local de inserção da agulha no acuponto *Hou Hai*

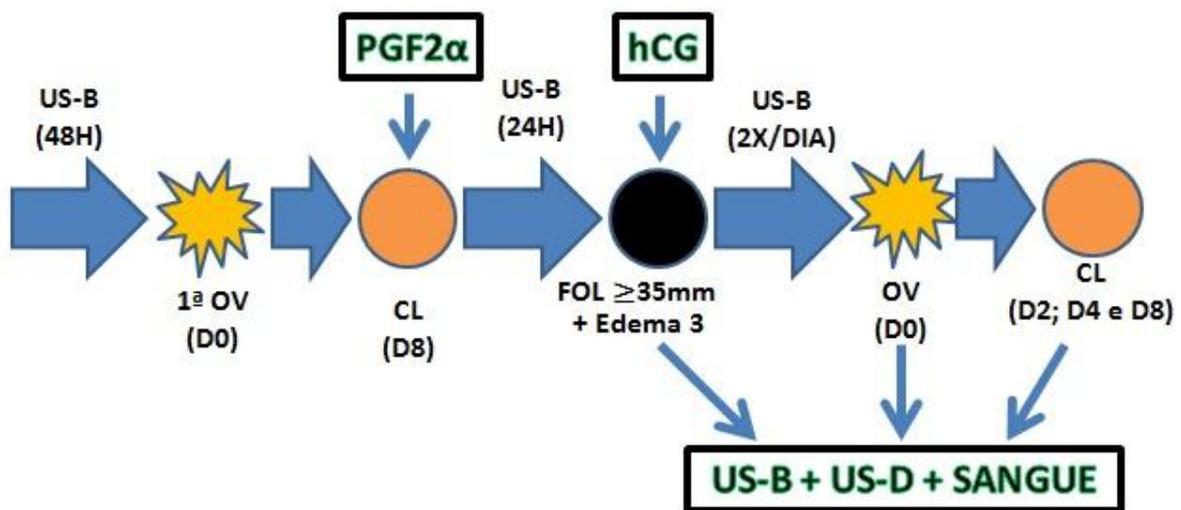


Note a estrela vermelha identificando o local de inserção da agulha no acuponto *Hou Hai*.

Para as aplicações no acuponto *Hou Hai* (entre a base ventral da cauda e o ânus), foi utilizada uma seringa de 1mL, acoplada a um cateter 16G e inserida a 45°, com a profundidade de 45mm (tamanho do cateter).

Os parâmetros avaliados foram: diâmetro médio (média entre a maior medida horizontal e a maior medida vertical) e vascularização (valores numéricos de pixels mínimo, máximo, médio e heterogeneidade) do folículo pré-ovulatório e do CL nos momentos D0, D2, D4 e D8; taxa de ovulação; intervalo entre indução e ovulação; taxa de ovulação acima de 48 horas após indução e concentração sérica de P_4 no D8.

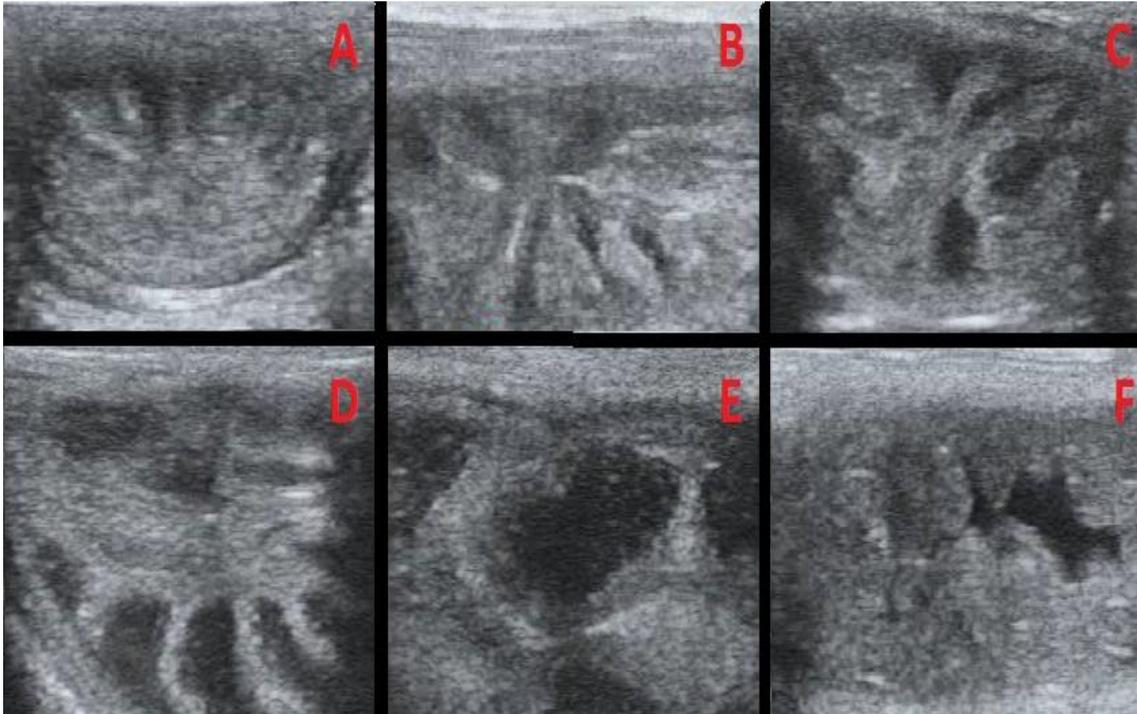
Figura 13. Metodologia experimental



Todas as fêmeas foram monitoradas a cada 48 horas por meio de exame ultrassonográfico, tendo a primeira ovulação da estação reprodutiva descartada, para evitar a fase de transição e confirmar o restabelecimento da atividade reprodutiva na estação de monta. Oito dias após a primeira ovulação, todas as jumentas receberam 5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse[®], Pfizer, Estados Unidos da América) por via IM, como agente luteolítico.

Após aplicação da $PGF_{2\alpha}$, as fêmeas foram monitoradas pelo modo-B diariamente. Quando o folículo dominante alcançou um diâmetro $\geq 30\text{mm}$ e presença de edema uterino grau 3 [17] (Fig. 3); foi realizado exame ultrassonográfico do folículo pré-ovulatório no modo Doppler colorido para avaliar a vascularização perifolicular (Fig. 4) e a ovulação foi induzida com hCG, segundo dose e via de cada tratamento específico.

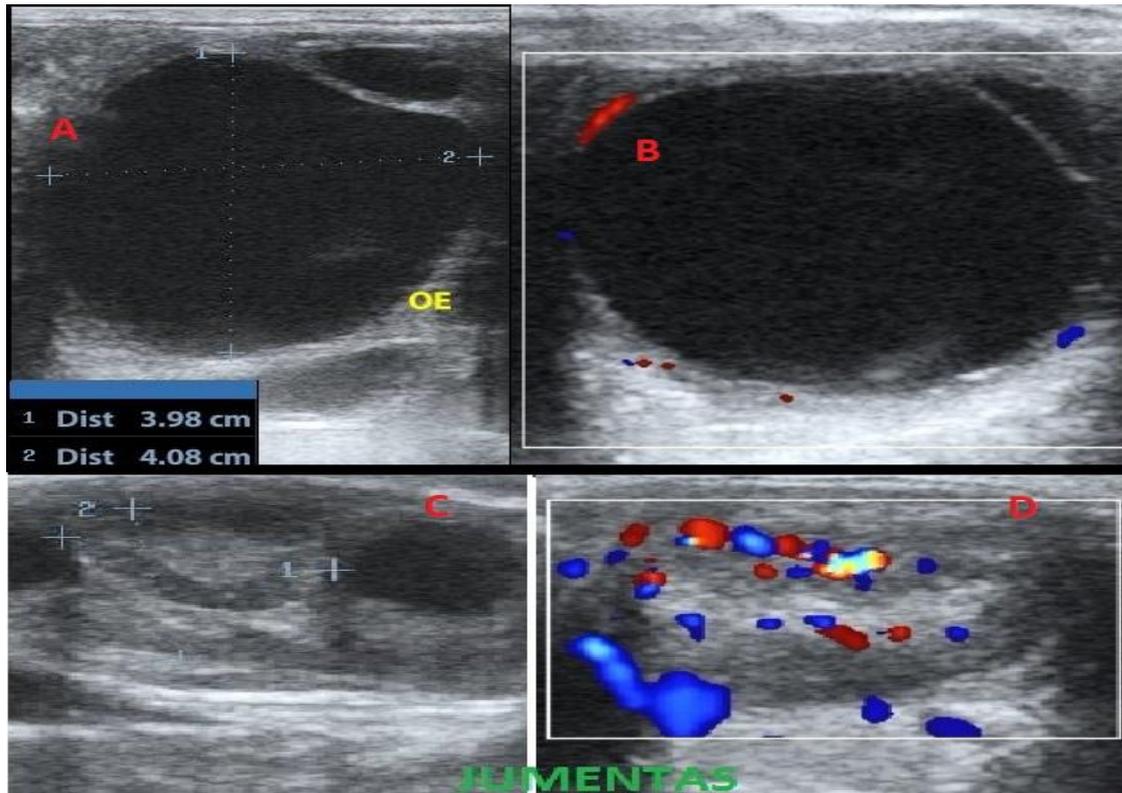
Figura 14. Imagens ultrassonográficas de avaliação do grau de edema uterino de jumentas pelo modo-B



Note em: A = edema uterino grau 1; B = edema uterino grau 2; C = edema uterino grau 3; D = edema uterino grau 4; E = edema uterino grau 5; F = líquido intrauterino.

Após a aplicação do indutor de ovulação, as avaliações modo-B foram realizadas duas vezes ao dia (manhã e tarde) para determinar o momento aproximado da ovulação, com o desaparecimento da imagem do folículo (anecogênica) e substituído pela imagem do CL (hipoecogênico) (Fig. 4).

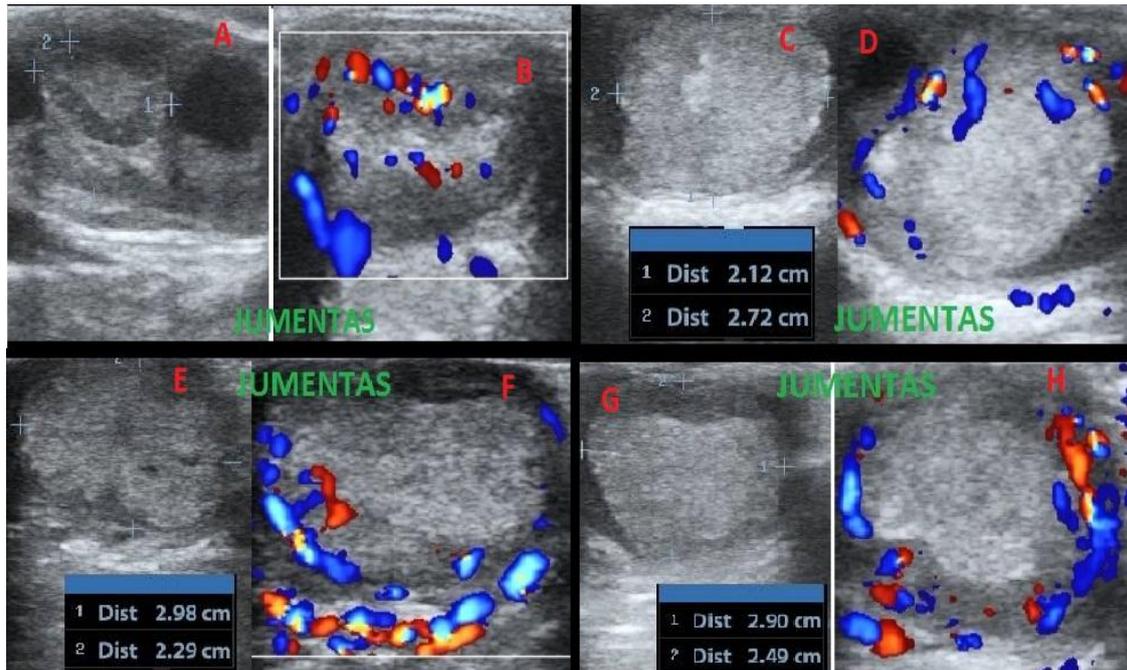
Figura 4. Imagens ultrassonográficas modo-B e Doppler colorido do folículo no momento da indução e do CL após ovulação de jumentas



Note em A e B= folículo pré-ovulatório (anecogênico); C e D= CL no dia da ovulação (hipoecogênico).

Para acompanhar o desenvolvimento do CL, foram realizadas medidas do diâmetro médio no modo-B e vascularização no Doppler nos dias 0 (dia da ovulação, D0); 2 (D2); 4 (D4) e 8 (D8) após a ovulação (Fig. 5).

Figura 515. Imagens ultrassonográficas em modo B e Doppler colorido do CL em desenvolvimento de jumentas

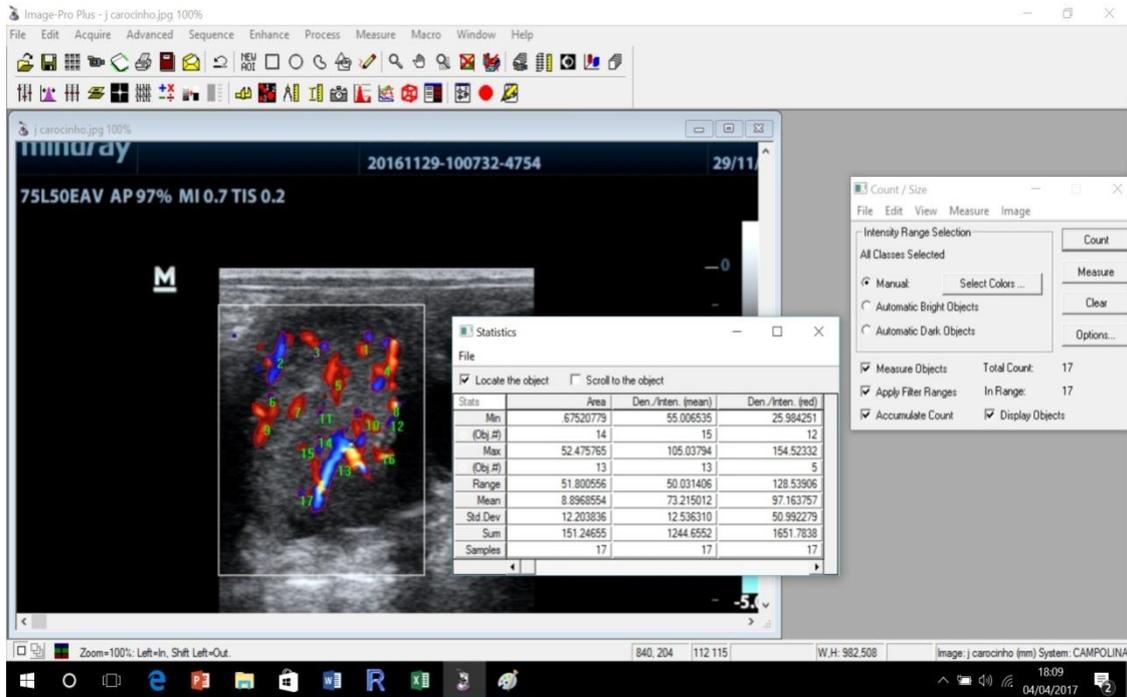


Note em A e B= dia da ovulação; C e D= dois dias após ovulação; E e F= quatro dias após ovulação; G e H= oito dias após ovulação.

Foi utilizado o ultrassom modelo Mindray Z5[®] acoplado a um transdutor transretal linear com a frequência de 5,0MHz. Foram realizadas imagens modo-B e Doppler colorido contendo as estruturas avaliadas, salvas como imagens digitais (.jpeg) e transferidas para um computador.

As imagens obtidas pelo Doppler colorido de vascularização do folículo pré-ovulatório e CL (D0, D2, D4 e D8) foram analisadas com o software Image ProPlus[®] (Media Cybernetics Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos) no Laboratório de Ultrassonografia do Setor de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. No software, foi utilizada uma ferramenta para contornar as áreas de vascularização do folículo pré-ovulatório e do CL para obter os valores médios numéricos de pixel (NPVs; dados ecotexturais), heterogeneidade de pixel (desvio padrão de NPVs), bem como os valores de pixel mínimo e máximo (Fig. 6).

Figura 6. Corpo lúteo de jumentas no Image ProPlus®



Para determinação das concentrações séricas de P_4 , amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular em tubos para coleta a vácuo sem anticoagulante, oito dias após a ovulação. Após as coletas, o sangue foi centrifugado (300G/15minutos) para obtenção do soro, o qual foi transferido para microtubos de polipropileno com capacidade para 2mL de volume. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise, que foi realizada utilizando o método de quimioluminescência, no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com o kit comercial (Access Progesterone[®], Beckman Coulte, California, Estados Unidos), seguindo às orientações recomendadas pelo fabricante.

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SPSS 13.0 (2003), avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido de Análise de Variância e Teste de Tukey a 5% de probabilidade para os dados paramétricos (diâmetro médio e vascularização do folículo no momento da indução, intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação, diâmetro médio e vascularização do CL nos momentos D0, D2, D4 e D8). Para os dados não paramétricos (taxa de ovulação e taxa de ovulação após 48 horas da aplicação do indutor), foi utilizado o teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade. Para as correlações entre

diâmetro médio do CL no D8, fluxo sanguíneo do CL no D8 e progesterona sérica no D8, foi utilizada a correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No momento da aplicação no acuponto *Hou Hai*, as jumentas demonstraram desconforto, necessitando de mais estudos para ajustar o tamanho do cateter a ser utilizado e o volume da solução a ser injetada para estimular o acuponto.

Não houve diferença ($P>0,05$) para os parâmetros de diâmetro médio do folículo pré-ovulatório, taxa de ovulação e intervalo entre indução e ovulação em jumentas com ovulação induzida por subdose de hCG por via IV ou no acuponto *Hou Hai* (Tab. 1).

Tabela 1. Folículo pré-ovulatório, taxa e momento de ovulação de jumentas com ovulação induzida por subdose de hCG no acuponto *Hou Hai*

Parâmetros	T1	T2	T3	Valor de P
Fol Pré (mm) ¹	34,6±4,6	35,9±3,0	33,2±4,1	0,318
Tx Ov (%) ²	100,00	90,91	100,00	0,368
IEIO (h) ¹	50,0±39,9	46,8±21,5	77,4±28,0	0,058
Ov>48h (%) ^{2*}	18,18	36,36	72,73	0,034

Fol Pré = Diâmetro médio do folículo pré-ovulatório; Tx Ov = taxa de ovulação; IEIO = intervalo entre indução e ovulação; Ov>48h = Ovulação acima de 48 horas após indução. T1 = 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3 = 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. ¹Dados paramétricos, referem-se a média ± desvio padrão e não foram influenciados pelos tratamentos, ANOVA ($P>0,05$). ²Dados não paramétricos. *Houve diferença, Kruskal Wallis ($P<0,05$).

Ao utilizar 450UI de hCG foi obtido diâmetro folicular pré-ovulatório médio de ovulação dentro do previsto para a espécie (34,5mm), validando a dose estudada. Acompanhando a dinâmica folicular de jumentas, o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório varia de 34 a 42mm sem utilização de indutores de ovulação, ou seja, em ovulação espontânea [6,18–20]. Porém, Carluccio et al. [21] encontraram diâmetro de folículo pré-ovulatório de até 45,1mm em ciclos estrais após o parto para esta espécie, sem utilizar indutor de ovulação. Já, com a utilização de hCG como indutor de ovulação em jumentas, Carluccio et al. [18] detectaram diâmetro médio folicular de 34mm, quando induzidos entre 30 a 35mm com 2500UI de hCG.

A utilização de hCG como indutor de ovulação possui um alto índice de taxa de ovulação, como demonstrado no presente trabalho (96,97%) ou em estudos anteriores com doses maiores de 2500UI (95,85%) [18].

O T2 nesse estudo apresentou resultado dentro do período desejável, que é de 36 a 48h, para intervalo entre a indução com hCG e a ovulação (46h), sugerindo que as doses rotineiramente utilizadas estão superestimadas. Para os T1 e T3, o intervalo entre indução e a

ovulação foi superior a 48h, diferente do esperado ao induzir a ovulação com hCG. Ao induzir a ovulação de jumentas com 2500 UI de hCG, Carluccio *et al.* [18] obtiveram 42h de intervalo entre a indução e a ovulação.

Houve diferença ($P < 0,05$) para a taxa de ovulação após 48h da aplicação do indutor entre os tratamentos, com superioridade para a aplicação no acuponto (T3). Esses tratamentos foram eficazes em induzir a ovulação, porém devem ser utilizados quando for empregar a monta natural ou inseminação artificial com sêmen fresco, devido à viabilidade espermática ser maior no trato reprodutivo das jumentas. A alternativa para utilizar sêmen resfriado seria realizar o tratamento com hCG de 12-24h após a detecção do folículo ≥ 30 mm.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para diâmetro médio de CL nos momentos D0, D2 e D8 das jumentas, mas houve diferença ($P = 0,05$) para o diâmetro do CL no D4 (Tab. 2).

Tabela 2. Desenvolvimento do corpo lúteo de jumentas com ovulação induzida por subdose de gonadotrofina coriônica humana em acuponto *Hou Hai*

Parâmetros	T1	T2	T3	Valor de P
CL D0 (cm)	22,4±7,3	23,3±4,9	23,4±4,8	0,906
CL D2 (cm)	25,9±5,2	27,6±3,7	29,6±5,4	0,209
CL D4 (cm)*	25,8±4,4 ^a	27,0±4,5 ^{ab}	30,7±5,1 ^b	0,050
CL D8 (cm)	27,3±2,4	28,8±4,7	28,5±3,1	0,543
P ₄ D8 (ng/mL)	7,65±7,11	10,22±9,45	13,63±11,12	0,316

Corpo lúteo no dia da ovulação (CL D0); corpo lúteo 2 dias após ovulação (CL D2); corpo lúteo 4 dias após ovulação (CL D4); corpo lúteo 8 dias após ovulação (CL D8); concentração de progesterona 8 dias após ovulação (P₄ D8). T1= 1500UI de hCG IV; T2 = 450UI de hCG IV; T3= 450UI de hCG no acuponto *Hou Hai*. *Os dados referem-se a média e desvio padrão seguidos por letras diferentes (a,b) sobrescritas, na mesma linha diferem ($P = 0,05$) para ANOVA e ($P = 0,046$) para o teste de Tukey.

O diâmetro máximo de CL encontrado em jumentas foi de 30,7±5,1mm no D4, diferente ao estudo realizado por Conceição *et al.* [19], que detectaram o diâmetro máximo do CL de jumentas no D5 com 26,2±4,4mm quando acompanharam o desenvolvimento luteal. Avaliando todo o ciclo estral, Derar e Hussein [22] detectaram o diâmetro máximo de CL no D13 (26.77 ± 1.28 mm), regredindo até o D17.

A diferença encontrada no CL D4, com superioridade para a aplicação no acuponto, pode ter sido ocasionada pelo maior intervalo entre indução e a ovulação, com folículos maiores e formação de CL, conseqüentemente, maiores.

Apenas com o diâmetro do CL não é possível considerar a funcionalidade do mesmo, é necessário verificar a sua vascularização e a concentração sérica de P₄, assim como afirmar,

se o CL é responsivo ou não a $\text{PGF}_2\alpha$ [23]. Porém, associado às características de ecogenicidade e perfusão sanguínea do CL, é aceitável predizer se é funcional ou não.

A concentração de P_4 sérica no D8 não foi influenciada ($P>0,05$) pelos tratamentos (Tab.2). Nesse estudo, foram detectados P_4 menores do que 2ng/mL em apenas 5/33 jumentas (T1=2/11; T2=2/11 e T3=1/11), significando que apenas 15,15% das jumentas avaliadas possuíam CL não funcional.

De acordo com Grizendi e Fernandes [24] e Sieme et al. [25], os níveis de P_4 menores do que 2ng/mL são característicos de insuficiência luteal para éguas e jumentas, que devem ser suplementadas com P_4 exógena para manter a gestação. Apenas em uma jumenta foi detectado níveis de P_4 abaixo de 1ng/mL, característica da fase estrogênica [19].

De acordo com os relatos, as concentrações séricas de P_4 de jumentas são maiores do que de éguas [26–28], semelhante aos resultados encontrados e justificando a duração do ciclo estral maior para a espécie asinina.

Carluccio et al. [23] avaliaram 22 jumentas e obtiveram uma média de 9,1ng/mL de P_4 sérica, semelhante ao resultado obtido, dentro do esperado para a espécie. A utilização de hCG como indutor de ovulação não influencia na concentração sérica de P_4 nas jumentas, assim como nas éguas [10], independente da dose a ser utilizada.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para os NPVs médios, máximo e heterogeneidade do NPV do folículo pré-ovulatório e CL nos momentos D0, D2, D4 e D8 das jumentas (Fig.7, 8, 9 e 10). Já para o NPV mínimo, houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos para o CL no D8 (Fig. 8).

Figura 7. Valor numérico de pixel médio do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas

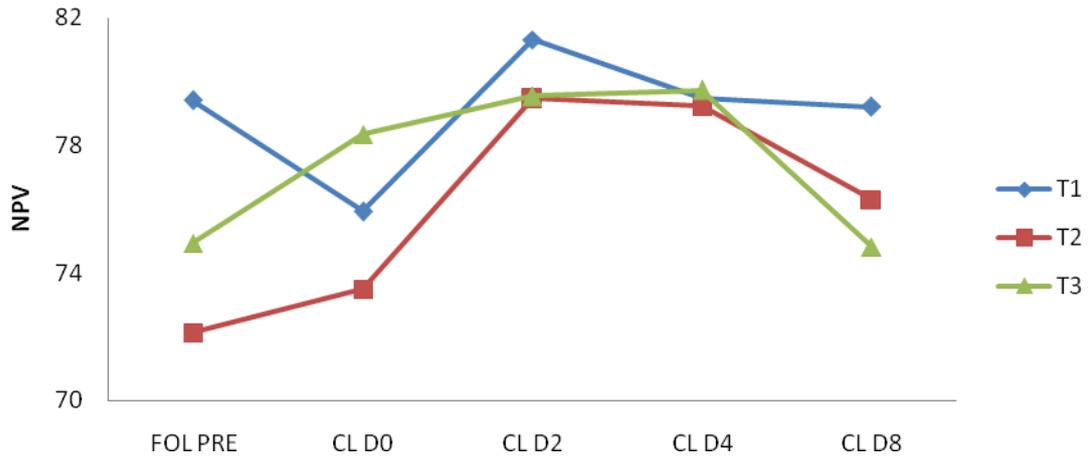


Figura 8. Valor numérico de pixel mínimo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas

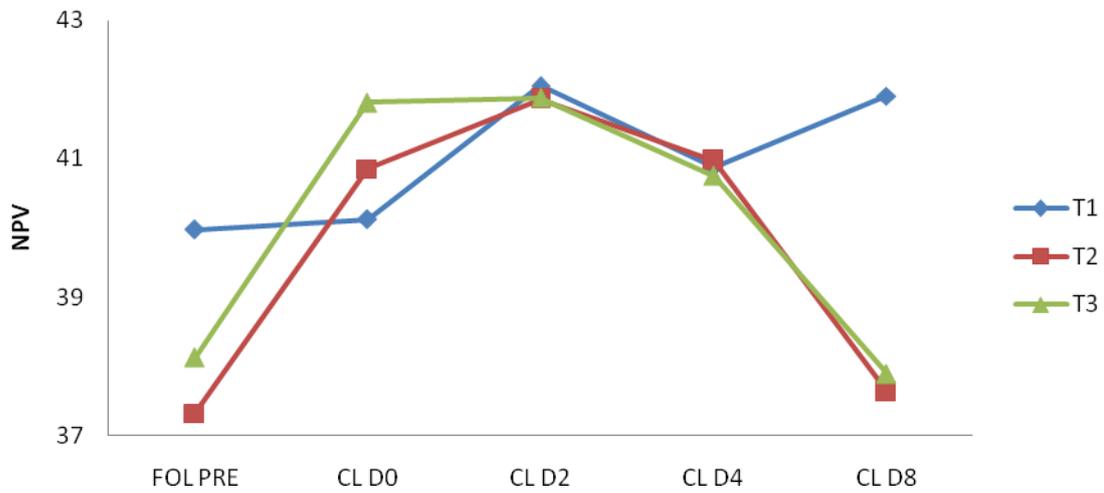


Figura 9. Valor numérico de pixel máximo do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas

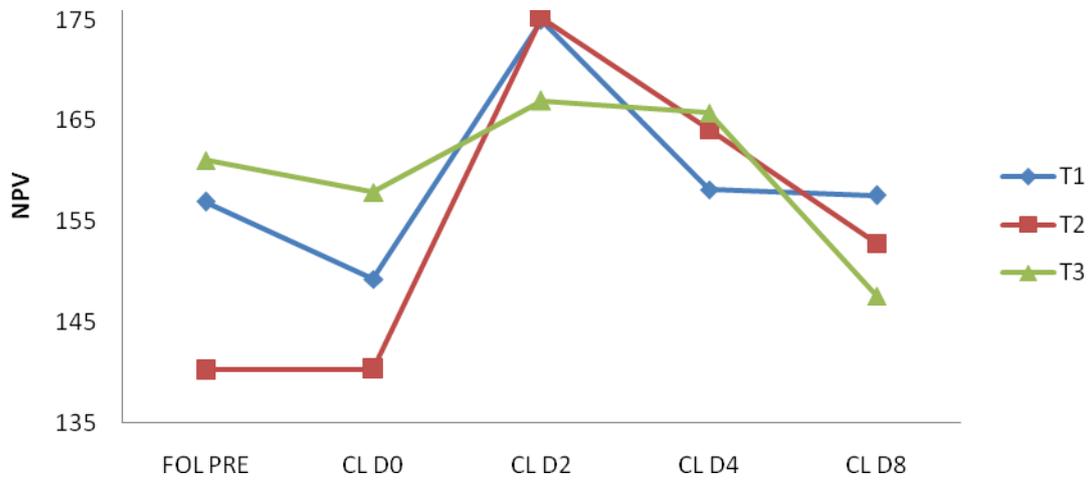
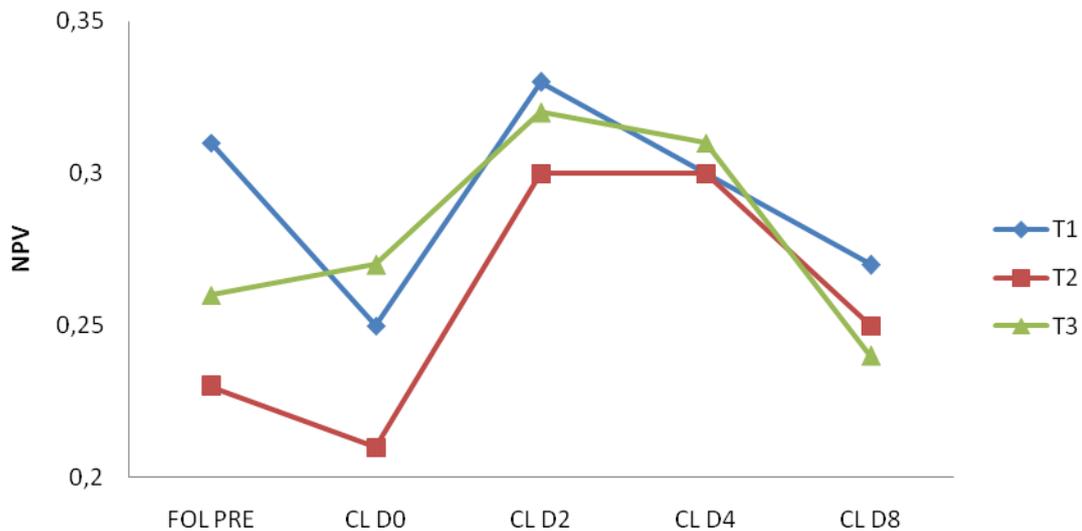


Figura 10. Heterogeneidade do valor numérico de pixel do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo nos momentos D0; D2; D4 e D8 das jumentas



Após a ovulação, a neovascularização é essencial para carrear substratos até as células luteais, responsáveis por produzirem e secretarem a progesterona [29]. Por isso, os métodos que tornam as avaliações da vascularização do CL mais objetivas melhoram os resultados das biotécnicas reprodutivas utilizadas.

Os NPVs apresentaram o mesmo comportamento nos três tratamentos, exibindo redução dos valores do folículo pré-ovulatório para o CL no D0, valores máximos no D2 e

decréscimo até o D8. Assim como Romano et al. [10], que avaliaram a hemodinâmica de éguas tratadas com hCG, a terapia não melhorou o fluxo sanguíneo lúteo independente da dose ou momento da aplicação.

Os resultados demonstram que independente da dose e via de administração, a hCG não demonstrou efeito nos parâmetros avaliados. A hemodinâmica do folículo pré-ovulatório e do CL de jumentas tratadas ou não com indutor de ovulação devem ser mais pesquisados para possibilitar o entendimento da fisiologia da espécie.

Houve correlação significativa ($P < 0,05$) entre o NPV med no D8 e a concentração de P_4 no D8 para o T2 (Fig. 10) e para o T3, (Fig. 11). Para o T1, não houve correlação ($P > 0,05$) entre diâmetro do CL D8, NPV med no D8 e concentração de P_4 no D8.

Assim como nas jumentas, em outros estudos com éguas [10,30,31] também houve correlação positiva entre o fluxo sanguíneo e concentração sérica de P_4 , porém existem poucos estudos com a espécie asinina utilizando a ultrassonografia Doppler para avaliação reprodutiva.

A circulação sanguínea exerce papel vital para o funcionamento apropriado do CL, pois é a neovascularização que carrega os substratos necessários para a biossíntese da P_4 e para a secreção de outros hormônios esteroides pelas células luteais [29,32].

Como a perfusão vascular pode ser avaliada pela ultrassonografia Doppler colorida, essa ferramenta pode ser utilizada para avaliar se o CL é funcional ou não, já que possui correlação positiva com os níveis séricos de P_4 .

Figura 11. Correlação entre valor numérico de pixel médio e concentração de P₄ oito dias após ovulação para jumenta com ovulação induzida com 450UI de gonadotrofina coriônica humana por via intravenosa

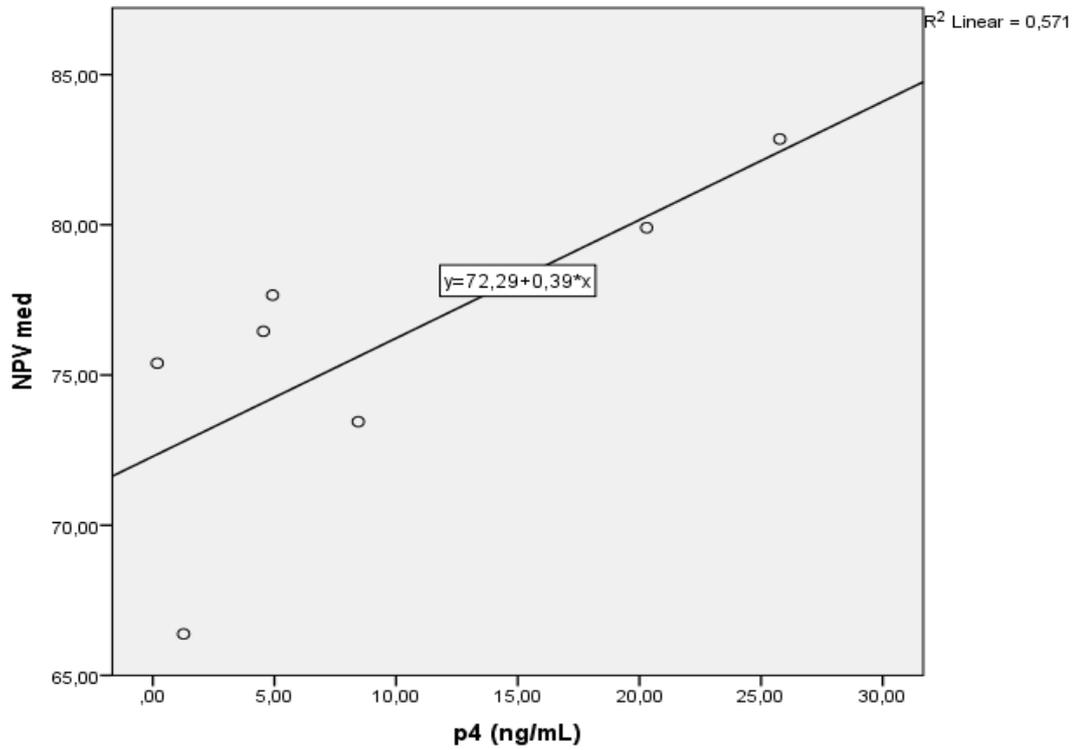
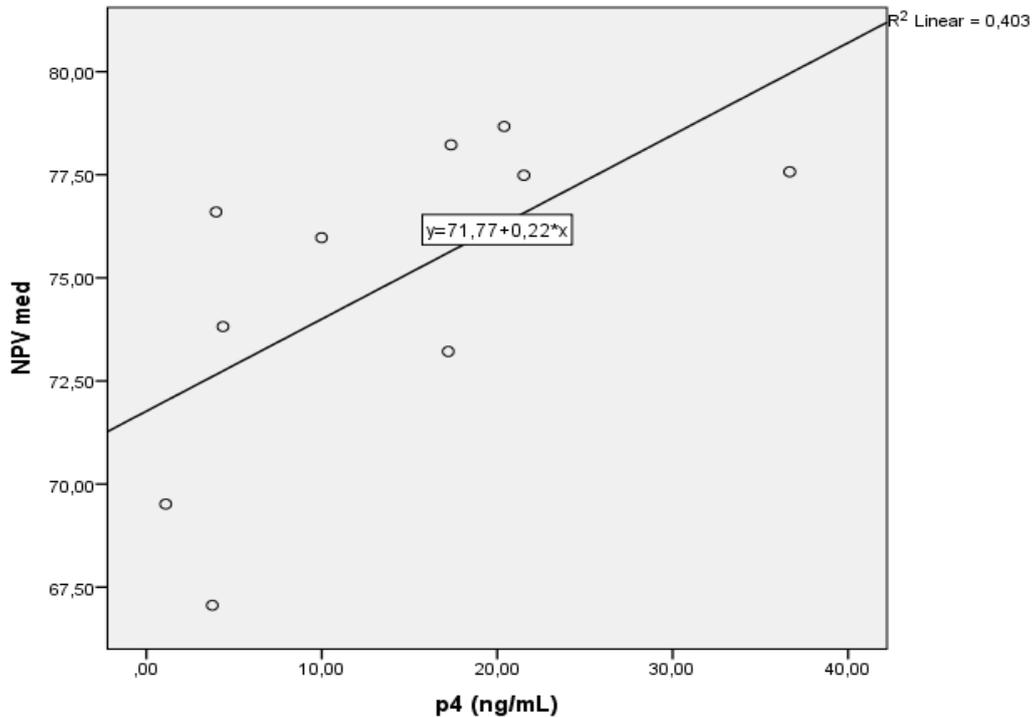


Figura 12. Correlação entre valor numérico de pixel médio e concentração de P4 oito dias após ovulação para jumentas com ovulação induzida com 450UI de gonadotrofina coriônica humana no acuponto *Hou Hai*



CONCLUSÃO

A utilização de hCG na dose de 450UI por via IV ou em acuponto *Hou Hai* foi eficiente em promover a indução de ovulação em jumentas, mostrando que a dose padrão de hCG atualmente utilizada para esta espécie está superestimada.

REFERÊNCIAS

- [1] Taberner, E., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T., Miró, J. (2008) Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. *Theriogenology*, **70**, 1489–1497.
- [2] Tadesse, G., Tefera, M. (2013) Reproductive Characteristics of Abyssinian Jennies Exposed to Stallions and Jackasses. *Ethiopian Veterinary Journal*, **17**, 77–84.
- [3] Mariante, Da S. A., Egito, A.A. (2002) Animal genetic resources in Brazil: Result of five centuries of natural selection. *Theriogenology*, **57**, 223–235.
- [4] Galisteo, J., Perez-Marin, C.C. (2010) Factors affecting gestation length and estrus cycle characteristics in Spanish donkey breeds reared in southern Spain. *Theriogenology*, **74**, 443–450.

- [5] Budhan, S., Pukazhenthil, A.B., David, E.W. (2004) Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reproduction, Fertility, and Development*, **16**, 33–46.
- [6] Lemma, A., Schwartz, H.J., Bekana, M. (2006) Application of ultrasonography in the study of the reproductive system of tropical jennies (shape *Equus asinus*). *Tropical Animal Health and Production*, **38**, 267–274.
- [7] Bergfelt, D.R., Pierson, R.A., Ginther, O.J. (2006) Regression and resurgence of the CL following PGF2 α treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology*, **65**, 1605–19.
- [8] Card, C.E., Manning, S.T., Bowman, P., Leibel, T. (1997) Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *Canadian Veterinary Journal*, **38**, 171–174.
- [9] Davies Morel, M.C.G., Newcombe, J.R. (2008) The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Animal Reproduction Science*, **109**, 189–99.
- [10] Romano, R.M., Ferreira, J.C., De Siqueira, C.H., Boakari, Y.L., Ignácio, F.S., Novaes Filho, L.F. et al. (2015) Characterization of Luteal Blood Flow and Secretion of Progesterone in Mares Treated With Human Chorionic Gonadotropin for Ovulation Induction or During Early Diestrus. *Journal of Equine Veterinary Science*, **35**, 591–597.
- [11] Zhou, W., Fu, L.W., W.Z., Tjen-A-Looi, S.C., Li, P., Longhurst, J.C. (2005) Afferent mechanisms underlying stimulation modality-related modulation of acupuncture-related cardiovascular responses. *Journal of Applied Physiology*, **98**, 872–880.
- [12] Luna, S.P.L., Angeli, A.L., Ferreira, C.L., Lettry, V., Scognamillo-Szabo, M. (2008) Comparison of Pharmacopuncture, Aquapuncture and Acepromazine for Sedation of Horses. *eCAM Advance Access published*, **5**, 267–272.
- [13] Wang, X.L., Zhang, T.F., Zhang, H.X., Mao, H.R., Huang, G.F. (2007) Therapeutic effects of acupoint injection at cervical jiaji points and effects on ET and CGRP in the patient of ischemic stroke. *Zhongguo Zhen Jiu*, **27**, 93–95.
- [14] Gastal, E.L., Gastal, M.O., Ginther, O.J. (2006) Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*, **131**, 699–709. doi:10.1530/rep.1.01011.
- [15] Somar Meteorologia. Tempo Agora. Disponível Em: <<http://www.tempoagora.com.br/previsaodotempo.html/brasil/EntreRios-BA/>> 2012.
- [16] Henneke, D.R.; Potter, G.D.; Kreider, J.L.; Yeates B. (1983) Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, **15**, 371–372.
- [17] Samper, J.C. (1997) Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, **43**, 189–191.
- [18] Carluccio, A., Panzani, S., Tosi, U., Faustini, M., De Amicis, I., Veronesi, M.C. (2007) Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. *Theriogenology*, **68**, 914–919.

- [19] Conceição, J.C., Freitas Neto, L.M., Aguiar Filho, C.R., Araújo, G.H.M., Oliveira, J.V., Bartolomeu, C.C., Oba, E., Meira, C. (2009) Concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de Jumentas (*Equus asinus*) com ovulações simples e duplas. *Medicina Veterinária*, **3**, 15-19.
- [20] Quaresma, M., Payan-Carreira, R. (2015) Characterization of the estrous cycle of Asinina de Miranda jennies (*Equus asinus*). *Theriogenology*, **83**, 616–624.
- [21] Carluccio, A., Gloria, A., Robbe, D., Veronesi, M.C., De Amicis, I., Cairoli, F. et al. (2017) Reproductive characteristics of foal heat in female donkeys. *Animal*, **11**, 461–5.
- [22] Derar, R.I., Hussein, H.A. (2011) Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Jennies in Upper Egypt. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–6.
- [23] Carluccio, A., Panzani, S., Contri, A., Tosi, U., De Amicis, I., Veronesi, M.C. (2008) Luteal function in jennies following PGF₂ treatment 3 days after ovulation. *Theriogenology*, **70**, 121–5.
- [24] Carr, B.R.; MacDonald, P.C.; Simpson, E.R. (1982) The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertility and Sterility*, **38**, 303–11.
- [25] Grizendi, B.M., Fernandes, C.B. (2015) Éguas em idade avançada : perda embrionária relacionada à deficiência de progesterona e à doença endometrial. *Revista Acadêmica de Ciência Animal*, **13**, 23–29.
- [26] Sieme, H., Lüttgenau, J., Sielhorst, J., Martinsson, G., Bollwein, H., Thomas, S. et al. (2015) Improving the formation and function of the corpus luteum in the mare. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **39**, 117–20.
- [27] Carnevale, E.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J. (1993) Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Animal Reproduction Science*, **31**, 287–299.
- [28] Ginther, O.J., Utt, M.D., Bergfelt, D.R., Beg, M.A. (2006) Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science*, **95**, 144–50.
- [29] Díaz-Duran, M., Zarco, L., Boeta, A.M. (2017) Ovarian dynamics and estrous cycle length in the donkey (*Equus asinus*). *Theriogenology*, **103**, 1–8.
- [30] Bollwein, H., Mayer, R., Weber, F., Stolla, R. (2002) Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, **65**, 2043–2051.
- [31] Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O. (2007) Spatial Relationships between Serrated Granulosa and Vascularity of the Preovulatory Follicle and Developing Corpus Luteum. *Journal of Equine Veterinary Science*, **27**, 20–7.
- [32] Hansel, W., Blair, R.M. (1996) Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, **45**, 1267–1294.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A subdose de 450UI/IV de hCG pode ser utilizada nas éguas e jumentas como indutor de ovulação em protocolos para IA, superestimando a dose de 1500UI/IV que é utilizada na rotina por médicos veterinários.

Contudo, devido à maior variação no intervalo entre indução e a ovulação quando se utilizou a aplicação em acuponto, à via IV torna-se mais viável, já que esse parâmetro influencia no momento de realização da IA.

Mais pesquisas devem ser realizadas para definir qual a dose mínima efetiva pela via intravenosa para essas fêmeas.

No momento da aplicação no acuponto *Hou Hai*, as jumentas demonstraram desconforto, diferente das éguas. O tamanho do cateter a ser utilizado e o volume da solução injetada para estimular o acuponto, precisam ser melhor estudados.

Nas fêmeas que não foram domadas, não houve dificuldades na administração no acuponto, diferente das aplicações venosas, podendo ser uma via de escolha para receptoras de embrião.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. 2004a. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction** 71: 637-642.

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

Acupuncture: IVAS points: Equine points. Vancouver: West Boulevard Veterinary Clinic. Disponível em: <http://wbvc.bc.ca/acupuncture/ivas-points/equine-points/#UP>. Acesso em 02/05/2017.

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

ALTMAN, S. 1997. Acupuncture therapy in Small animal practice. **The compendium in continuing education** 19: 1233-1245.

ALVARENGA, M.A.; FERREIRA, J.C.P.; MEIRA, C., LUNA, S.P.L.; BURNS, P.J. 1998. Induction of luteolysis in mares utilizing a micro-dose of prostaglandin F₂ alfa in the sacral lumbar space. **Journal of Equine Veterinary Science** 18: 167-168.

ALZIABI, M.O.; WATSON, E.D.; FRASER, H.M. 2003. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction** 125: 259-270.

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

ANDRADE MOURA, J.C. 2012. Diagnóstico por imagem na reprodução equina “controle do útero”. **Ciência Animal** 22: 161-170.

ANDRADE MOURA, J.C.; SIEME, K.; WEITEZE, F.K. 2014. Ovulação na égua – Evolução dos conhecimentos ultrassonográficos (parte 1). **A Hora Veterinária** 33: 45- 46.

ARAUJO, M.L. 2016. Diferentes vias e momentos de aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo para vacas. 47f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

ARRUDA R.P.; VISINTIN J.A.; FLEURY J.J.; GARCIA A.R.; MADUREIRA E.H.; CELEGHINI E.C.C.; NEVES NETO J.R. 2001. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultrassom e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos? **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science** 38: 233-239.

ATAYDE, L.M. 2008. **Características do ciclo reprodutivo da égua no norte de Portugal**. Trabalho de Síntese provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, ICBAS, 1-64.

AURICH, C. 2011. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science** 124: 220-228.

- AWAN, F.S.; MEHMOOD, M.U.; SATTAR, A.; AHMAD, N. 2016. Comparative efficacy of hCG or GnRH analogue (lecirelin acetate) on follicular dynamics, degree of endometrial edema, sexual behavior, ovulation and pregnancy rate in crossbred broodmares. **Journal Equine Veterinary Science** 41: 71-72.
- BAERWALD, A.R. 2009. Human antral folliculogenesis: what we have learned from bovine and equine models. **Animal Reproduction** 6: 20-29.
- BARBACCINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. 2000. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education** 2: 404-408.
- BELIN, F.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. 2000. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. **Biology of Reproduction** 1343: 1335-1343.
- BERGFELT, D.R. 2000. Estrous synchronization. mare. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.; MCKINNON, O. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: Saunders, p.195-228.
- BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K.; GINTHER, O.J. 2000. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology** 54: 1191-1206.
- BERGFELT, D.R.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. 2006. Regression and resurgence of the CL following PGF2a treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology** 65:1605-1619.
- BERGFELT, D.R. 2009. Anatomy and physiology of the mare. In: **Equine breeding management and artificial insemination**. SAMPER, J.C. 2ed. Missouri: Saunders Elsevier, p.113-131.
- BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. 2002. Effects of deslorelina or hCG administration on reproductive performance in first postpartum estrus mares. **Theriogenology** 58: 165-169.
- BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLA, R. 2002. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology** 65: 2043-2051.
- BOLLWEIN, H.; KOLBERG, B.F. 2004. The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology** 61: 1137-1146.
- BRANNSTROM, M.; HELLBERG, G.P. 1989. Bradykinin potentiates LH-induced follicular rupture in the rat ovary perfused in vitro. **Human Reproduction** 4: 475- 481.
- BRINSKO, S.P. 2006. Insemination doses: How low can we go?. **Theriogenology**.66: 543-550.
- CAMILLO, F.; VANOZZI, I.; TESIA, M.; SABATINI, C.; ROTA, A.; PACIOLLA, E.; DANG-NGUYEN, I.; PANZANI, D. 2014. Induction of ovulation with buserelin in jennies: In search of the minimum effective dose. **Animal Reproduction Science** 151: 56-60.
- CARD, C.E.; MANNING, S.T.; BOWMAN, P.; LEIBEL, T. 1997. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. **The Canadian Veterinary** 38: 171-174.
- CARDOSO, R.C.; BARBOSA, L.P.; ARAÚJO, R.C.S.A. et al. 2014. Crescimento folicular e momento de ovulação com aplicação de subdoses hormonais no acuponto Hou Hai em protocolos de sincronização de estro em cabras. 74f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

- CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; TOSI, U.; FAUSTINI, M.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M.C. 2007. Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. **Theriogenology** 68: 914-919.
- CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; CONTRI, A.; TOSI, U.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M.C. 2008. Luteal function in Jennies following PGF_{2α} treatment 3 days after ovulation. **Theriogenology** 70: 121-125.
- CARLUCCIO, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; VERONESI, M.C.; DE AMICIS, I.; CAIROLI, F.; CONTRI, A. 2017. Reproductive characteristics of foal heat in female donkeys. **Animal** 11: 461-465.
- CARNEVALE, E.M.; MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. 1988. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. **Journal Equine Veterinary Science** 8: 428-431.
- CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. 1993. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. **Animal Reproduction Science** 31: 287-299.
- CARR, B.R.; MACDONALD, P.C.; SIMPSON, E.R. 1982. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the corpus luteum. **Fertility and Sterility** 38: 303-311.
- CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERR, G.G. 2008. Princípios físicos do Doppler em ultrasonografia. **Ciência Rural** 38: 872-879.
- COLE, L.A. 2009. New discoveries in the biology and detection of hCG . **Reproductive biology and endocrinology** 7: 1-37.
- CONCEIÇÃO, J.C.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R.; ARAÚJO, G.H.M.; OLIVEIRA, J.V.; BARTOLOMEU, C.C.; OBA, E.; MEIRA, C. 2009a. Avaliação ultrassonográfica da dinâmica folicular ovariana de Jumenta (*Equus asinus*) durante o ciclo estral. **Medicina Veterinária** 3: 7-14.
- CONCEIÇÃO, J.C.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R.; ARAÚJO, G.H.M.; OLIVEIRA, J.V.; BARTOLOMEU, C.C.; OBA, E.; MEIRA, C. 2009b. Concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de Jumentas (*Equus asinus*) com ovulações simples e duplas. **Medicina Veterinária** 3: 15-19.
- COSTA, M.M.; MARTINS, A.V.; INADA, T.; SANTOS, M.R.C. 2000. Efeito do tratamento com acupuntura em éguas, para indução do cio. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** 7: 42-46.
- COSTA, F.Q.; BOTTECCHIA, R.J.; SILVA, J.F.S. 2008. Uso da acupuntura no tratamento de patologias reprodutivas de fêmeas de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 32: 50-57.
- CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J.R. 2012. Ultrasound confirmation of ovulation in mares: a normal corpus luteum or a haemorrhagic anovulatory follicle? **Reproduction in Domestic Animals** 48: 1-7.
- DADARWAL, D.; TANDON, S.N.; PUROHIT, G.N.; PAREEK, P.K. 2004. Ultrasonographic evaluation of uterine involution and postpartum follicular dynamics in French Jennies (*Equus asinus*). **Theriogenology** 62: 257-264.
- DAVIS MOREL, M.C.G.; NEWCOMBE, J.R. 2008. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple

- pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. **Animal Reproduction Science** 109: 189–199.
- DAVIS MOREL, M.C.G.; NEWCOMBE, J.R.; HAYWARD K. 2010. Factors affecting preovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). **Theriogenology** 74: 1241–1247.
- DAY, F.T. 1939. Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after treatment with gonadotrophic hormones. **Journal of Agricultural Science** 29: 459-469.
- DECOURT, C.; CARAT, A.; BRIAN, C.; GUILLAUM, D.; LOME, D.; CHESNEA, D.; LARDI, L.; DUCHAMP, G.; REIGNER, F.; MONGET, P.; DUFOURNY, L.; BELTRAMO, M.; DARDENTE, H. 2014. Acute injection and chronic perfusion of kisspeptin elicit gonadotropins release but fail to trigger ovulation in the mare. **Biology of Reproduction** 90: 36.
- DERAR, R.I.; HUSSEIN, H.A. 2011. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in jennies in Upper Egypt. **Veterinary Medicine International** 2011: 1-6.
- DÍAZ-DURAN, M.; ZARCO, L.; BOETA, A.M. 2017. Ovarian dynamics and estrous cycle length in the donkey (*Equus asinus*), **Theriogenology** 103: 1-8.
- DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. 2002. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction** 66: 1111-1118.
- DRIANCOURT, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology** 55: 1211-1239.
- FARIA, A.B.; SCOGNAMILLO, S.; BÓ, M.V.R. 2008. Acupuntura veterinária: conceitos e técnicas- Revisão. **Ars Veterinaria** 24: 83-91.
- FARIA, D.R.; GRADELA, A. 2010. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 34: 114-122.
- FERREIRA, J.C.; MEIRA, C. 2011. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rura** 41: 1063-1069.
- FERREIRA-DIAS, G.; PINTO-BRAVO, P.; MATEUS, L.; REDMERC, D.A.; MEDEIROS, J.A. 2006. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology** 30: 247–259.
- FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, A.R.G.; SCOFIELD, D.B.; McCUE, P. 2012. Efficacy of desloreline acetate (SucroMate) on induction of ovulation in American Quarter Horse mare. **Journal of Equine Veterinary Science** 32: 285-288.
- FIELDING, D. Reproductive characteristics of the jenny donkey – *Equus asinus*: a review. **Tropical Animal Health and Production** 20: 161-166.
- FIGUEIREDO, T.; PAIVA, R.; KOZICKI, L.E.; KAERCHER, F.; WEISS, R.R.; SANTOS, I.W.; MURADAS, P.R. 2011. Induction of ovulation in Quarter Horse mares through the use of desloreline acetate and human chorionic gonadotrophin (hCG). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 54: 517-521.
- FLEURY, P.D.C; ALONSO, M.A; SOUSA, F.A.C; ANDRADE, A.F.C; ARRUDA, R.P. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31: 27-31.
- FRITZ, M.A.; SPEROFF, L. 1982. The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. **Fertility and Sterility** 38: 509 – 529.

GALISTEO, J.; PEREZ-MARIN, C.C. 2010. Factors affecting gestation length and estrus cycle characteristics in Spanish donkey breeds reared in southern Spain. **Theriogenology** 74: 443-50.

GASTAL, E.L; GASTAL, M.O; BERGFELT, D.R; GINTHER, O.J. 1997. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction** 57:1320–1327.

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

GASTAL, E.L; GASTAL, M.O; GINTHER, O.J. 2006b. Serrated granulosa and other discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. **Journal Equine Veterinary Science** 26: 67-73.

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

GASTAL, E.L. 2009. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction Science** 6: 144-58.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. 2011. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 35: 239-252.

GINTHER, O.J. 1974. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of Animal Science** 39: 550-564.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. 1983. Ultrasonic evaluation of the mare reproductive tract: Principles, equipment, and technique. **Journal Equine Veterinary Science** 3: 6.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A., 1984. Ultrasonic evaluation of the reproductive tract of the mare: ovaries. **Journal Equine Veterinary Science** 4: 11–22.

GINTHER, O.J. 1986. **Ultrasonic imaging and reproductive events in mare**. Madison, WI: Equiservices, p.378.

GINTHER, O.J.; SCRABA, S.T.; BERGFELT D.R. 1987. Reproductive seasonality of the jennies. **Theriogenology** 27: 587–592.

GINTHER, O.J. 1988. Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice** 4: 197-213.

GINTHER, O.J. 1992. **Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects**. 2^a. Ed. Crossplains: Equiservices, p.642.

Ginther OJ. 1995. **Ultrasonic imaging and animal reproduction, book 2: Horses**. Cross Plains (WI): Equiservices Publishing.

GINTHER OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science** 60: 61-79.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. 2001. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction** 65: 638–647.

- 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. **Animal Reproduction** 126: 653 – 660.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. 2004a. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction** 1: 45-63.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; CHECURA, C.M.; BEG, M.A. 2004b. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction** 70: 1063-1069.
- GINTHER, O.J.; UTT, M.D. 2004. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science** 24: 516-526.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. 2005. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction** 130: 379-388.
- GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. 2006. Controlling interrelationships PF progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science** 95: 144-150.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. 2007a. Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. **Journal of Equine Veterinary Science** 27: 20-27.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. 2007b. Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. **Biology of Reproduction** 77: 202-208.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. 2009. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology** 71: 780-788.
- GRIZENDI, B.M.; FERNANDES, C.B. 2015. Éguas em idade avançada: perda embrionária relacionada à deficiência de progesterona e à doença endometrial. **Revista Acadêmica: Ciência Animal** 13: 23-29.
- GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRUCK, I.; VIUFF, D.; BEZÁRD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. 1995. IN-VITRO production of equine embryos. **Biology of Reproduction** 1: 299 – 307.
- HANSEL, W.; BLAIR, R.M. 1996. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology** 45: 1267-1294.
- HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATES, B.F. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal** 15: 371-372.
- HENRY, M.; FIGUEIREDO, A.E.F.; PALHARES, M.S.; CORYN, M. 1987. Clinical and endocrine aspects of the oestrus cycle in donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Reproduction and Fertility Supplement** 35: 297-303.
- HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. 2007. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction of Domestic Animal** 42: 51-58.
- HILLIER, S.G. 1985. Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary. **Reviews of Reproductive Biology** 7: 168-222.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology** 47: 23-32.

HWANG, Y. C. 1992. Anatomy and classification of acupoints. **Problems in Veterinary Medicine** 4: 12-15.

HWANG, Y.C.; LIMEHOUSE, J.B. 2006. Atlas de acupuntura canina. In: SCHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária: da arte antiga à moderna**. São Paulo: ROCA 9: 122-146.

JACOB, J.C.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; CARVALHO, G.R.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. 2009. Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. **Reproduction of Domestic Animal** 44: 92–99.

KAYISLI, U.; SELAM, B.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; DEMIR, R.; ARICI, A. 2003. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. **Journal of Immunology** 171: 2305-2313.

KENDALL, D. E. 1989. A scientific model for acupuncture. Part I. **American Journal of Acupuncture** 17: 251-268.

LACEY, S.; SMITH, C. A.; PATERSON, C. 2009. Construir resiliência: uma exploração preliminar das percepções das mulheres sobre o uso da acupuntura como adjuvante da Fertilização *In Vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 9: 50.

LEBLANC, M.; LOPATE, C.; KNOTTENBELT, D.; PASCOE, R. 2003. “**The Mare**” **Equine Stud Farm Medicine and Surgery V**, 1º Ed, Saunders Elsevier Science, 113-212.

LEMMA, A.; SCHWARTZ, H.J.; BEKANA, M. 2006. Application of ultrasonography in the study of the reproductive system of tropical jennies (*Equus asinus*). **Tropical Animal Health Production** 38: 267-274.

LEY, W.B. 2006. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**. São Paulo: Roca, 215p.

LIN, J.H.; CHEN, W.W.; WU, L.S. Acupuncture treatments for animal reproductive disorders. 1999. In: **Annual Internacional Congress on Veterinary Acupuncture**, Lexington, KY. p.15-26.

LIN, J.H.; CHAN, W.W.; WU, L.S. Acupuntura para tratar distúrbios reprodutivos. In: SCHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária: da arte antiga à moderna**, São Paulo: ROCA, 2006, cap. 21, p. 258-264.

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

LÜTTGENAU, J.; ULBRICH, S.E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. 2011. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science** 125: 20–29.

LUNA, S.P.L.; ANGELI, A.L.; FERREIRA, C.L.; LETTRY, V.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. 2008. Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. **eCAM Advance Access published** 5: 267-272.

MA, H. 1992. The effect of acupuncture in the content of substance P in serum of gravid during delivery. **Chen Tzu Yen Chiu** 17: 65-66

MAIA, K. M. 2011. **Fisiologia e controle do ciclo estral em fêmeas de cateto (*Tayassu tajacu*, *Linnaeus*, mantidas em cativeiro no semi-árido brasileiro**. Mossoró. 59 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró.

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. 2002. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology** 57: 223-235.

MARTINEZ, A.C.; OLIVEIRA, F.S.; CADAMURO, V.A.H.; BONAMICO, C.G.; FOLADOR, M. 2007. Uso de baixa dose de cloprostenol sódico administrado pelo ponto *bai hui* de acunpuntura em ovelhas. **Archive of Veterinary Science** 12: 231-232.

MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews** 79: 263-323.

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. **Proceedings of the 50th Convention of the American Association of Equine Practitioners** 50: 510-513.

MCDONALD, L.E. 1988. Hormones of pituitary gland. In: BOOTH, N.H.; MCDONALD, L.E. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Ed. 6. Ames: Iowa State University Press, p. 90.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. 1992. **Equine Reproduction**. 5.ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992. p. 52.

MCKINNON, A.O.; MCCUE, P.M. 2011. Induction of Ovulation. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.V. **Equine Reproduction**. 2 Ed. Wiley-Blackwell, p.1858-1869.

MEIRA,C.; FERREIRA, J.C.P.; PAPA, F.O.; TORNERO, M.T.T.; BICUDO, S.D. 1995. Study of the cycle in Donkeys (*Equus asinus*) using ultrasonography and plasma progesterone concentrations. **Biology of Reproduction** 1: 403-410.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. 2006. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal Reproduction Development** 52:153-160.

MOELLER, S.J. 2002. Evolution and use of ultrasonic technology in the swine industry. **Journal Animal Science** 80: 19-27.

MOREL MCGD, NEWCOMBE JR. 2008. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. **Animal Reproduction Science** 109: 189-199.

MORTENSEN, C.J.; CHOI, Y.H.; HINRICHS, K; ING, N.H.; KRAEMER, D.C.; VOGELSANG, S.G.; VOGELSANG, M.M. 2009. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science** 110: 237-244.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. 2000. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science** 60/61: 245–262.

NAGY, P.; HUSZENICZA, GY.; REICZIGEL, J.; JUHASZ, J.; KULCSAR, M.; ABAVARY, K.; GUILLAUME, D. 2004. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. **Theriogenology** 61: 203- 214.

NEWCOMBE, J.R. 2011. Human Chorionic Gonadotrophin. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, Second Edition, Wiley Blackwell, pp.1804-1810

- NIE, G.J.; GOODIN, A.N.; BRADEN, T.D.; WENZEL, J.G. 2001. Luteal and clinical response following administration of dinoprost tromethamine or cloprostenol at standard intramuscular sites or at the lumbosacral acupuncture point in mares. **American Journal of Veterinary Research** 62:1285-1289.
- OLIVEIRA, L.A.; SOUZA, J.A.T. 2003. Eficiência do hCG e LH na indução da ovulação e taxa de gestação em éguas da raça Quarto de Milha submetidas à cobertura única em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 27: 504-506.
- PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. 1980. Use of ultrasound echography in equine gynecology. **Theriogenology** 13: 203-216.
- PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P.; VERDONCK, E. 2006. Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. **Animal Reproduction Science** 94:182-183.
- PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.R. 2010. Diagnóstico de gestação e sexagem fetal em caprinos por ultrassonografia. **Acta Veterinaria Brasilica** 4: 30-35.
- PEREIRA, R.R.; SILVA, E.S.M.; IGNÁCIO, F.A.S.; LACERDA, T.F.; MEIRA, C.; COELHO, C.S. 2014. Use of doppler ultrasound as a complementary diagnosis of endometritis in mares: case report. **Revista Científica de Medicina Veterinária** 23: Jul.
- PERES, K.R.; LANDIM-ALVARENGA, F. DA C.; ALVARENGA, M.A. 2006. Utilização do primeiro ciclo ovulatório da estação reprodutiva para produção de embriões em éguas sob condições tropicais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 43: 270-279.
- PESSOA, V.M.; MEIR, C.; FERREIRA, J.C.P.; ARAÚJO, G.H.M.; GIOSO, M.M. 2004. Effect of microdoses of prostaglandin F_{2α} to induce luteolysis in Nelore cows. *In: Annual International Congress on Veterinary Acupuncture*, Oostende, Belgium., p.277-283.
- PIERSON, R.A.; KASTELIC, J.P.; GINTHER, O.J. 1988. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. **Theriogenology** 29: 3-20.
- PIMENTEL, M.M.L.; SANTOS, F.A. dos; DIAS, R.V.C.; MACÊDO, L.B. de; FONSECA, Z.A.A. de S.; ANDRÉ, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C. 2014. Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. **Arquivo Ciência Veterinária e Zootecia** 17: 69-75.
- PORTO, R.R.M.; CAVALCANTE, T.V.; DIAS, F.E.F.; ROCHA, J.M. DO N.; SOUZA, J.A.T. 2007. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inés no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira** 8: 521-528.
- PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E. 2004. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development** 16: 33-46.
- QUARESMA, M.; PAYAN-CARREIRA, R. 2015. Characterization of the estrous cycle of Asinina de Miranda jennies (*Equus asinus*). **Theriogenology** 83: 616-624.
- ROBERTO DA COSTA, R.P.; BRANCO, V.; PESSA, P.; ROBALO SILVA, J.; FERREIRA-DIAS, G. 2005. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue. **Reproduction Fertility and Development** 17: 659-666.
- RODRIGUES, T.G.; SILVA, J.F.S.; FAGUNDES, B. 2014. Uso da eCG para formação do corpo lúteo equino e produção de progesterona. **Acta Biomedica Brasiliensia** 5: 56-70.

- ROMANO, M.A.; MUCCIOLO, R.G.; FELICIANO E SILVA, A.E.D. 1998. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 35: 25-28.
- ROMANO, R.M.; FERREIRA, J.C.; CANESIN, H.S.; BOAKARI, Y.L.; IGNÁCIO, F.S.; NOVAES FILHO, L.F.; THOMPSON JR, D.L.; MEIRA, C. 2015. Characterization of luteal blood flow and secretion of progesterone in mares treated with human chorionic gonadotropin for ovulation induction or during early diestrus. **Journal of Equine Veterinary Science** 35: 591-597.
- SAMPER, J.C. 1997. Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. In: **Proceedings of the 43rd Annual Convention American Association of Equine Practitioners** 43: 189-191.
- 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** 22: 320-323.
- SAMPER J.C. 2008. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. **Theriogenology** 70: 445-447.
- SCHAUER, S.N.; SANTAKKE, S.D.; WATSON, E.D.; ESTEVES, C.L.; DONADEU, F.X. 2013. Involvement of miRNAs in equine follicle development. **Reproduction** 146: 273 – 282.
- SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R.; BECHARA, G.H.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. 2006. Breve Histórico da Acupuntura veterinária no Brasil e sua Prática no Estado de São Paulo. **MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação** 4: 61-65.
- SIDDIQUI, M.A.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O.J. 2009a. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science** 113: 287-292.
- SIEME, H.; LUTTGNAU, J.; SELHORST, J.; MARTINSSON, G.; BOLLWEIN, H.; THOMAS, S.; BURGER, D. 2015. Improving the formation and function of the corpus luteum in the mare. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 39: 117-120.
- SILVA, J.F.S.; CNOP, F.P.; SÁNCHEZ, R.J.R; VIANNA, S.A.B.; SOUZA, G.V.; ELIGIO, C.T.; RIBAS, J.A.S.; COSTA, D.S. 2006. Avaliação da dinâmica útero-ovárica da égua sob o efeito de um implante subcutâneo de microcápsulas de poli-hidroxitirato contendo progesterona. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária** 101: 559-560.
- SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A; GINTHER, O.J. 2006. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal of Reproduction** 3: 339-346.
- SILVA, L.A. 2010. Ultrassonografia Doppler na reprodução equina: presente e futuro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária +Equina** 29: 66-77.
- SINCLAIR, C.D.; KOUBA, J.M.; MURRAY, L.W.; DOUTHIT, T.L.; GRIEGER, D.M.; WEBEL, S.K.. 2015. Use of intravaginal triptorelin gel for ovulation induction in mares. **Journal Equine Veterinary Science** 35: 437-438.
- SMITH, R.L.; VERNON, K.L.; KELLEY, D.E.; GIBBONS, J.R.; MORTENSEN, C.J. 2012. Impact of moderate exercise on ovarian blood flow and early embryonic outcomes in mares. **Journal of animal science** 90: 3770-3777.
- SOMAR METEOROLOGIA**. 2012. Tempo agora. Disponível em:
<<http://www.tempoagora.com.br/previsaodotempo.html/brasil/EntreRios-BA/>>.

- SOUSA, F.A.C.; FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. 2007. Aumento da disponibilidade de éguas receptoras de embrião após tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG). **Acta Scientiae Veterinariae** 35 (Suppl.): 1258.
- SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. 1996. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology** 137: 1144-1147.
- SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. 2003. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology** 59:151-170.
- TABERNER, E.A.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRO, J. 2008. Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian Jennies. **Animal Reproduction Science** 70: 1489–1497.
- TADESSE, G.; TEFERA, M. 2013. Reproductive Characteristics of Abyssinian Jennies Exposed to Stallions and Jackasses. **Ethiopian Veterinary Journal** 17: 77-84.
- URQUIETA, B.; DURAN, M.C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V.H. 2009. hCG-Induced ovulation in Thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. **Reproduction of Domestic Animals** 44: 859-864.
- VANDERWALL, D.K.; JUERGENS, T.D.; WOODS, G.L. 2001. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with hCG or Ovuplant™ (deslorelin). **Journal of Equine Veterinary Science** 21: 539-542.
- VENDRAMINI, O.M.; GUINTARD, C.; MOREAU, J.; TAINTURIER, D. 1998. Cervix conformation: a first anatomical approach in Baudet Du Poitou jenny asses. **Animal Science** 66: 741-744.
- VETERINARY ACUPUNCTURE – The State of an Art. 1982. **Equine Veterinary Journal** 14: 4-5.
- WANG, X.L.; ZHANG, T.F.; ZHANG, H.X.; MAO, H.R.; HUANG, G.F. 2007. Therapeutic effects of acupoint injection at cervical Jiaji points and effects on ET and CGRP in the patient of ischemic stroke. **Zhongguo Zhen Jiu** 27: 93-95.
- WATHES, D.C.; LAMMING, G.E. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal Reproduction and Fertility** 49: 53-67.
- WU, D. Z. 1990. Acupuncture and neurophysiology. **Clinical Neurology and Neurosurgery** 92: 13-25.
- YOON, M.J.; BOIME, I.; COLGIN, M.; NISWENDER, K.D.; KING, S.S.; ALVARENGA, M.A.; JABLONKA-SHARIFF, A.; PEARL, C.A.; ROSER, J.F. 2007. The efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH) in mares: Induction of ovulation, hormone profiles and inter-ovulatory intervals. **Domestic Animal Endocrinology** 33: 470-479.
- WAGENMAKER, E.R.; BREEN, K.M.; OAKLEY, A.E.; PIERSE, B.N.; TILBROOK, A.J.; TURNER, A.I.; KARSCH, F.J. 2009. Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. **Biology of Reproduction** 80: 458-463.
- WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal Reproduction Fertility** suppl.54: 33-48.
- WILDE, O.R.; DE LA VEGA, A.C.; CRUZ, M.L. 2002. Uso de um dispositivo intravaginal para el control del estro en yeguas. **Zootecnia Tropical** 20: 483-492.

WILLIAM, S.; PINEIRO, P.; DE LA SOTA, R.L. 2001. Ultrasonografía reproductiva en producción porcina. **Anal Veterinary** 21: 50-56.

ZAGZEBSKI, J.A. 2000. **Essentials of ultrasound physics**. St. Louis: Mosby.

ZHOU, W.; FU, L.W.; TJEN-A-LOOI, S.C.; LI, P.; LONGHURST, J.C. 2005. Afferent mechanisms underlying stimulation modality-related modulation of acupuncture-related cardiovascular responses. **Journal of Applied Physiology** 98: 872-880.

ZWIEBEL, W.J. 2000. **Introduction to vascular ultrasonography**. Philadelphia: W. B. Saunders Company.

APÊNDICES

ITENS EXIGIDOS

PARTE EXTERNA	
CAPA	Obrigatório
PARTE INTERNA – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS	
FOLHA DE ROSTO	Obrigatório
FOLHA DA COMISSÃO EXAMINADORA	
DEDICATÓRIA	Opcional
AGRADECIMENTOS	
EPÍGRAFE	
TÍTULO/RESUMO/PALAVRAS CHAVE	Obrigatório
TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS	Opcional
LISTAS DE ABREVIATURAS, FIGURAS, QUADROS E/OU TABELAS	
SUMÁRIO	Obrigatório
PARTE INTERNA – ELEMENTOS TEXTUAIS	
FORMA CONVENCIONAL	
INTRODUÇÃO (com Hipótese e Objetivos)	Obrigatório
REVISÃO DE LITERATURA	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS PARCIAIS OU FINAIS	
DISCUSSÃO	
CONCLUSÃO	Opcional
FORMA DE ARTIGOS/CAPÍTULOS	
INTRODUÇÃO (com Hipótese e Objetivos)	Obrigatório
REVISÃO DE LITERATURA	
CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 2 (quando for o caso)	Opcional
CONSIDERAÇÕES FINAIS	
PARTE INTERNA – ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS	
REFERÊNCIAS	Obrigatório
APÊNDICES	
ITENS EXIGIDOS	
IMPACTO CIENTÍFICO	
NORMAS DO PERIÓDICO (quando na forma de Artigos/Capítulos)	
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	Opcional

IMPACTO CIENTÍFICO

Pretende-se produzir uma dissertação de mestrado e publicar dois artigos científicos: “Efeito da subdose de hCG no acuponto *Hou Hai* na dinâmica folicular e no desenvolvimento luteal em éguas” e “Efeito da subdose de hCG no acuponto *Hou Hai* na dinâmica folicular e no desenvolvimento luteal em jumentas” em revista especializada em reprodução animal, com qualis igual ou superior a B1, como por exemplo: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia; Theriogenology; Animal Reproduction Science; Journal Of Equine Veterinary, dentre outras.