



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE DOPPLER NA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA OVÁRICA DE ÉGUAS PURA RAÇA ESPANHOLA – ESTUDO PILOTO

MARIA JOANA ALMEIDA PIRES MARQUES DE CAMPOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus
Doutora Maria Rita Martins Garcia da
Fonseca
Doutor Francisco Requena Domenech

ORIENTADOR

Doutor Francisco Requena Domenech

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE DOPPLER NA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA
OVÁRICA DE ÉGUAS PURA RAÇA ESPANHOLA – ESTUDO PILOTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA JOANA ALMEIDA PIRES MARQUES DE CAMPOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus
Doutora Maria Rita Martins Garcia da
Fonseca
Doutor Francisco Requena Domenech

ORIENTADOR

Doutor Francisco Requena Domenech

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2017
LISBOA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à minha família por todo o apoio que me deu ao longo destes 6 anos, pois sem eles teria sido tudo muito mais difícil. Ao meu pai por me ter passado o sonho de ser veterinária, à minha mãe por ser a melhor do mundo e ao meu irmão por estar sempre ao meu lado.

Ao Jesús que entrou na minha vida a meio deste percurso e se tornou uma das pessoas mais importantes para atingir este objetivo.

A todos os amigos que estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos.

A todos os professores e veterinários que me ajudaram nesta caminhada e me formaram.

Obrigada à professora Graça, ao Paco e à equipa Gen-Ova veterinária que me ajudaram a concluir esta etapa.

RESUMO

Utilização de doppler na avaliação hemodinâmica do ovário de éguas pura raça espanhola – estudo piloto

A ecografia (US) com recurso ao Doppler é uma tecnologia que tem ganho cada vez mais expressão em reprodução equina. Estudos recentes procuram entender de uma forma mais detalhada a fisiologia do tracto reprodutor e demonstrar que durante a maturação folicular são observáveis algumas características que só mais tarde poderão ser visualizadas através do modo-B. Atualmente o funcionamento do Doppler é extensamente conhecido. Contudo, ainda não existem estudos científicos que suportem o seu uso na clínica diária de reprodução equina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a hemodinâmica dos folículos pré-ovulatórios e dos corpos lúteos (CLs), através da técnica de doppler em éguas Pura Raça Espanhola. Neste estudo foram utilizadas 15 éguas entre os 4 e os 19 anos. As imagens ecográficas obtidas foram analisadas com o software Image Color Summarizer, que permite a quantificação dos píxeis de cada imagem. Posteriormente, efectuou-se a análise estatística com recurso ao software SPSS STATISTIC v.22. Os parâmetros avaliados ecograficamente foram os seguintes: diâmetro e fluxo do folículo pré ovulatório e área e fluxo sanguíneo do CL maduro e ativo. Verificou-se a presença de uma relação direta entre o diâmetro e o fluxo do folículo pré ovulatório, tal como, a área e o fluxo do CL ativo e maduro. Observou-se a inexistência de correlação entre o fluxo folicular e luteal, ou seja, através da medição do fluxo do folículo pré ovulatório não podemos prever o fluxo do futuro CL. As éguas avaliadas neste estudo foram separadas em dois grupos (jovens <8 anos e velhas ≥8 de idade). Apenas se registou um aumento do fluxo sanguíneo do CL em éguas jovens quando comparado com o das éguas velhas, ($p < 0,05$). Podemos concluir que a US Doppler tem o potencial para avaliar a hemodinâmica ovárica, que aplicando à prática poderá contribuir para o aperfeiçoamento do manejo reprodutivo equino, obtendo melhor aproveitamento do material genético e aumentando o retorno financeiro.

O presente trabalho é pioneiro no estudo ecográfico com recurso ao Doppler do aparelho reprodutor das éguas Pura Raça Espanhola.

Palavras-chave: Color Doppler; Égua; Ovário, Reprodução; Ecografia; Fluxo sanguíneo

ABSTRACT

Doppler evaluation of ovarian hemodynamics in Pure Spanish Horse mare – A pilot study

Doppler ultrasound is a technology that has gained increasing expression in equine reproduction. Recent studies seek to understand in a more detailed way the physiology of the reproductive tract and to demonstrate that during the follicular maturation some characteristics are observable that only later can be visualized through the mode B. Currently the Doppler technology is widely known. However, there are no scientific studies yet to support its use in the daily equine breeding clinic. The objective of this study was to evaluate the hemodynamics of preovulatory follicles and corpus luteum (CLs), using the Doppler technique in Spanish Horses mares. In this study 15 mares were used between the ages of 4 and 19 years. The ultrasound images obtained were analyzed with the Image Color Summarizer software, which allows the quantification of the pixels of each image. Subsequently, statistical analysis was performed using SPSS STATISTIC v.22 software. The parameters evaluated were the following: pre-ovulatory follicle diameter and flow and area and blood flow of mature and active CL. The presence of a direct relationship between the diameter and the blood flow of the pre-ovulatory follicle, such as the area and blood flow of active and mature CL, was verified. It was observed the lack of correlation between the follicular and luteal flow, that is, by measuring the pre-ovulatory follicle flow we cannot predict the flow of the CL future. The mares evaluated in this study were separated into two groups (young <8 years and old ≥ 8 age). There was only an increase in LC blood flow in young mares when compared to that of old mares, ($p < 0.05$). We can conclude that US Doppler has the potential to evaluate ovarian hemodynamics, which in practice can contribute to the improvement of equine reproductive management, obtaining better use of genetic material and increasing financial return.

The present study is a pioneer in the ultrasound study using the Doppler of the reproductive tract of the PRE mares.

Key words: *Color Doppler; Mares; Ovary; Reproduction; Ultrasound; Blood flow*

ÍNDICE

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	1
I. INTRODUÇÃO.....	4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1. Ciclo éstrico da égua	6
1.1. Sazonalidade	6
1.2. Anestro.....	6
1.3. Estro.....	8
1.4. Diestro.....	12
2. Princípios da Ultrassonografia.....	13
2.1. Princípios do Doppler	14
3. Exame transretal do aparelho reprodutor feminino.....	16
3.1. Avaliação do estado funcional uterino	17
3.2. Avaliação ovárica	18
3.3. Determinação de folículos pré ovulatórios.....	20
3.4. Diagnóstico auxiliar de alterações na ovulação	21
3.5. Determinação de folículos anovulatórios.....	21
3.6. Avaliação do estado funcional do corpo lúteo.....	23
3.7. Diagnóstico de gestação e viabilidade embionária	24
4. Vantagens do Doppler na avaliação da atividade ovárica.....	26
5. Desvantagens do Doppler na avaliação da atividade ovárica.....	26
III. UTILIZAÇÃO DE DOPPLER NA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA OVÁRICA DE ÉGUAS PURA RAÇA ESPANHOLA – ESTUDO PILOTO.....	27
1. Objetivos do estudo.....	27
2. Material e métodos.....	27
3. Resultados	31
3.1. Parâmetros avaliados em todas as éguas incluídas no estudo.....	31
3.2. Correlações verificadas entre os parâmetros estudados	32
3.3. Análise univariada de variância relativamente aos grupos de idades	34
3.3.1. Variável dependente: Fluxo Folicular.....	34
3.3.2. Variável dependente: Diâmetro Folicular	34
3.3.3. Variável dependente: Fluxo do CL	35
3.4. Regressões lineares.....	37
3.4.1. Fluxo e Diâmetro Folicular.....	37

3.4.2. Fluxo e Área do CL	39
IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	43
1. Folículos pré ovulatórios	43
2. Corpos Lúteos maduros e ativos	44
3. Comparação de FHA com CL funcional	45
V. CONCLUSÕES.....	46
VI. BIBLIOGRAFIA.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Radiografia do boleto do membro posterior esquerdo.....	2
Figura 2 – Inseminação intrauterina profunda.....	2
Figura 3 – Castração em condições de campo	3
Figura 4 – Equipa veterinária do VII Raid Hípico Ciudad Carmona (Sevilha).....	3
Figura 5 – Execução de um exame ecográfico na Coudelaria Cárdenas (arquivo pessoal, 2017)	28
Figura 6 – Número de horas de sol registadas na Província de Sevilha no ano 2015. Fonte: INE, Boletín Mensuale de Estadística, Novembro 2016.....	29
Figura 7 – Representação gráfica dos fluxos do folículo pré ovulatório e do CL maduro medidos nas éguas de Pura Raça Espanhola inseridas no estudo	33
Figura 8 – Imagem representativa de folículos pré ovulatórios, obtidas no momento da indução da ovulação, recorrendo à ecografia color Doppler. Estas imagens ecográficas foram recolhidas de distintas éguas.....	33
Figura 9 – Imagem representativa de CLs ativos 5 dias após a ovulação. Estas imagens ecográficas foram recolhidas de distintas éguas.....	33
Figura 10 – Gráfico representativo da influência do grupo etário (éguas jovens e velhas) nos parâmetros ecográficos avaliados neste estudo	36
Figura 11 – Representação gráfica da reta de regressão linear existente entre o fluxo sanguíneo e o diâmetro folicular	38
Figura 12 – Representação gráfica da reta de regressão linear existente entre a área de o fluxo do CL.....	40
Figura 13 – Imagem representativa do mesmo CL em power doppler e em color doppler ...	41
Figura 14 – Imagens representativas de FHA, com recurso à ecografia Doppler.....	42
Figura 15 – Imagens representativas de um FHA (lado esquerdo) e de um CL (lado direito), com recurso à ecografia Doppler	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das possíveis apresentações de anestro. Adaptação de (McKinnon et al., 2011)	8
Tabela 2 – Sistema de medição utilizado para avaliar o grau de edema uterino em éguas na Universidade do Colorado, USA. Adaptação de (McKinnon et al., 2011)	17
Tabela 3 – Sequência de alterações verificadas após a avulsão e respectivas características. Fonte: Sarah Boland, Early pregnancy diagnosis – embryo, cyst or twin?, 51st BEVA congress, 2012	25
Tabela 4 – Resultados obtidos de todos os parâmetros ecográficos avaliados e estatística descritiva (média, máximo, mínimo e desvio), no grupo de éguas Pura Raça Espanhola.	31
Tabela 5 – Correlações existentes entre os quatro parâmetros ecográficos avaliados no estudo, onde se indicam as diferenças significativas a negrito	32
Tabela 6 – Análise de variância do fluxo folicular em éguas Pura Raça Espanhola	34
Tabela 7 – Análise de variância do diâmetro folicular em éguas Pura Raça Espanhola.....	34
Tabela 8 – Análise de variância do fluxo do CL em éguas Pura Raça Espanhola.....	35
Tabela 9 – Análise de variância da área do CL em éguas Pura Raça Espanhola	35
Tabela 10 – Cálculo da regressão linear existente entre as variáveis fluxo e diâmetro folicular	37
Tabela 11 – Análise estatística ANOVA entre as variáveis fluxo e diâmetro folicular	37
Tabela 12 – Cálculo dos coeficientes do diâmetro folicular (variável independente)	38
Tabela 13 – Cálculo da regressão linear existente entre as variáveis fluxo sanguíneo e área do CL.....	39
Tabela 14 – Análise estatística ANOVA entre as variáveis fluxo sanguíneo e área do CL ...	39
Tabela 15 – Cálculo dos coeficientes da área do CL (variável independente)	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACL	Área do corpo lúteo
CF	Color-Flow Doppler
CL	Corpo lúteo
DF	Diâmetro folicular
EDV	Pico diastólico
FCL	Fluxo do corpo lúteo
FAP	Folículo anovulatório persistente
FF	Fluxo folicular
FHA	Folículo hemorrágico anovulatório
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IV	Intra venosa
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PF	Power-Flow Doppler
PI	Índice de pulsabilidade
PSV	Pico sistólico
RECM	Raíz quadrada média
RI	Índice de maior resistência
TAMV	Fluxo de maior velocidade

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

A realização do Estágio Curricular insere-se no Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e teve como objetivos a aprendizagem, o treino, e o aprofundamento de conhecimentos na área da medicina de equinos.

A presente Dissertação de Mestrado resulta do estágio curricular desenvolvido na empresa Gen-Ova Veterinaria, S.L.

Após ter realizado alguns estágios extracurriculares em hospitais equinos de referência (Hospital Equino da Universidade de Barcelona, Hospital Equino da Universidade de Córdoba, Hospital e Centro de Reabilitação Equino Kawell – Buenos Aires, Hospital Equino de San Vicente de Raspeig – Alicante e Hospital Equino da Universidade de Vienna) considerado relevante tomar conhecimento da realidade da clínica de campo atualmente exercida.

O estágio decorreu do dia 1 de Setembro de 2016 até ao dia 30 de Abril de 2017, em que a aluna pode acompanhar o trabalho diário de clínica ambulatória realizado pelos veterinários Francisco Requena e Fernando Requena nas províncias de Córdoba, Sevilha, Cadiz e Málaga (Espanha).

A aluna teve a possibilidade de participar diretamente nas seguintes atividades:

- Reprodução equina (diagnóstico e controlo de gestação; diagnóstico e tratamento de doenças do trato reprodutivo de éguas; extração, avaliação e conservação de sémen; inseminação artificial com sémen refrigerado e congelado)
- Diagnóstico e tratamento de claudicações (ecografia de tendões/tecidos moles, radiologia digital direta, bloqueios regionais, aplicação de Plasma Rico em Paquetas)
- Exames em ato de compra
- Veterinário de provas equestres: Raid e Concurso de Obstáculos (controlos veterinários e tratamentos)
- Cirurgias de campos (castrações)
- Odontologia



Figura 1 – Radiografia do boleto do membro posterior esquerdo



Figura 2 – Inseminação intrauterina profunda



Figura 3 – Castração em condições de campo



Figura 4 – Equipa veterinária do VII Raid Hípico Ciudad Carmona (Sevilha)

I. INTRODUÇÃO

O controlo das estruturas ováricas permite identificar a fase do ciclo reprodutivo em que a égua se encontra, sendo fundamental para obter sucesso na época reprodutiva. É de extrema importância conhecer a história completa do aparelho reprodutor e efetuar um exame ginecológico detalhado. O exame do aparelho reprodutor (ovários e útero) efectua-se com recurso à ecografia, por via transretal.

O ciclo éstrico da égua tem em média a duração de 21 dias (podendo variar entre os 19 e os 25 dias), estando dividido em diestro (fase lútea), que tem a duração aproximada de 14 dias (podendo variar dos 12 aos 16 dias), e estro, que dura aproximadamente 7 dias (podendo variar entre os 5 e os 9 dias) (Aurich, 2011).

O exame ecográfico dos ovários da égua é bastante útil e avalia em tempo real as estruturas foliculares e luteínicas. Ecograficamente, os folículos são estruturas circulares preenchidas de líquido anecogénico dentro do estroma ovárico (Carnevale & Olsen, 2011). Para o correcto controlo folicular é fundamental o conhecimento das três fases do desenvolvimento folicular (Beg & Bergfelt, 2011):

1ª: Fase de crescimento comum. Verifica-se o aumento do estrogénio e a diminuição da progesterona;

2ª: Fase dominante. Estabelece-se a dominância de um ou dois folículos, quando atingem aproximadamente 22 mm (aproximadamente no 15º dia do ciclo éstrico), migram para o local da ovulação (fossa da ovulação) e os restantes folículos existente no ovário cessam o crescimento e regridem;

3ª: Fase pré-ovulatória. O folículo dominante atinge o seu tamanho máximo e verificam-se alterações na morfologia e na fisiologia do folículo.

A avaliação morfológica do folículo (tamanho, forma e fluxo sanguíneo) em conjunto com o grau de edema uterino devem ser cuidadosamente avaliados para que se possa determinar o momento em que irá ocorrer a ovulação.

Um a três dias antes da ovulação o folículo pré ovulatório sofre um aumento progressivo da espessura da parede folicular devido à expansão da camada celular da granulosa, observa-se uma banda anecogénica proeminente na zona da teca folicular e verifica-se um aumento do fluxo sanguíneo. Contudo, através da ecografia Doppler, quatro horas antes da ovulação regista-se uma diminuição do fluxo sanguíneo do folículo pré ovulatório (Gastal et al., 2006a; Aurich, 2011; Carnevale & Olsen, 2011).

Em reprodução equina, a deteção precisa e atempada do momento da ovulação é de grande importância pelas seguintes razões: para assegurar que a ovulação ocorreu no espaço de tempo estimado após a ovulação; para saber quando é o melhor momento para inseminar com sémen congelado (espermatozóide com tempo de vida curto); para determinar a idade precisa de um embrião para proceder à manipulação adequada (lavagem e recolha);

determinar o número de ovulações em relação ao número de folículos pré-existentes, de modo a proceder com o manejo adequado em casos de gémeos; para assegurar a ocorrência da ovulação, permitindo assim detetar possíveis casos de folículos anovulatórios (Cuervo-Arango & Newcombe, 2013).

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ciclo éstrico da égua

1.1. Sazonalidade

Devido à pressão evolutiva que se verificou ao largo do tempo, a maioria das espécies que habitavam zonas que sofriam grandes diferenças de temperaturas desenvolveram mecanismos que lhes permitiram adaptar-se às alterações ambientais verificadas na Terra ao longo das décadas. Deste modo, desenvolveram-se sistemas de ciclos circadianos que utilizam as alterações no fotoperíodo para ajustar a homeostase de vários órgãos.

Nas éguas, o ritmo circadiano é regulado pelas alterações registadas no fotoperíodo. Este sinal ambiental é transformado em sinal endócrino na glândula pineal, que secreta melatonina durante a fase de escuridão. Nesta espécie, os dias curtos e as noites longas são associados à diminuição de secreção de gonadotrofinas e consequente diminuição na atividade ovárica (McKinnon, Squires, Vaala, & Varner, 2011).

1.2. Anestro

O anestro é definido como período em que a égua se encontra recetiva ao garanhão, ou seja, ausência de manifestação de estro. Geralmente, não se espera que a égua esteja em anestro a não ser que esta não mostre nenhum sinal de cio num mínimo de 21 dias, ou durante um ciclo éstrico inteiro (Ginther, 1992). O crescimento folicular é mínimo, apenas alguns folículos registam um diâmetro máximo de 16 mm, nunca chegando a haver um folículo dominante. A reduzida concentração de LH circulante contribui para o reduzido crescimento folicular. Contudo, devido à presença de FSH podem-se distinguir ondas foliculares durante a estação anovulatória (Donadeu & Watson, 2007).

Alternativamente, o anestro pode ocorrer na presença de um ciclo ovárico normal, com desenvolvimento folicular e ovulação. Assim, o primeiro passo para o diagnóstico da causa do anestro deve envolver uma avaliação ginecológica detalhada e completa.

Anestro com atividade ovárica

A ausência de retorno ao estro é o primeiro sinal de gestação. As éguas gestantes apresentam ondas foliculares características durante os primeiros meses de gestação e possuem também, no mínimo, um corpo lúteo (CL) ativo. Após o desaparecimento de todas as estruturas lúteas, por volta dos 180 dias de gestação, os ovários regridem e tornam-se inactivos mantendo-se nesse estado até ao momento do parto (Ginther, 1992).

A presença de níveis elevados de progesterona (P4) em circulação sanguínea, que pode ser proveniente de estruturas lúteas ou da unidade feto-placentária, podem ser suficientes para manter a égua como se estivesse em estado de diestro permanente. Por rotina, o CL pode ser visualizado com recurso a um exame ecográfico transretal do trato reprodutor, contudo

existem exceções (Ginther, 1988). Concentrações de progesterona iguais ou superiores a 1 ng/mL geralmente mantêm a égua em anestro e causam exibição dos sinais típicos de anestro, tais como: comportamento agressivo perante o macho, orelhas para trás, expressão facial agressiva representada pela tensão dos músculos faciais, escoiceamento e movimentação agitada da cauda (Crowell-Davis, 2007). Sob a influência de uma elevada quantidade de progesterona, o cervix apresenta-se fechado, firme e alongado, e geralmente o útero apresenta tonus firme à palpação e ausência de edema (Ginther, 1992).

Se a concentração de progesterona continuar elevada no plasma sanguíneo, sabendo que a égua não se encontra gestante, a administração de uma dose luteolítica de prostaglanina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) causa a lise das estruturas lúteas, caso estas estejam presentes, e a égua deverá voltar ao estro nos 3-4 dias seguintes (Staempfli, 2011). Uma falha de retorno ao estro em 5-6 dias pode requerer uma segunda administração de $PGF_{2\alpha}$ e uma falha na resposta confirma uma fonte não luteínica produtora de elevada concentração de progesterona.

Anestro sem actividade ovárica durante a estação reprodutiva

As principais causas de anestro durante a estação reprodutiva são de índole nutricional atribuídas à lactação.

Anestro nutricional: apesar de as éguas com baixa conformação corporal demorarem mais tempo a ficar gestantes após parirem, e de terem períodos de anestro sazonal mais longos e profundos, podem eventualmente voltar ao estro (Gentry et al., 2002). Se éguas mais magras ou jovens iniciarem o ciclo éstrico normal, podem ficar gestantes e levar as suas gestações a termo.

Anestro de lactação: A grande maioria das éguas desenvolvem o cio do poldro aos 10 dias após o parto. O anestro em lactação ocorre apenas numa média de 3-4% de éguas paridas em boa condição corporal, podendo, contudo, verificar-se em mais de 16% se as éguas se encontrarem em baixa condição corporal (Heidler et al., 2004).

Assim, as éguas que apresentam uma baixa condição corporal no momento do parto têm uma maior probabilidade de entrar em anestro de lactação. Para além destas duas principais causas, também se pode verificar o anestro devido à introdução de implantes de GnRH, hipopituitarismo ou por causa idiopática.

Anestro		
Ovários pequenos e inactivos	Ovários activos	
- Anestro sazonal - Anestro nutricional/sazonal	Progesterona constantemente alta	Sem progesterona ou cíclica
- Anestro lactacional - Anestro após a ovulação - Hipopituitarismo - Administração de GnRH - Senescência - Idiopático	- Gestação - Retenção de tecido lúteo - Tecido luteínico ectópico ou tumor	- Comportamental - Insensibilidade ao estrogénio

Tabela 1 – Resumo das possíveis apresentações de anestro. Adaptação de (McKinnon et al., 2011)

1.3. Estro

A espécie equina é predominantemente monovulatória, sendo a ovulação dupla pouco frequente (7-25%). Durante a época reprodutiva, as éguas ovulam com intervalos de aproximadamente 22 dias, sendo 5-7 dias o período de estro (Aurich, 2011). O ciclo estrico pode ser dividido em duas fases, baseando-se na receptividade sexual (estro versus diestro) ou nas alterações fisiológicas (fase folicular versus fase lútea). Ambas as categorias são praticamente sobreponíveis relativamente ao comportamento demonstrado durante a primeira fase do estro e a fase folicular, tal como o comportamento verificado durante o diestro e a totalidade da fase lútea.

O comportamento característico durante o estro é estimulado pelo aumento dos níveis de estradiol, que pode ser sintetizado pelo folículo dominante na ausência de estruturas lúteas ativas ou sintetizado pelo córtex da adrenal, e inibido pela presença de progesterona (Aurich, 2011). A duração do estro está relacionada com o tamanho do folículo no final do diestro, com a taxa de crescimento do folículo dominante e com o tamanho final do folículo pré-ovulatório. Em regra, a ovulação ocorre nas 24-48 horas que antecedem o final do estro. Um aumento de progesterona proveniente do desenvolvimento do CL é responsável pelo fim do comportamento de estro. Os comportamentos de estro nem sempre indicam que a égua se encontra na fase folicular do ciclo estrico. Fêmeas em anestro sazonal, ovariectomizadas e gestantes já foram reportados sinais ocasionais de estro quando estimulada por um garanhão (Asa et al., 1980; Asa et al., 1983). Além do mais, as éguas subordinadas hierarquicamente podem inibir sinais de estro na presença de uma égua dominante (Crowell-Davis, 2007).

Segundo autores de referência, o comportamento normal de uma égua em estro caracteriza-se pelas seguintes reações: (McKinnon et al., 2011)

- Cauda levantada e arqueada ou desviada para um dos lados, expondo a região perineal
- Expressão facial caracterizada pelo relaxamento dos músculos faciais
- Eversão rítmica dos lábios e exposição do clitóris

- Urinar pequenas quantidades de urina e de uma forma passiva
- Orelhas relaxadas e mantidas para trás ou numa posição neutra
- Membros posteriores ligeiramente em abdução
- Joelhos e jarretes flexionados/fletidos
- “Abaixamento” da pelvis
- Inclinando-se para a porta
- Vocalização
- Comportamento calmo, não tentando morder nem agredir o garanhão.

Atualmente, o contacto com o macho não é frequente para a maioria das éguas. Também é de conhecimento geral que algumas fêmeas podem ter preferências por determinados machos, rejeitando outros. Estes fatores contribuem para que algumas éguas em estro não demonstrem os comportamentos característicos que seriam esperados neste período, quando em contacto com o macho (Aurich, 2011).

Desenvolvimento folicular e seleção do folículo dominante

Nas éguas ocorre um processo ativo de seleção folicular que limita o número de ovulações, na maioria dos estros, a um folículo exclusivamente. O mecanismo de seleção dos folículos envolve uma interação complexa e intimamente associada entre a gonadotropina pituitária e as hormonas ováricas. A onda folicular primária, ou a onda que culmina com a ovulação durante o estro, origina o diestro após a ovulação, com a duração aproximada de 7-8 dias, e um grupo de folículos emerge do reservatório (“pool”) de folículos mais pequenos durante um período de vários dias (Ginther et al., 2004).

Após emergirem, os folículos da onda têm uma fase de crescimento normal de aproximadamente 7-8 dias, na qual os folículos aumentam de tamanho de forma igual (cerca de 3 mm por dia). Os desvios ocorrem no final da fase do crescimento normal e representam a altura em que o folículo dominante continua a desenvolver-se. Em contrapartida, os folículos mais pequenos começam a diminuir.

A FSH é produzida pela glândula pituitária anterior e estimula o crescimento folicular inicial. Os folículos pequenos da onda folicular necessitam de FSH para o seu crescimento inicial e posterior desenvolvimento. De um modo geral, o futuro folículo dominante torna-se mais proeminente um dia antes dos restantes folículos da onda folicular. Consequentemente, este folículo será significativamente maior do que os restantes, no final da fase de crescimento. A concentração de FSH em circulação atinge um pico quando o folículo maior possui um diâmetro aproximado de 13 mm (Donadeu et al., 2004; Ginther et al., 2004).

O pico de estradiol ocorre 1-2 dias antes da ovulação (Ginther, 1992). A diminuição da concentração de estradiol antes da ovulação ocorre devido à luteinização das células da granulosa, que é refletida pela diminuição sincronizada do edema uterino. O estradiol-17 β é

responsável pelas mudanças físicas, endócrinas e comportamentais nas éguas. Algumas das alterações verificadas incluem o relaxamento do cérvix, estimulação pelo edema formado no útero, carácter mais marcado, aumento do volume das secreções uterinas, estimulação da pituitária para que liberte LH e indução do comportamento de estro.

A inibina é uma hormona glicoproteica produzida pelas células da granulosa do folículo dominante. Níveis elevados de estradiol induzem a produção de inibina a qual irá inibir a síntese de FSH (Medan et al., 1991; Roser et al., 1994). A principal função fisiológica da inibina é a supressão específica da secreção de FSH pela pituitária e, como tal, permitir o processo de seleção do folículo (Kretser & Robertson, 1993). Os níveis de inibina aumentam durante o estro, tendo o pico um dia após a ovulação e diminuindo até níveis basais durante o diestro (Medan et al., 1991; Roser et al., 1993).

A primeira onda folicular principal pode ocorrer precocemente durante a fase lútea, podendo originar um folículo anovulatório, mas apesar do aumento da concentração de progesterona verificado pode ocorrer a ovulação. O desenvolvimento de uma onda folicular anovulatória durante a fase lútea é um fenómeno único da espécie equina (Ginther et al., 2001).

O início do período de transição que ocorre na Primavera, entre o anestro estacional e o estro, é caracterizado pelo desenvolvimento de 1-3 ondas de folículos anovulatórios antes de que ocorra a ovulação (Aurich, 2011).

Previsão da ovulação

Ao sétimo dia após o início do ciclo éstrico verifica-se o desenvolvimento da onda folicular com a emergência do folículo dominante e regista-se o aumento da FSH. O décimo terceiro dia é marcado pelo desvio folicular, momento em que o folículo dominante (com 6 mm de diâmetro) começa a crescer uma média de 3 mm diários, até um diâmetro aproximado de 35 mm. Nesta altura a FSH começa a diminuir e há um aumento de estradiol-17 β e de inibina. Dois dias antes da ovulação, o diâmetro folicular atinge o seu plateau com cerca de 40 mm e estagna o seu crescimento, ocorrendo a sua maturação. Por último, por volta do vigésimo primeiro dia ocorre a ovulação, que desencadeia a luteinização das células da granulosa. Neste momento regista-se o aumento da LH, P4 e da vascularização da área do futuro CL (Ginther, 2008; Aurich, 2011). Os folículos pré-ovulatórios podem atingir um diâmetro igual ou superior a 55 mm, o que se verifica de modo sistemático em determinadas éguas (Cuervo-Arango & Newcombe, 2008).

Frequentemente, o folículo dominante passa de uma estrutura esférica a uma forma mais irregular, antes do momento da ovulação. Adicionalmente, o folículo fica mais deformável entre as 12h que antecedem a ovulação. A ecografia ou ultrasonografia (US) transrectal permite evidenciar um bordo ecogénico espessado à volta do folículo pré-ovulatório e a diminuição do edema uterino, que é detectado um dia antes da ovulação.

Durante a estação reprodutiva, a aproximação da ovulação é caracterizada pela diminuição da espessura da parede folicular, aumento da ecogenicidade das células da granulosa e aparecimento de uma camada anecogénica à volta do folículo. Estas alterações verificadas devem-se ao aumento do tamanho e do número das células da granulosa, pelo aumento do fluxo sanguíneo e edema da teca (Gastal, Gastal & Ginther, 1998)

Segundo autores de referência (McKinnon et al., 2011), os fatores que podem ser usados para prever a ovulação são:

- História prévia da égua
- Tamanho e raça da égua
- Tamanho do folículo
- Padrão do crescimento folicular
- Número de dias em estro
- Forma do folículo
- Tonus folicular
- Espessura do bordo folicular (determinado com recurso à US)
- Diminuição do edema uterino
- Administração de um agente indutor da ovulação
- Altura do ano

A maioria das éguas mantém uma dinâmica folicular própria de cada animal, seguindo um padrão de crescimento de folículos que atingem um diâmetro semelhante durante a maioria dos ciclos éstricos.

Dentro de uma raça, o tamanho do folículo na ovulação é menor em éguas mais velhas, éguas em pós-parto, éguas em transição e éguas com folículos dominantes múltiplos (Ginther, 1992). As éguas às quais se administra um agente indutor da ovulação, ovulam um folículo menor do que as que ovulam espontaneamente.

Utilização de hCG para induzir a ovulação

Para que a indução da ovulação seja efetiva, o estro deve ser confirmado pela presença de um folículo pré-ovulatório, apresentado este um diâmetro igual ou superior a 35 mm, e a presença de edema uterino (Camilo et al., 2004). Está demonstrado que a hCG induz a ovulação de uma forma efectiva em 36-48h após a sua administração (Squires, 2008).

Segundo um estudo realizado sobre o efeito da hCG na vascularização ovárica e folicular, comprovou-se que as éguas em que se administrou hCG (indutor da ovulação) não mostraram qualquer aumento no fluxo sanguíneo no folículo pré ovulatório, comparativamente com as éguas que ovularam naturalmente (Gastal et al., 2006d).

1.4. Diestro

O diestro é caracterizado pelo período de inatividade sexual entre dois períodos de estro.

O primeiro período de diestro do ano é um “evento de boas vindas” que ocorre após uma transição frustrante que a égua tem entre o anestro e o começo dos seus ciclos éstricos normais (Watson, Thomassen & Nikolakopoulos, 2002).

Está descrito como frustrante porque não existe maneira de acelerar o início dos ciclos éstricos normais uma vez que a transição começou. Isto aplica-se mesmo se a transição começar mais cedo do que o normal após o uso de um tratamento de luz.

Na prática, quando o exame ecográfico revela que as características ováricas típicas da transição (múltiplos folículos de tamanho pequeno-médio em ambos os ovários e uma ausência de estruturas luteínicas) o médico-veterinário informa o proprietário de que a égua deve ser examinada após um período de 2-3 semanas aproximadamente. Após esse intervalo, as éguas devem ser re-examinadas para verificar a evidência de uma ovulação (o começo do diestro), tal como a presença de um CL.

O CL atua como uma glândula endócrina temporária formada por fibroblastos e os restos celulares da granulosa do folículo recém ovulado. Esta estrutura é responsável pela produção de progesterona até ao 40º dia de gestação (Niswender et al., 2000), entre o 40º e o 100º dias de gestação a produção de progesterona necessária para a manutenção da gestação é da responsabilidade dos CLs secundário. Quando não se verifica a gestação, o CL regride em resposta à libertação de PGF2 α , proveniente do endométrio. Este fenómeno é registado 13-16 dias após a ocorrência da ovulação (Weems, Weems & Randel, 2006).

O exame de diagnóstico de gestação é realizado com recurso à US modo-B. Pode também colher-se uma amostra de sangue para medir a concentração de progesterona caso haja dúvidas na deteção de estruturas lúteas com recurso à ecografia. Caso a concentração de progesterona sérica seja superior a 2-3 ng/mL é indicativa da presença de um CL funcional (Ginther, 1992). No início da época reprodutiva (na Primavera), visualização de edema uterino através da US não é um indicador fiável da aproximação do momento da ovulação (Watson, 2002; Atayde e Rocha, 2010). Contudo, quando o ciclo éstrico está estabelecido (ao longo da estação reprodutiva), o edema uterino, representado por pregas individuais no endométrio, é uma indicação útil para prever o momento da ovulação (Miró, 2004). Durante o estro, a elevada concentração de estrogénios e a baixa concentração de progesterona contribuem para o aumento do edema da parede uterina, abertura do cérvix e relaxamento do útero e da vagina. Contrariamente, durante a fase lútea a parede do útero encontra-se levemente contraída e o cérvix firme e fechado. A ecotextura uterina apresenta-se homogénea e a presença de edema é inexistente (Aurich, 2011).

Por definição, uma égua em diestro possui um CL funcional. A concentração sérica de P4 aumenta para cerca de 1-2 ng/mL pouco depois da ovulação, até uma concentração máxima de 8-16 ng/mL quando o CL se encontra maduro. Aproximadamente 2 semanas após a

ovulação, a concentração de P4 começa a diminuir e alcança novamente uma concentração basal até ao começo do novo estro, aproximadamente 15-16 dias após a ovulação (Ginther, 1992). Geralmente as fêmeas não se encontram sexualmente recetivas durante o diestro. Contudo, segundo Ginther, a interface entre o diestro e o estro não é preto e branco, mas em tons de cinzento. Por exemplo, fêmeas com baixas concentrações de progesterona sérica podem ocasionalmente mostrar manifestações de estro (Ginther, 1992).

Utilização de prostaglandinas durante o diestro

No final do diestro, ocorre a luteólise devido à ação da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), o CL regride e geralmente ocorre o crescimento de novos folículos. Na tentativa de iniciar um novo ciclo éstrico mais rapidamente, procede-se à administração de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ que provoca a lise do CL maduro, permitindo assim que a égua retorne ao cio em 3-4 dias após o tratamento, e que ocorra a ovulação em 8-10 dias, diminuindo assim os dias entre ovulações (Staempfli, 2011). Este tratamento é efectivo quando aplicado 5 dias após a ovulação. O começo de um novo ciclo éstrico e a ovulação ocorrem aproximadamente 3-4 e 8-12 dias, respetivamente, após a administração desta substância. O intervalo entre ovulações depende do tamanho e estado dos folículos no momento da medicação. Quando coincide com a fase final de crescimento do folículo pré-ovulatório, a ovulação pode ocorrer 48 h após a injeção de $PGF_{2\alpha}$.

Assim, quando se tenta encurtar o ciclo éstrico da égua, o tratamento com prostaglandina deve ser administrado o mais cedo possível na fase lútea, não estando, contudo, indicada a sua administração antes do 5º dias após a ovulação (pois o CL ainda não está maduro, como tal será refratário ao tratamento)

A administração de prostaglandinas exógenas é vulgarmente usada para diminuir a duração do ciclo éstrico e pode ser usada com o objetivo de diminuir a probabilidade de endometrite após cobrição (Weems et al., 2006; Samper, 2005). A sua administração em doses únicas elevadas pode provocar a luteólise.

2. Princípios da Ultrassonografia

A ultrassonografia transrectal modo-B foi introduzida na década de 80, revolucionando o diagnóstico e a monitorização reprodutiva em éguas (Ginther, 2014). O modo -B, permite a representação das imagens numa escala de cinza, é usado não só para identificar e medir estruturas, mas também para diagnosticar doenças. Um método mais recente em medicina veterinária é o uso da ultrassonografia modo Doppler. Trata-se de uma ferramenta não invasiva associada à ultrassonografia convencional (modo-B) capaz de fornecer informações em tempo real sobre os aspectos hemodinâmicos dos vasos sanguíneos de diversos órgãos e a sua arquitetura vascular (Carvalho et al., 2008).

O exame reprodutivo ecoguiado não é uma técnica usada exclusivamente com o fim informativo, mas também como auxiliar na recolha de amostras, tecidos ou fluídos (como por exemplo, aspiração de oocistos, biopsia de tecido lúteo), e como “guia” para inserir substâncias medicamentosas ou material biológico (sémen) no interior do útero.

2.1. Princípios do Doppler

Em 1842, Johann Christian Doppler descreveu o efeito Doppler como a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objecto que se encontra em movimento, em relação ao observador (Cerri et al., 1998). Atualmente, a ultrassonografia doppler é considerada como uma das melhores técnicas não invasivas que permite avaliar a hemodinâmica uterina in vivo (Ginther, 2007).

O princípio da ultrassonografia doppler baseia-se na movimentação das células sanguíneas em relação ao transdutor, de forma que as alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representadas por imagens com cores e tonalidades específicas (Ginther, 2007). A extensão das cores pode ser calculada através da percentagem de tecido/estrutura com cor ou através de um software, que contabiliza o número de píxeis (Ginther, 2014).

A ultrassonografia doppler apresenta dois modos de ação distintos que permitem aceder ao fluxo sanguíneo. Um é o Espectral ou Pulsado, em que a variação da velocidade do fluxo sanguíneo é representada por um gráfico em forma de onda, onde se podem observar os indicadores de perfusão tecidual como o pico sistólico (PSV), o pico diastólico (EDV) e o fluxo de maior velocidade (TAMV). A razão das três velocidades medidas (PSV, EDV e TAMV) são calculadas para obter o índice de resistência e pulsatilidade (RI e PI). Os valores RI e PI podem variar de 0 a 4, sendo 0 a ausência de alteração e 4 o valor máximo. (Ginther, 2007). O outro modo é o Color-flow/Power-flow, com o qual a velocidade do fluxo sanguíneo pode ser visualizada pela intensidade dos píxeis (pontos) coloridos, do escuro para o claro, sendo que a cor escura indica baixa velocidade e a clara alta velocidade. O fluxo dirigido ao transdutor é codificado por vermelho e o fluxo que se afasta é codificado por azul (Ginther et al., 2004).

A medição adequada das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral depende da correta angulação (ângulo Doppler) entre o transdutor e o vaso sanguíneo avaliado (Ginther, 2007). Devido à grande tortuosidade das artérias, presentes no endométrio, ovários e útero, não é possível determinar os respetivos ângulos Doppler. Contudo, os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) não sofrem influência desta angulação, como tal são indicados para a avaliação espectral do trato reprodutivo das éguas (Silva, 2005; Ferreira et al., 2008; Ferreira, 2013; Ginther, 2014). O RI e PI apresentam uma correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, ou seja, o aumento do RI ou do PI indica um aumento da resistência e, conseqüentemente, a diminuição da perfusão vascular dos tecidos (Ginther, 2014).

O fluxo sanguíneo pode ser avaliado através de dois tipos de doppler: o “color-flow” (CF) e o “power-flow” (PF). O primeiro é representado por uma imagem com mais que uma cor, que não representa necessariamente o sangue arterial ou venoso, mas sim a direção em que o fluxo sanguíneo se desloca relativamente ao transdutor, ou seja, apresenta uma coloração caso o sangue se “aproxime” do transdutor e outra, caso o sangue se “afaste” do transdutor. O segundo, o PF doppler, é composto por uma única tonalidade de cor que varia de acordo com a quantidade de células sanguíneas em movimento e não depende do ângulo de incidência dos feixes de onda. No modo Power-Flow podem ser detetados vasos pequenos e/ou com fluxo muito lento, o que permite detetar possíveis alterações subtis da vascularização. É de frisar que a vascularização é graduada pela intensidade, quantidade e tamanho dos pixels coloridos (Ginther et al., 2007).

A imagem formada baseia-se diretamente na variação de frequências e na direção do fluxo sanguíneo, e no caso do CF doppler baseia-se também indirectamente com o ângulo em que incidem os feixes US. Atendendo a que a onda emitida pelo transdutor pode ser programada pelo operador, o melhor ângulo que se deve utilizar para obter uma melhor imagem doppler encontra-se entre os 30 e os 60 graus (Ginther et al., 2004). Para calcular a velocidade do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo recorre-se à mensuração dos índices doppler, pois são mais fidedignos para o cálculo da velocidade sanguínea, sendo estes índices: RI e PI. Quanto maior o índice de resistência menor a perfusão vascular e quanto maior o índice de pulsatilidade menor a perfusão sanguínea em tecidos distantes (Ginther et al., 2004).

Uso do doppler na exploração do trato reprodutor das fêmeas

A ultrassonografia color-Doppler começou a ser usada para avaliar a vascularização da parede folicular em éguas em 2004 (Gastal & Gastal, 2012). Os primeiros estudos com recurso à US Doppler baseavam-se em informações obtidas nas grandes artérias (ovárica, uterina e vaginal) responsáveis pela vascularização sanguínea do trato reprodutor da fêmea. Contudo, estudos mais recentes têm demonstrado a utilidade do exame US Doppler diretamente na estrutura alvo, como por exemplo, o endométrio, a parede folicular ou o CL, e em vasos mais pequenos (Silva, 2005; Silva, Gastal & Gastal, 2006; Ginther et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2011).

Atualmente, a US Doppler é a técnica mais usada que permite a avaliação do fluxo sanguíneo do CL durante o diestro e também após a administração de tratamentos hormonais (Castro et al., 2016), o que permite um conhecimento mais profundo da fisiopatologia reprodutiva de uma égua.

3. Exame transretal do aparelho reprodutor feminino

A avaliação transretal do tracto reprodutivo é frequentemente efectuada com recurso à ultrassonografia. Através da palpação podem-se obter algumas informações que não podem ser obtidas com facilidade através da ultrassonografia exclusivamente, sendo elas: avaliação do tónus uterino e do cérvix, consistência dos folículos ováricos, sensibilidade do ovário ao toque e pressão e deteção de quistos paraováricos. Após a ovulação, verifica-se um aumento do tónus uterino e do cérvix que se deve ao aumento da progesterona verificado nesta fase do ciclo éstrico (McKinnon et al., 2011).

Os folículos ováricos contêm líquido folicular amarelo alaranjado claro, que é representado ecograficamente por uma imagem negra (anecogénica). O exame ecográfico de uma égua em estro permite avaliar o crescimento folicular, alterações na forma, características da parede e do líquido folicular, e também avaliar o padrão de edema uterino.

O folículo dominante aumenta de diâmetro uma média de 3 mm por dia. O tamanho máximo folicular é frequentemente alcançado 1-2 dias antes da ovulação. A ovulação pode ser reconhecida por uma rápida diminuição do tamanho folicular, que se segue à visualização anterior de um folículo grande, e/ou à presença de uma estrutura colapsada (Ginther, 1988). Foi reportado que a ovulação ocorre durante um período inferior a 60 segundos (Townson & Ginther, 1987). Clinicamente, é vantajoso registar o tamanho dos folículos com mais de 30 mm em ambos os ovários, pois este procedimento permite ao operador o rastreio do crescimento folicular, monitorizar o número de ovulações e prever o potencial de gestação gemelar. É recomendável que todos os folículos com mais de 30 mm no momento da ovulação do folículo dominante sejam monitorizados durante 1-4 dias para determinar se não continuam o desenvolvimento e ovulam, ou regridem.

Após a ovulação, a cavidade do folículo enche-se de sangue, formando o chamado corpo hemorrágico. Através da US, este é inicialmente detetado como uma estrutura com um aro hiperecogénico e um centro hipocogénico-anecogénico que pode desenvolver fios de fibrina, como ocorre na coagulação. O corpo hemorrágico matura em corpo lúteo nos dias seguintes e torna-se mais ecogénico. A US pode também ajudar a diferenciar condições anormais do ovário, como folículos anovulatórios e tumores ováricos.

Assim, a US é uma parte fulcral do exame reproductivo. Éguas em estro, geralmente, apresentam edema no endométrio que é representado pela característica “roda de carro” ou “gomos de laranja”. O edema deve-se aos elevados níveis de estrogénio e baixos de progesterona. O padrão de edema muda durante a evolução do estro e são usados sistemas de pontuação para monitorizar os padrões de edema uterino (Samper & Pycocock, 2007). Os níveis de edema (ver Tabela 2) aumentam tipicamente com o crescimento do folículo dominante, atingindo o pico 1-2 dias antes da ovulação. Às 24 horas que antecedem a ovulação o edema desaparece, pois regista-se a diminuição de estrogénio e o aumento de

progesterona (Carnevale & Olsen, 2011). Em contrapartida, o útero da égua em diestro (fase lútea) aparece tubular e com ecogenicidade homogênea, desprovido de edema (Aurich, 2011).

É necessária uma interpretação cuidada na avaliação do edema uterino, pois alterações inflamatórias também podem causar edema. Um pequeno volume de fluido claro (não ecogénico) pode apresentar-se fisiológico no útero de uma égua “normal”, em estro. Contudo, um aumento de volume de líquido ecogénico é sugestivo de inflamação uterina. Ocasionalmente, este líquido pode não ser detetado facilmente antes que o edema uterino diminua.

Nível de Edema	Quantidade de Edema	Descrição
0	Inexistente	Sem presença de edema; pregas endometriais não são visualizadas individualmente.
1	Leve	Pregas endometriais facilmente observadas num padrão de lúmen “roda de carro”. Tipicamente no início do estro quando o folículo dominante se está a desenvolver ou mais tarde, antes ou durante a ovulação.
2	Moderado	Pregas endometriais com a espessura aumentada; Padrão de edema óbvio em todo o útero. Típico do meio do estro e geralmente representa o efeito do pico de estrogénio que ocorre 1-2 dias antes da ovulação.
3	Abundante	Pregas endometriais muito distendidas; grau exagerado de edema; não é típico de uma égua normal em estro. Pode estar associado a inflamação uterina.

Tabela 2 – Sistema de medição utilizado para avaliar o grau de edema uterino em éguas na Universidade do Colorado, USA. Adaptação de (McKinnon et al., 2011)

3.1. Avaliação do estado funcional uterino

Ferreira et al. (2008) demonstraram que para avaliar a perfusão sanguínea uterina em éguas deve ser usado o “power-flow”, pois a sua elevada sensibilidade permite a avaliação dos vasos de pequeno calibre e fraco fluxo sanguíneo, que não seriam detectados pelo “color-flow”. Está descrito que uma baixa perfusão uterina durante a fase lútea está associada a uma baixa taxa de concepção. (Bollwein et al., 2002).

Considerando as anomalias vasculares como potenciais causadores de alterações degenerativas do endométrio (Ferreira et al., 2008), as quais por sua vez estão relacionadas com os casos de subfertilidade em éguas, a US Doppler é uma ferramenta importante para o estudo da viabilidade endometrial, assim como da relação feto-maternal. Ferreira et al. (2008) demonstraram que a US Doppler é efetiva na avaliação da perfusão sanguínea do útero das éguas que apresentam ou não quistos uterinos. Neste estudo, observou-se que as regiões

quísticas apresentam menor perfusão sanguínea quando comparadas com regiões adjacentes não quísticas, sugerindo assim que a formação de quistos uterinos está relacionada com alterações verificadas na vascularização. Com etiopatogenia desconhecida, pensa-se que o fluxo sanguíneo uterino anormal contribui para a formação de quistos, devido ao retorno venoso diminuído e à degenerescência arterial presentes em determinado segmento uterino (Schoon et al., 1999). Segundo Silva et al. (2005), as éguas que não ficam gestantes apresentam baixa vascularização endometrial e constante durante os primeiros 15 dias após a ovulação.

3.2. Avaliação ovárica

Atualmente, a detecção precoce do início da actividade folicular e o controlo de todo o ciclo éstrico de uma égua é essencial para que se possa implementar um adequado manejo reprodutivo. Através da US Doppler, é possível determinar o potencial ovulatório de folículos dominantes durante o período de transição de Primavera (Acosta & Miyamoto, 2004). Isto porque as mudanças na hemodinâmica ovárica podem ser detetadas durante todo o desenvolvimento folicular e estão relacionadas com a remodelação do tecido ovárico e do sistema vascular responsável pela sua vascularização (Ginther et al., 2007c). O período de transição de Primavera, que antecede o início da atividade reprodutiva, é caracterizado pelo desenvolvimento de ondas foliculares anovulatórias. Durante esta fase, os folículos dominantes anovulatórios apresentam taxa de crescimento e dimensões semelhantes ao observado durante a estação reprodutiva. Contudo, um aumento progressivo da vascularização a partir da divergência folicular ocorre apenas em futuros folículos ovulatórios, enquanto que os folículos anovulatórios possuem baixa vascularização independentemente do seu diâmetro (Acosta et al., 2004). Acredita-se que esta vascularização diminuída dos folículos anovulatórios esteja relacionada com a baixa concentração de LH durante este período de transição (Ginther, 2003). A avaliação color Doppler do fluxo sanguíneo folicular tem sido usada como método eficaz para prever a viabilidade folicular (Gastal et al., 2006c; Ginther 2007d).

Nas éguas, a onda folicular inicia-se com uma fase de crescimento folicular. O folículo dominante começa a aumentar o seu aporte sanguíneo ao mesmo tempo em que aumenta a sua resposta às gonadotrofinas, para que se dê continuidade ao seu crescimento, mesmo com baixas concentrações de FSH, enquanto que os restantes folículos (subordinados) começam a regredir (Ginther, 2007d). A regressão dos folículos subordinados é favorecida por uma inadequada irrigação dos mesmos, que se inicia um dia antes do desvio folicular ser estabelecido (Acosta et al., 2004). O diâmetro máximo observado e a taxa de crescimento folicular não são bons indicadores do estadio ovulatório de folículos durante o período de transição, contrariamente à medição da irrigação sanguínea da parede folicular (Acosta et al., 2004).

Quando se inseminam éguas com sémen congelado torna-se imprescindível determinar a eminência da ovulação, permitindo assim que a introdução do sémen se realize o mais próximo possível, temporalmente, do momento da libertação do oócito. Assim, a determinação do momento da ovulação é uma ferramenta fulcral que permite diminuir a taxa de insucesso de gestação (Samper & Pycock, 2007). A US Doppler acrescenta novas informações quanto à maturação folicular final e à proximidade do momento da ovulação, sendo esta a técnica de excelência para prever o momento exato da ovulação. Segundo Gastal et al. (2006c), a vascularização folicular é máxima às 24h antes da ovulação e ocorre uma diminuição abrupta da perfusão sanguínea folicular durante as 4h que antecedem a ovulação.

Ginther (2007a) descreveu as alterações da perfusão sanguínea num folículo horas antes da ovulação, sendo que nas quatro horas que antecedem a ovulação a percentagem de fluxo sanguíneo registada pelo doppler diminuem. As células da granulosa alteram-se à medida que aumenta a vascularização da teca no lado oposto ao ápice do folículo. Esta região denomina-se a fossa ovulatória, local onde ocorre a rotura folicular. A ovulação é registada como um acontecimento lento e verifica-se uma boa vascularização no ápice folicular correspondente.

Acosta et al. (2004) realizaram um estudo com o fim de determinar as diferenças na vascularização folicular de um futuro folículo ovulatório e de um futuro folículo anovulatório durante o período de transição de anestro de Inverno para a fase de ciclicidade ovárica de Primavera. Verificaram que, através da US doppler, pode-se distinguir um folículo ovulatório de um anovulatório a partir dos 25 mm de diâmetro, devido à menor vascularização detetada no folículo anovulatório. Assim, a área vascular determinada pelos autores para um folículo ovulatório foi estimada entre os 0,48 e os 0,81 cm² e para um folículo anovulatório 0,12-0,81 cm².

Contudo, os folículos pré ovulatórios podem por vezes apresentar baixa perfusão sanguínea mesmo durante a estação reprodutiva. Silva et al. (2006) descreveram que existe uma relação entre uma vascularização elevada de folículos pré ovulatórios e maiores taxas de gestação, ainda que não existam estudos suficientes que suportem esta hipótese. Sabe-se que tanto folículos pré ovulatórios com elevada vascularização como folículos com menor/baixa vascularização dão origem a CLs funcionais e semelhantes (Romano et al., 2012). Assim, pode-se concluir que a vascularização do futuro folículo ovulatório não está relacionada com a posterior função secretora do CL.

O crescimento e a vascularização folicular parecem mutuamente dependentes. O aporte sanguíneo necessário/suficiente representa o componente mais importante na regulação da função das células foliculares e contribui para o crescimento e maturação do folículo (Mattioli et al., 2001).

3.3. Determinação de folículos pré ovulatórios

As alterações ecográficas podem ser detetadas através da alteração da ecotextura, da escala de cinzentos e do sinal color-Doppler um ou dois dias antes do crescimento/desvio do diâmetro folicular em éguas (Acosta et al. 2004).

A perda da forma esférica do folículo pode ser detetada a partir dos três dias que antecedem a ovulação. Contudo, este fenómeno verifica-se com maior frequência entre as 24 e as 12h antes da ovulação (Gastal EL, Gastal MO & Ginther, 1998). Em estudos mais recentes, confirmaram que a alteração na forma do folículo deve-se à diminuição de turgescência e que se verifica maioritariamente entre as 24-12h (Gastral EL, Gatral MO & Ginther, 2006a) . É importante referir que estes dois parâmetros (forma do folículo e turgescência) são algo subjetivos, pois a sua interpretação pode variar de operador para operador consoante a pressão exercida por cada indivíduo e também se podem registar variações com o uso de sondas diferentes.

Indicadores de ovulação eminente (Gastal et al., 1998, 2006c; Ginther OJ, Gastal EL & Gastal MO, 2007e):

1. Diminuição da turgescência do folículo sob a pressão da sonda;
2. Perda da esfericidade do folículo e invaginação da parede folicular (forma de pêra);
3. Fragmentação da granulosa
4. Formação da fossa ovulatória, representada pelo aparecimento de uma formação cónica ou protusão do folículo em forma de mamilo;
5. Diminuição da espessura e aumento da ecogenicidade da parede folicular (granulosa);
6. Pontos hiperecogénicos em suspensão no antro folicular

Nenhum dos parâmetros ecográficos, (modo-B) antes referidos, detetados isoladamente pode ser indicador da primeira ovulação da estação reprodutiva. Contudo, a diminuição da espessura da granulosa, a perda da esfericidade e o aumento da ecogenicidade da parede folicular, associados com a diminuição de número de folículos entre >15 mm e < 3 mm de diâmetro representam 44-67% da proximidade da primeira ovulação da estação reprodutiva, que deverá ocorrer 1-9 dias após o aparecimento das características mencionadas (Atayde & Rocha, 2010).

Está descrito que existe uma correlação significativa entre o diâmetro de um folículo pré ovulatório durante os 3 dias que antecedem a ovulação nas “ondas” espontâneas e o diâmetro máximo do folículo pré ovulatório em ondas induzidas (Ginther et al, 2009; Jacob et al., 2009). Os folículos pré ovulatórios em equinos atingem geralmente os 40-45 mm no dia anterior à ovulação, existindo contudo pequenas variações consoante a raça. O crescimento do folículo pré ovulatório é de aproximadamente 3 mm por dia, antes da paragem ou regressão no

crescimento (Ginther, 1995). Contudo, existem diferenças no diâmetro dos folículos pré ovulatórios entre raças e tipos de fêmeas que vão influir no manejo reprodutivo.

Quando o momento da ovulação se aproxima, pode-se visualizar uma protuberância no ápex folicular (na fossa de ovulação) através da realização de uma laparoscopia (Gastal & Gastal, 2012) ou mediante um exame ecográfico (Gastal et al., 2006b). O ápex possui paredes finas e uma porção relativamente avascular do folículo pré ovulatório que separa a bolsa de fluido infundibular do antro folicular (Ginther et al., 2007d; Gastal et al., 2006b).

Num estudo de Gastal & Gastal (2012), foi confirmada a hipótese de que uma maior vascularização do folículo pré ovulatório está associado a um maior diâmetro folicular, a maiores taxas de maturação do oócitos e maior qualidade dos mesmos, e maiores taxas de gestação (Silva et al., 2006).

3.4. Diagnóstico auxiliar de alterações na ovulação

Durante a ovulação e conseqüente à ruptura da parede folicular, ocorre o extravasamento do fluido folicular e libertação do oócito (Ginther, 1995). A ovulação septada é um fenómeno atípico observado em éguas. Com duração superior a 3h, a sua incidência ao longo de uma estação reprodutiva é de aproximadamente 19% (Ginther et al., 2007a). A etiologia desta anomalia é desconhecida, contudo, sabe-se que se encontram envolvidos alterações na hemodinâmica folicular na fase pré-ovulatória (Ginther, 2007). Ginther et al. (2007a) descreveram que os folículos que ovulam lentamente, com presença de compartimentos septados, apresentam uma vascularização proeminente em todo o seu perímetro, inclusive no ápice folicular. Enquanto que numa ovulação normal, verifica-se que a perfusão sanguínea diminui poucas horas antes da ovulação e concentra-se na base do folículo (Gastal et al., 2006b).

O FHA é a estrutura decorrente da falha na ovulação, seguida pela formação de um hematoma no antro folicular das éguas (Ginther & Pierson, 1984). De forma semelhante ao observado em casos de ovulação septada, o futuro FHA apresenta intensa vascularização ao longo do seu perímetro (Ginther et al., 2006 b). Pode resultar em ciclos inférteis e apresentar elevada incidência de repetibilidade (Ginther, 2007d), como tal o seu diagnóstico precoce é de extrema importância para tomar as decisões mais correctas considerando a possibilidade de sucesso reprodutivo e a componente económica.

3.5. Determinação de folículos anovulatórios

O período de transição do anestro sazonal caracteriza-se pelo retorno da atividade ovárica, na Primavera, e sendo uma fase do ciclo éstrico em que se torna difícil prever o momento da ovulação. Nesta fase, são características as ondas foliculares múltiplas e existência de múltiplos folículos com diâmetro superior a 35 mm, os quais nunca chegam a ovular e regredem de tamanho (Ginther, 1992; McKinnon et al., 2011). Com o recurso à US Doppler,

Acosta et al. (2004), demonstraram que os folículos anovulatórios dominantes, característicos do período de transição estacional, possuem menor fluxo sanguíneo do que os folículos pré-ovulatórios da estação reprodutiva.

Segundo a bibliografia, a incidência de falha da ovulação varia entre os 3,1 e os 8,2%, podendo ocorrer dois tipos de folículos anovulatórios: folículo anovulatório persistente (FAP) e folículo hemorrágico anovulatório (FHA). Nos FAP não ocorre a luteinização, os folículos permanecem várias semanas aumentando e diminuindo de diâmetro e, eventualmente, acabam por regredir espontaneamente (McCue & Ferris, 2011). Nos FHA a falha de ovulação provém de uma hemorragia no antro folicular pré-ovulatório. Através o exame ecográfico modo B é impossível diferenciar um folículo pré-ovulatório que irá transformar-se num FHA um dia antes da suposta ovulação. Apenas no dia da presumível ovulação, se pode verificar a presença de pontos hiperecogênicos flutuantes no interior do antro folicular e a ausência da ovulação. Nos dias seguintes, ocorre o aumento da ecogenicidade do conteúdo e aumento da espessura da parede, atingindo um diâmetro bastante superior ao do anterior folículo pré-ovulatório. Ginther (2007a) afirma que só é possível distinguir os dois folículos, dias antes da ovulação, através da técnica ecográfica Doppler, pois o FHA possui maior vascularização na parede folicular.

Os folículos hemorrágicos anovulatórios (FHAs) provêm de uma falha na ovulação, seguida da formação de um hematoma no antro folicular. Geralmente, a incidência de FHAs é maior durante os meses de intensa actividade ovárica e em éguas medicadas com hormonas indutoras de estro e ovulação (por exemplo, prostaglandinas e GnRH/hCG, respetivamente) (Cuervo-Arango & Newcombe, 2013). Apesar da presença de FHAs ser mais frequente durante a estação não reprodutiva, estes também podem ser encontrados na estação reprodutiva, especialmente em éguas de idade avançada e com maior incidência no início ou final da estação reprodutiva (Ginther et al., 2008). Devido a serem uma importante causa de subfertilidade em equinos, os FHAs devem ser diagnosticados precocemente, evitando-se gastos desnecessários com a preparação da égua (por exemplo, tratamento de endometrites) e a aquisição de sêmen (Ferreira & Meira, 2011).

Segundo Ginther et al. (2007c), os FHAs possuem vascularização proeminente ao longo de todo o seu perímetro durante os dias que antecedem a sua formação. Contudo, os futuros folículos ovulatórios também podem apresentar elevada vascularização no momento que antecede a ovulação (Acosta et al., 2004), o que dificulta a diferenciação de ambas as estruturas recorrendo à ecografia modo-B. Em contrapartida, a US Doppler auxilia na determinação do melhor momento para o tratamento dos FHAs. Os FHAs tendem a reorganizarem-se e originam estruturas semelhantes a CLs maduros. Como tal, quando apresentam características morfoecogénicas e vasculares semelhantes às dos CLs funcionais respondem a tratamentos luteolíticos.

3.6. Avaliação do estado funcional do corpo lúteo

A US Doppler tem sido extensamente usada também na avaliação do fluxo sanguíneo do CL (Ginther, 2007b). É conhecido que uma boa vascularização do CL é essencial, pois serve de substrato para a biossíntese de progesterona e secreção de outras hormonas estreróides. Assim, a circulação sanguínea é fundamental para que o CL mantenha as suas propriedades funcionais (Bollwein et al., 2002).

Após a ovulação, a vascularização do CL inicia-se na área basal e vai-se extendendo até à área apical, sendo completada em 5-6 dias. Quando a progesterona atinge seu pico máximo, aos 8 dias após a ovulação, esta começa a diminuir paralelamente à área do CL, levando em consideração que a área de fluxo sanguíneo diminui mais lentamente do que a concentração de progesterona no período de luteólise (Ginther, 2007c). Segundo Bollwein et al. (2002), a vascularização do CL durante o ciclo éstrico atinge o seu nível máximo no quinto dia pós ovulação, sendo que o fluxo começa a diminuir no meio do diestro, anteriormente ao decréscimo das concentrações plasmáticas de progesterona.

Considerando que o desenvolvimento, regressão e funcionalidade do CL estão estritamente relacionados com o rápido desenvolvimento e regressão de um extenso sistema vascular local, seria de esperar que a US Doppler fosse uma ferramenta importante para a avaliação do estadio funcional do CL. Num estudo realizado há uma década foi caracterizada a relação existente entre a perfusão sanguínea e o desenvolvimento estrutural e funcional do CL (Ginther et al., 2007c).

Após a ovulação, a perfusão sanguínea do CL aumenta progressivamente até envolver praticamente toda a área ao quinto dia após a ovulação. Durante este período, a progesterona (P4) também aumenta progressivamente. Entre os 8º e 14º dias, o perfil sérico de P4 e a perfusão vascular do CL apresentam valores máximos. Já durante a luteólise, a vascularização do CL diminui, tal como a concentração de P4 (Acosta et al., 2002; Miyamoto et al., 2005; Ginther et al., 2008). Desta forma, a US Doppler pode ser utilizada na avaliação do estado funcional do CL, sendo essa informação importante para a seleção de receptoras no momeno da involução e, posteriormente, realizar uma adequada monitorização gestacional.

O Doppler “color-flow” foi descrito como um meio rápido de avaliação da função do CL, pois a área ocupada pelo fluxo sanguíneo de um CL está diretamente correlacionada com a concentração de progesterona (P4) circulante, durante o ciclo éstrico. No manejo reprodutivo diário, a concentração de P4 plasmática é raramente avaliada, pois implica um aumento de custos e é mais demorosa (Brogan, 2016; Miró, 2015).

3.7. Diagnóstico de gestação e viabilidade embionária

Regra geral, o primeiro diagnóstico de gestação com recurso à US modo B efectua-se aos 14-17 dias após a ovulação. Caso o primeiro diagnóstico seja positivo, deve voltar a realizar— se um segundo diagnóstico entre os dias 30º e 45º de gestação. Esta re-examinação é fundamental pois a incidência de reabsorção embrionária varia entre 5 a 15% (Vanderwall, 2011) e ocorre entre os dias 14º e 40º de gestação.

Em éguas, regista-se um aumento acentuado do fluxo sanguíneo uterino durante as duas primeiras horas e a oitava após a inseminação artificial. Pensa-se que este fenómeno esteja relacionado com o transporte espermático e o processo de limpeza uterina (Ferreira et al., 2015). Para além da motilidade espermática normal, as contrações miométriais são imprescindíveis para que os espermatozóides sejam transportados até ao local de fertilização durante as primeiras horas após a introdução do sémen no aparelho reprodutor feminino (Troedsson et al., 1998). Além do mais, após a cobrição ocorre um processo inflamatório fisiológico e transitório que tem como objectivo eliminar o sémen excedente, detritos celulares e possíveis agentes contaminantes do trato reprodutivo da égua (Troedsson, 1999).

Silva et al. (2005), afirmam que tanto as éguas gestantes como as não gestantes apresentam semelhanças na baixa vascularização endometrial nos oito primeiros dias após ovulação. Contudo, a entre o 11º e o 13º dia após a ovulação deteta-se o aumento da perfusão vascular no corno uterino que possui o embrião móvel (Ginther, 2014).

O diagnóstico de gestação numa égua pode ser realizado aos 11 dias após a ovulação, momento em que já é possível a visualização de uma vesícula embrionária, contudo a vesícula embrionária ainda possui mobilidade intrauterina, o que obriga a uma exploração minuciosa para que se evitem falsos negativos. Na seguinte tabela estão esquematizadas as fases de evolução de uma vesícula embrionária considerada normal.

Dias após a ovulação	Tamanho aproximado da vesícula	Características da vesícula
11 (em 89% das éguas)	4,8 mm	Conteúdo anecogénico e forma esférica; vesícula com elevada mobilidade; crescimento diário = 1,5 mm
12	8 mm	Continua com a forma esférica e elevada mobilidade
12-16		Mesmas características anteriormente registadas e crescimento diário: 3,5 mm
14	14-18 mm	
16		Fixação da vesícula na junção corno-corpo uterino
21		A vesícula torna-se irregular e pode ser confundida com líquido intraluminal ou um quisto. O útero deve apresentar um ligeiro edema

Tabela 3 – Sequência de alterações verificadas após a ovulação e respetivas características. Fonte: Sarah Boland, Early pregnancy diagnosis – embryo, cyst or twin?, 51st BEVA congress, 2012

Os batimentos cardíacos podem ser detetados no 23º dia após a ovulação, estando apenas totalmente definidos no 26º dia, altura em que o embrião apresenta aproximadamente 8 mm de comprimento. Neste momento é de extrema importância verificar se apenas existe a presença de batimentos cardíacos numa das partes, sendo deste modo possível descartar uma gestação gemelar/dupla. Por volta do dia 32, o embrião atinge um tamanho aproximado de 12 mm.

4. Vantagens do Doppler na avaliação da atividade ovárica

- Avaliar o potencial ovulatório de folículos >30 mm durante a estação reprodutiva de transição (Acosta et al., 2004).
- Prever o momento da ovulação
- Avaliar a aptidão do endométrio para receber o embrião. As alterações do fluxo sanguíneo endometrial acompanham as mudanças de localização do embrião (Ginther & Matthew, 2004)
- Evitar os falsos positivos, pois permite diferenciar com maior clareza uma vesícula embrionária de 11-14 dias de um quisto endometrial. Em caso de dúvida, a vesícula embrionária pode ser distinguida pela presença de mobilidade, pelo crescimento contínuo e a presença de fluxo sanguíneo (Ferreira et al., 2008).
- A US Doppler pode ser efectiva na deteção de falhas ou regressão do CL antes de qualquer alteração na concentração de P4 ou na US modo-B sejam detetadas (Brogan, 2016).
- Ferreira et al. (2008) observaram que as regiões quísticas apresentam menor perfusão sanguínea quando comparadas com regiões adjacentes não quísticas, sugerindo assim que a formação de quistos uterinos está relacionada com alterações verificadas na vascularização.

5. Desvantagens do Doppler na avaliação da atividade ovárica

- O operador tem a responsabilidade de seleccionar e delimitar as áreas que são medidas, tornando esta avaliação algo subjetiva.
 - Artefactos.
 - Uso incorrecto das definições do ecógrafo, inexperiência ou animal irrequieto (nestes casos é preferível sedar o animal).

III. UTILIZAÇÃO DE DOPPLER NA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA OVÁRICA DE ÉGUAS PURA RAÇA ESPANHOLA – ESTUDO PILOTO

1. Objetivos do estudo

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Determinar se o fluxo sanguíneo folicular é um parâmetro fiável para prever a aproximação da ovulação em éguas Pura Raça Espanhola;
2. Avaliar as características vasculares do CL;
3. Estudar as vantagens da US Doppler em reprodução equina como ferramenta complementar à US modo B.

2. Material e métodos

No presente estudo participaram 15 éguas Pura Raça Espanhola, entre os 4 e os 19 anos, todas elas propriedade da Coudelaria “Cárdenas”. Os animais estudados apresentavam-se todos no mesmo espaço físico (Écija, Sevilla, Espanha), sendo a alimentação, o manejo e as condições meteorológicas iguais para todos. Os pesos das éguas inseridas neste estudo variaram entre os 600 e os 700 kg.

Os órgãos genitais internos das éguas foram avaliados por via transrectal, através da US modo-B e Doppler utilizando o ecógrafo MyLab One Vet (ESAOTE) com o transdutor linear. Todos os exames ecográficos foram realizados pelo mesmo operador, de modo a minimizar as possíveis diferenças na captação e, conseqüente, interpretação das imagens ecográficas. As imagens foram captadas sempre com as mesmas definições (10 MHz de frequência, 7 cm de profundidade, 70% de ganho e 40% de PD) e guardadas para análise posterior. Houve o cuidado de efectuar exames detalhados a todo o aparelho reprodutor (dois ovários e útero), permitindo uma correta interpretação da dinâmica folicular. Juntamente com o exame de ambos ovários, também foram registadas imagens do útero para uma análise mais completa da dinâmica reprodutiva da égua.

A recolha de dados foi realizada durante os meses de Março e Abril de 2017.

A indução da ovulação é uma técnica amplamente usada nos dias que correm, pois permite determinar o dia exato em que irá ocorrer a ovulação. Todas as éguas que participaram neste estudo foram medicadas com 3000UI hCG (IV) quando o diâmetro folicular era superior a 35 mm, se verificava edema endometrial e tónus cervical consistente. Segundo os estudos, quando se administra uma dose de 750-1500 IU de hCG a uma égua com um folículo >35 mm durante o estro, a ovulação ocorre durante as 48h seguintes, em mais de 92% dos casos

(Davies Morel & Newcombe, 2008). A hCG utilizada é um produto VETERIN CORION® (Laboratório Divasa-Farmavic, S.A., Barcelona, España).

Em todas as éguas que foram inseminadas usou-se sémen congelado, que foi recolhido e manipulado, na Coudelaria Cárdenas, pelo Dr. Fernando Requena.

Neste estudo optou-se por não sedar as éguas para a realização dos exames ecográficos, apesar de nem sempre ser uma tarefa fácil conseguir uma boa avaliação doppler em éguas muito agitadas, evitando assim os possíveis efeitos vasodilatadores do sedativo.



Figura 5 – Execução de um exame ecográfico na Coudelaria Cárdenas (arquivo pessoal, 2017)

À latitude em que este trabalho foi realizado (aproximadamente 37° = Província de Sevilha), nas estações de Outono e Inverno a maioria das éguas pára de ciclar, pois a luminosidade é reduzida. Este período denomina-se anestro estacional. Contrariamente, nas estações de Primavera e Verão, após o anestro sazonal as éguas voltam a ciclar, caso não se encontrem gestantes.

Deste modo, as éguas são denominadas como poliéstricas sazonais, pois têm mais de um ciclo éstrico por ano e estes ciclos ocorrem em determinada época do ano. Devido à elevada luminosidade registada no sul de Espanha, o período de anestro é reduzido (Novembro a Fevereiro), podendo em algumas éguas ser inexistente.

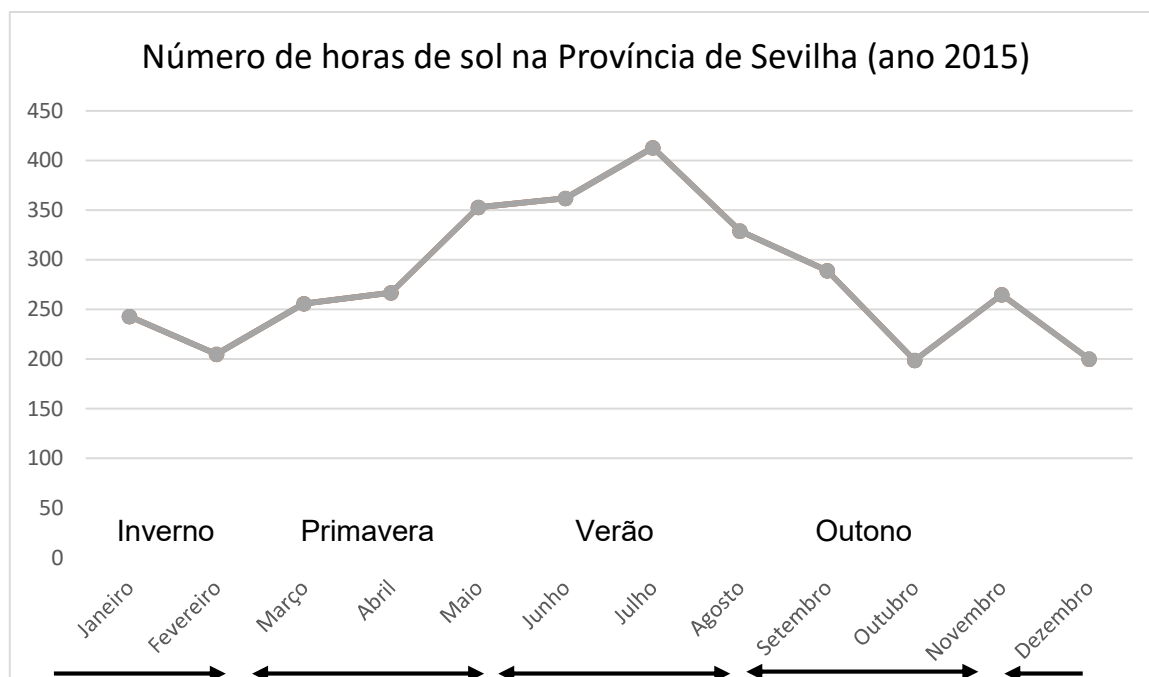


Figura 6 – Número de horas de sol registadas na Província de Sevilha no ano 2015. Fonte: INE, Boletín Mensuade Estatística, Novembro 2016

Todas as imagens presentes neste estudo foram colhidas e avaliadas pelo mesmo operador, Dr. Francisco Requena, que efectuou a sua aquisição e manipulação nas mesmas condições ambientais (Figura 5).

Neste estudo estabeleceram-se dois momentos ecográficos em que se registaram imagens com o intuito de avaliar a presença de vascularização do folículo pré ovulatório (1º momento) e do corpo lúteo (2º momento), e posteriormente, a sua quantificação através da medição da quantidade de píxeis existentes em cada imagem.

Todas as éguas avaliadas inseridas neste estudo foram previamente monitorizadas com recurso à ecografia modo-B. Em cada avaliação ecográfica com recurso à tecnologia Doppler foi registado um vídeo com a duração de 20 segundos, de onde se extrairam, posteriormente, 3 imagens. A seleção destas imagens baseou-se numa avaliação visual, tendo-se escolhido as 3 imagens que possuíssem maior quantidade de sinal Doppler (ou seja, maior quantidade de píxeis coloridos).

Todas as imagens Doppler foram analisadas com o software Image Color Summarizer, que permite a quantificação da percentagem de píxeis coloridos existentes numa imagem, representativos do fluxo sanguíneo ovárico. Através desta técnica conseguiu-se transformar uma análise qualitativa em quantitativa. Este software está disponível online, o utilizador apenas tem que introduzir o ficheiro e processar a imagem. Através da soma de todos os píxeis coloridos obtém-se a percentagem de fluxo sanguíneo existente.

Com o objetivo de minimizar os possíveis erros e que a imagem de cada momento ecográfico fosse a mais representativa possível, efectuou-se a média dos parâmetros avaliados (diâmetro do folículo pré ovulatório, percentagem de fluxo sanguíneo, área do corpo lúteo e

percentagem do fluxo sanguíneo do corpo lúteo) nas 6 imagens registadas do total de éguas avaliadas. O valor da média dos quatro parâmetros ecográficos estudados foi utilizado para análise estatística que se realizou.

Momentos das imagens Doppler registadas:

- **Avaliação dos folículos pré-ovulatórios:** éguas com folículo pré ovulatório ≥ 35 mm, que coincidiu com a administração de hCG (indução da ovulação) (Figura 8).
- **Avaliação dos CLs:** avaliação do CL funcional (imagem ecográfica aos 5-7 dias após a ovulação) (Figura 9).
- **Comparação de CL funcional, CL não funcional e FHA** (Figuras 14 e 15).

A análise estatística foi realizada com o software SPSS STATISTIC v.22. Realizou-se a análise estatística ANOVA de todos os resultados (por parâmetro medido em cada grupo), seguido pelo coeficiente de correlação de Pearson com o objetivo de detectar eventuais diferenças significativas.

3. Resultados

Na seguinte tabela (Tabela 4) estão representados os resultados quantitativos dos parâmetros avaliados nos dois momentos ecográficos, na amostra total de animais inseridos neste estudo.

3.1. Parâmetros avaliados em todas as éguas incluídas no estudo

	Idade	Fluxo sanguíneo do Folículo pré ovulatório (%)	Diâmetro do Folículo pré ovulatório (mm)	Fluxo sanguíneo do CL (%)	Área do CL (cm ²)	
1	12,00	6,46	44,30	12,89	4,38	
2	13,00	8,53	44,70	21,44	8,12	
3	19,00	8,13	40,30	22,53	8,59	
4	17,00	4,84	38,40	20,81	8,63	
5	11,00	6,20	43,60	15,69	5,42	
6	9,00	4,20	39,40	17,86	6,42	
7	7,00	8,24	45,20	20,13	4,38	
8	8,00	5,03	43,70	15,41	5,65	
9	7,00	5,68	38,60	20,42	7,89	
10	4,00	6,08	42,20	18,76	6,75	
11	5,00	7,23	44,60	16,65	5,95	
12	6,00	6,87	41,80	21,67	8,53	
13	8,00	8,41	45,60	20,51	8,12	
14	7,00	7,31	49,00	19,78	7,14	
15	7,00	5,86	39,70	18,96	7,38	
Total	N	15	15	15	15	
	Média	9,3333	6,6047	42,7400	18,9007	6,8900
	Máximo	19,00	8,53	49,00	22,53	8,63
	Mínimo	4,00	4,20	38,40	12,89	4,38
	Desvio	4,30393	1,36726	3,02745	2,71123	1,47257

Tabela 4 – Resultados obtidos de todos os parâmetros ecográficos avaliados e estatística descritiva (média, máximo, mínimo e desvio), no grupo de éguas Pura Raça Espanhola.

Como se observa na Tabela 4, o fluxo sanguíneo médio folicular foi de $6,6 \pm 1,367$ mm (Média \pm SEM), e o diâmetro folicular de $42,7 \pm 3,0$ mm. Quanto ao CL, a área média foi de $6,89 \pm 1,47$ mm e o fluxo sanguíneo de $18,9 \pm 2,7$ mm.

3.2. Correlações verificadas entre os parâmetros estudados

		Fluxo sanguíneo do Folículo pré ovulatório	Diâmetro do Folículo pré ovulatório	Fluxo sanguíneo do CL	Área do CL
Fluxo sanguíneo do Folículo pré ovulatório	Correlação de Pearson	1	,596*	,399	,101
	Sig. (bilateral)		,019	,141	,719
	N	15	15	15	15
Diâmetro do folículo pré ovulatório	Correlação de Pearson	,596*	1	-,211	-,385
	Sig. (bilateral)	,019		,451	,157
	N	15	15	15	15
Fluxo sanguíneo do CL	Correlação de Pearson	,399	-,211	1	,798**
	Sig. (bilateral)	,141	,451		,000
	N	15	15	15	15
Área do CL	Correlação de Pearson	,101	-,385	,798**	1
	Sig. (bilateral)	,719	,157	,000	
	N	15	15	15	15

NOTA: * A correlação é significativa para o nível 0,05 (bilateral).

** A correlação é significativa para o nível 0,01 (bilateral).

Tabela 5 – Correlações existentes entre os quatro parâmetros ecográficos avaliados no estudo, onde se indicam as diferenças significativas a negrito

Na tabela 5, verificou-se que em todas as éguas inseridas neste estudo existe uma correlação significativa entre o diâmetro folicular e o fluxo folicular ($p < 0,05$), independentemente da idade. Assim, quanto maior o diâmetro folicular, maior será a percentagem de fluxo sanguíneo do folículo. Observou-se também uma correlação significativa entre variáveis medidas no CL (área e fluxo do CL), visto que quanto maior a área do CL, mais intenso será o fluxo sanguíneo do CL (ou seja, maior será a percentagem de fluxo sanguíneo) ($p < 0,001$).

No seguinte gráfico (Figura 7), efetuou-se a comparação gráfica do fluxo sanguíneo do folículo pré ovulatórios e do fluxo sanguíneo do CL avaliados para cada uma das 15 éguas.

Nas seguintes imagens (Figuras 8 e 9), registaram-se 3 imagens representativas de folículos pré ovulatórios e 3 imagens representativas de CLs maduros, respetivamente, de 3 éguas distintas.

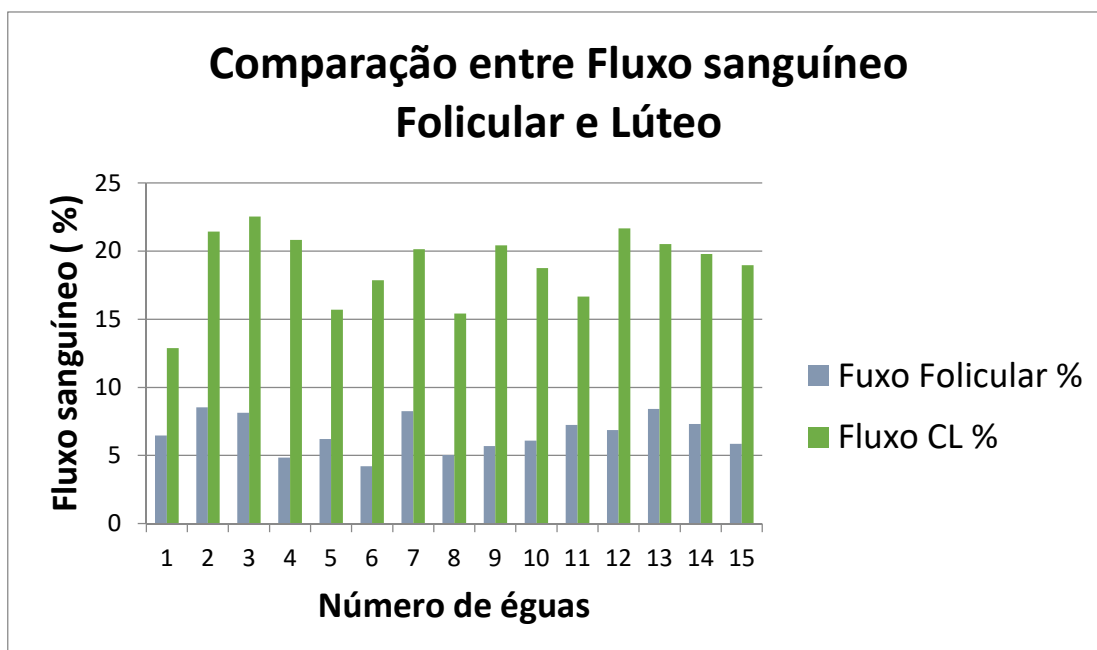


Figura 7 – Representação gráfica dos fluxos do folículo pré ovulatório e do CL maduro medidos nas éguas de Pura Raça Espanhola inseridas no estudo

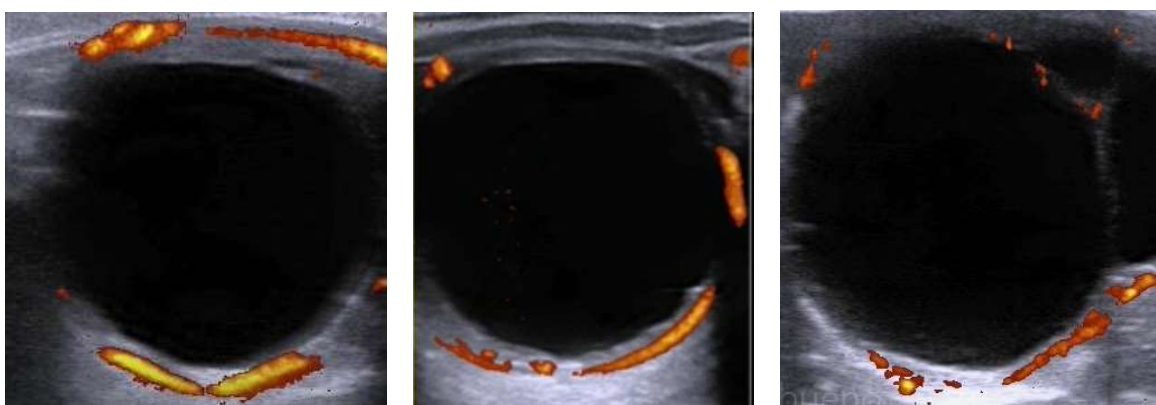


Figura 8 – Imagem representativa de folículos pré ovulatórios, obtidas no momento da indução da ovulação, recorrendo à ecografia color Doppler. Estas imagens ecográficas foram recolhidas de distintas éguas

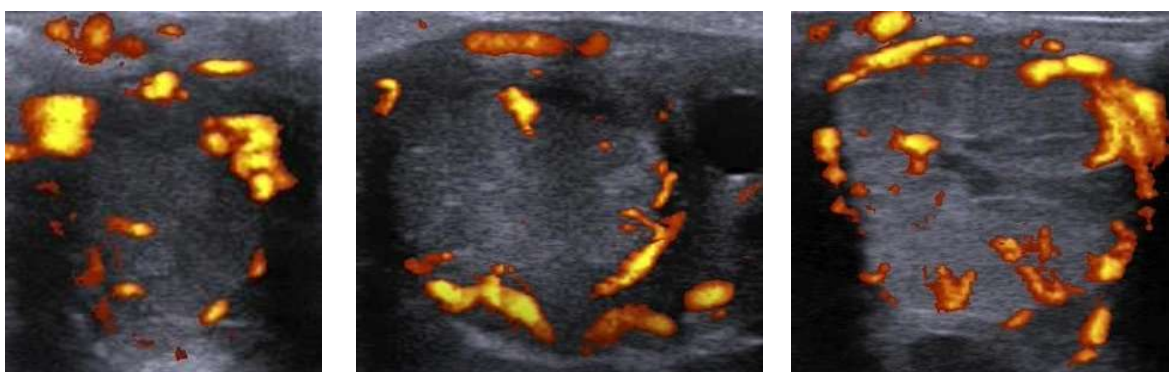


Figura 9 – Imagem representativa de CLs ativos 5 dias após a ovulação. Estas imagens ecográficas foram recolhidas de distintas éguas.

3.3. Análise univariada de variância relativamente aos grupos de idades

O total de éguas avaliadas foi dividido em 2 grupos etários, com o objetivo de avaliar a influência da idade nos parâmetros ecográficos estudados. O grupo A foi constituído pelas éguas com idade inferior a 8 anos (éguas jovens) e o grupo B pelas éguas com idade igual ou superior a 8 anos.

Com base na análise univariada dos parâmetros estudados apenas se verificou uma correlação significativa entre os 2 grupos etários relativamente à percentagem de fluxo sanfúneo do CL (Tabela 8).

3.3.1. Variável dependente: Fluxo Folicular

Origem	Soma de quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo corrigido	,288*	1	,288	,145	,710
Interseção	653,244	1	653,244	328,094	,000
Grupo	,288	1	,288	,145	,710
Erro	25,883	13	1,991		
Total	680,496	15			
Total corrigido	26,172	14			

NOTA: * $R^2 = ,011$ (R^2 ajustado = $-,065$)

Tabela 6 – Análise de variância do fluxo folicular em éguas Pura Raça Espanhola

Para os valores de fluxo sanguíneo folicular entre éguas jovens e velhas não se encontraram diferenças significativas.

3.3.2. Variável dependente: Diâmetro Folicular

Origem	Soma de quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo corrigido	,987*	1	,987	,101	,756
Interseção	27300,721	1	27300,721	2787,351	,000
Grupo	,987	1	,987	,101	,756
Erro	127,329	13	9,795		
Total	27528,930	15			
Total corrigido	128,316	14			

NOTA: * $R^2 = ,008$ (R^2 ajustado = $-,069$)

Tabela 7 – Análise de variância do diâmetro folicular em éguas Pura Raça Espanhola

Relativamente ao diâmetro folicular entre éguas jovens e velhas não se verificaram quaisquer diferenças significativas.

3.3.3. Variável dependente: Fluxo do CL

Origem	Soma de quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo corrigido	4,427*	1	4,427	,584	,0458
Interseção	5355,222	1	5355,222	706,895	,000
Grupo	4,427	1	4,427	,584	,458
Erro	98,484	13	7,576		
Total	5461,439	15			
Total corrigido	102,911	14			

NOTA: * $R^2 = ,043$ (R^2 ajustado = $-,031$)

Tabela 8 – Análise de variância do fluxo do CL em éguas Pura Raça Espanhola

Verificou-se que o fluxo sanguíneo do CL nos animais do grupo A (éguas jovens) era superior ao das éguas do grupo B (éguas velhas) ($p < 0,05$),

3.3.4. Variável dependente: Área do Corpo Lúteo

Origem	Soma de quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo corrigido	,012*	1	,012	,005	,944
Interseção	708,531	1	708,531	303,523	,000
Grupo	,012	1	,012	,005	,944
Erro	30,347	13	2,334		
Total	742,440	15			
Total corrigido	30,358	14			

NOTA: * $R^2 = ,000$ (R^2 ajustado = $-,077$)

Tabela 9 – Análise de variância da área do CL em éguas Pura Raça Espanhola

Para a área do CL entre éguas jovens e velhas não se registaram diferenças significativas.

No seguinte gráfico (Figura 10), estão representados os quatro parâmetros ecográficos estudados nos dois grupos etários e a relação entre os grupos A e B. Verifica-se que a percentagem de fluxo sanguíneo do CL foi superior em éguas jovens (< 8 anos de idade).

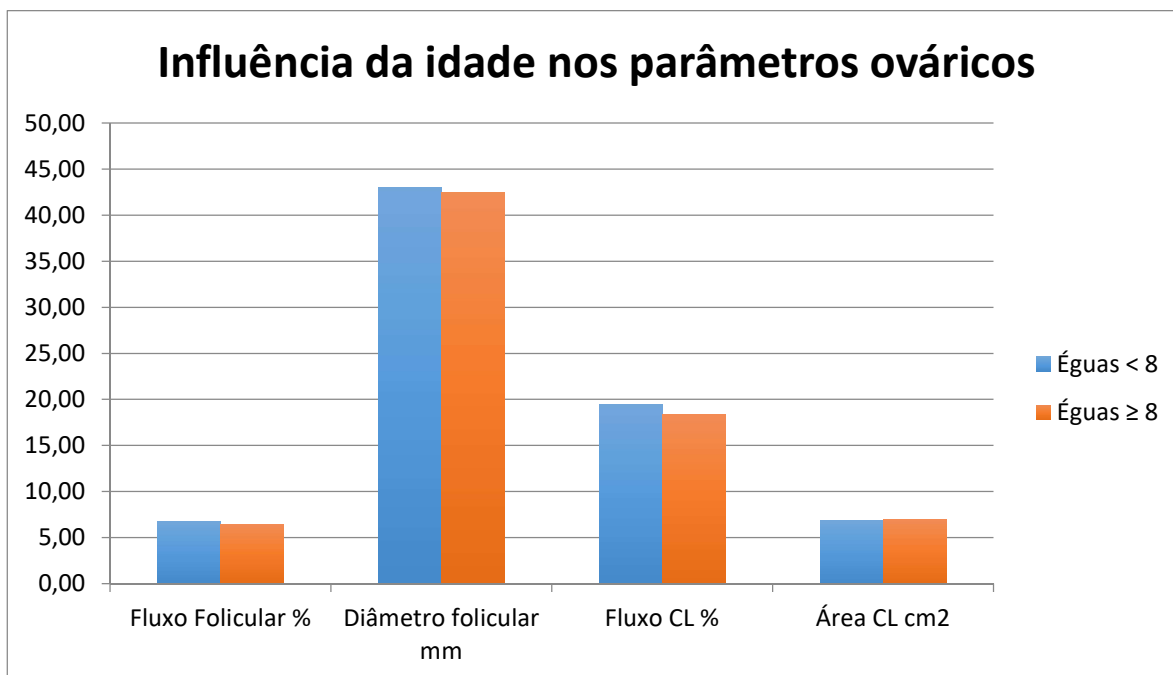


Figura 10 – Gráfico representativo da influência do grupo etário (éguas jovens e velhas) nos parâmetros ecográficos avaliados neste estudo

3.4. Regressões lineares

3.4.1. Fluxo e Diâmetro Folicular

Para determinar a correlação existente entre o fluxo sanguíneo e o diâmetro folicular realizou-se um gráfico de dispersão (Figura 11) entre as variáveis. Após a sua análise verificou-se que existe uma correlação linear positiva. Através do teste ANOVA (Tabela 11) calculou-se o valor de p, que foi inferior a 0,05, o que nos permite concluir que a correlação entre as duas variáveis é significativa. Calcularam-se os valores do erro standard (Tabela 10) e do coeficiente não standardizado (Tabela 12), que nos permitiram determinar a equação da reta de regressão.

Sabendo o valor do diâmetro folicular é possível calcular a percentagem de fluxo sanguíneo do folículo pré ovulatório, recorrendo à reta de regressão lineal abaixo representada.

A equação da reta de regressão linear é a seguinte:

$$FF (\%) = - 4,902 (\pm 4,308) + 0,269 (\pm 0,101) \times DF (\text{mm}) \quad (p < 0,05; \text{RECM} = 1,139)$$

NOTA: FF = Fluxo Folicular, unidades (%)

DF = Diâmetro Folicular; unidades (mm)

Resumo do modelo

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro standard da estimativa
1	,596 ^a	,355	,306	1,13917

a. Variável constante: Diâmetro do folículo pré ovulatório

Tabela 10 – Cálculo da regressão linear existente entre as variáveis fluxo e diâmetro folicular

ANOVA^a

Modelo		Soma de quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
1	Regressão	9,301	1	9,301	7,167	,019 ^b
	Resíduo	16,870	13	1,298		
	Total	26,172	14			

a. Variável dependente: Fluxo sanguíneo do folículo pré ovulatório

b. Variável constante: Diâmetro do folículo pré ovulatório

Tabela 11 – Análise estatística ANOVA entre as variáveis fluxo e diâmetro folicular

Modelo		Coeficientes ^a				
		Coeficientes não standardizados		Coeficientes standardizados	t	Sig.
		B	Erro standard	Beta		
1	(Constante)	-4,902	4,308		-1,138	,276
	Diâmetro Folicular	,269	,101	,596	2,677	,019

a. Variável dependente: Fluxo sanguíneo do folículo pré ovulatório

Tabela 12 – Cálculo dos coeficientes do diâmetro folicular (variável independente)

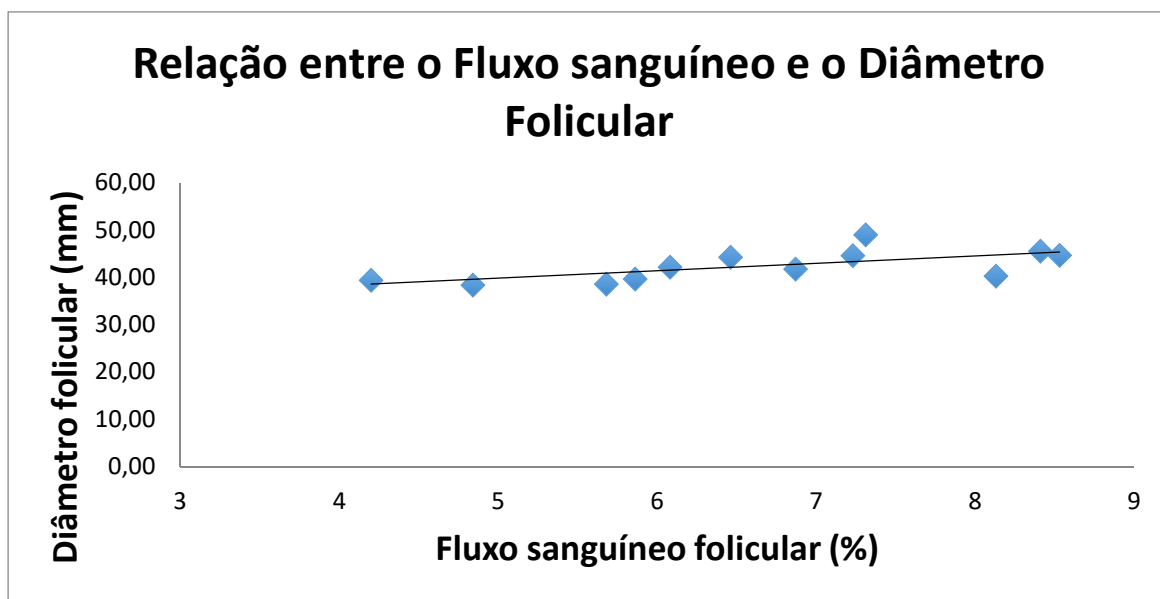


Figura 11 – Representação gráfica da reta de regressão linear existente entre o fluxo sanguíneo e o diâmetro folicular

3.4.2. Fluxo e Área do CL

Para determinar a correlação existente entre o fluxo sanguíneo e a área do CL realizou-se um gráfico de dispersão (Figura 12) entre as variáveis. Após a sua análise verificou-se que existe uma correlação linear positiva. Através do teste ANOVA (Tabela 14) calculou-se o valor de p, que foi inferior a 0,001, o que nos permite concluir que a correlação entre as duas variáveis é muito significativa. Calcularam-se os valores do erro standard (Tabela 13) e do coeficiente não standardizado (Tabela 15), que nos permitiram determinar a equação da reta de regressão. Sabendo o valor da área do CL é possível calcular a percentagem de fluxo sanguíneo do CL, recorrendo à reta de regressão lineal abaixo representada.

A equação da reta de regressão linear calculada é a seguinte:

$$FCL (\%) = 8,783 (\pm 2,167) + 1,468 (\pm 0,308) \times ACL (\text{cm}^2) \quad (p < 0,001; \text{RECM} = 1,697)$$

NOTA: FCL = Fluxo do CL, unidades (%)

ACL = Área do CL; unidades (cm²)

Resumo do modelo

Modelo	R	R ²	R ² ajustado	Erro standard da estimação
1	,798 ^a	,636	,608	1,69731

a. Variável constante: Área CL

Tabela 13 – Cálculo da regressão linear existente entre as variáveis fluxo sanguíneo e área do CL

ANOVA^a

Modelo		Soma de quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
1	Regressão	65,460	1	65,460	22,722	,000 ^b
	Resíduo	37,451	13	2,881		
	Total	102,911	14			

a. Variável dependente: Fluxo do CL

b. Variável constante: Área do CL

Tabela 14 – Análise estatística ANOVA entre as variáveis fluxo sanguíneo e área do CL

Coefficientes^a

Modelo		Coefficients não standardizados		Coefficients standardizados		Sig.
		B	Erro standard	Beta	t	
1	(Constante)	8,783	2,167		4,053	,001
	Área CL	1,468	,308	,798	4,767	,000

a. Variável dependente: Fluxo CL

Tabela 15 – Cálculo dos coeficientes da área do CL (variável independente)

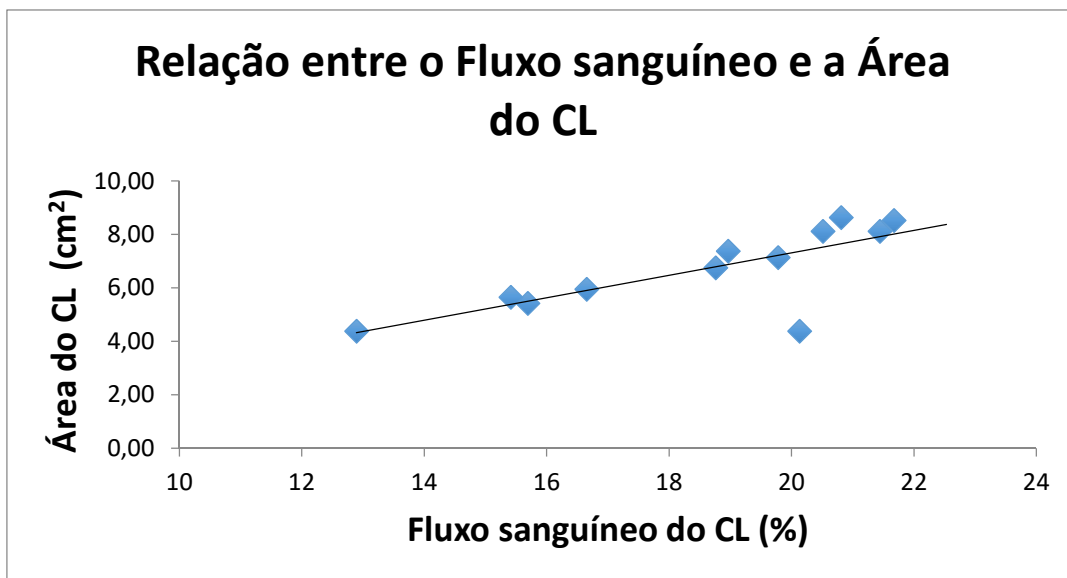


Figura 12 – Representação gráfica da reta de regressão linear existente entre a área de o fluxo do CL

Nas imagens abaixo representadas (Figura 13), comparou-se a utilização da US com recurso ao Color Doppler (lado esquerdo, representado por duas escalas de cores, azul e vermelho) e Power Doppler (lado direito, representado por uma escala de cor, vermelho) em dois CLs de animais distintos.

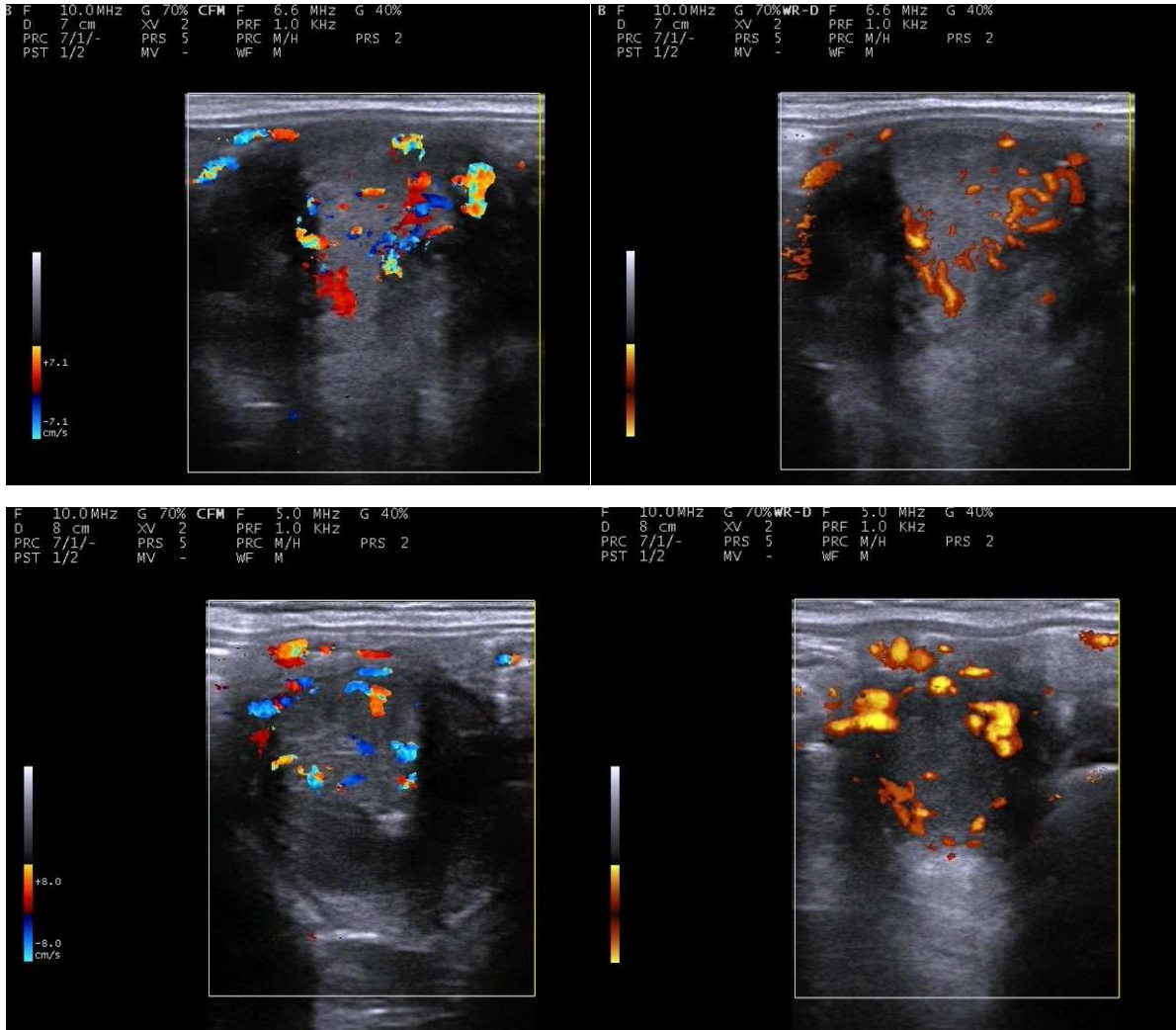


Figura 13 – Imagem representativa do mesmo CL em power doppler e em color doppler

Em paralelo com a análise dos folículos pré ovulatórios (24h após a indução da ovulação) e dos CLs maduros (entre o 5º e o 7º dia após a ovulação), foi possível estudar as vantagens da ecografia modo Doppler como ferramenta complementar à análise ecográfica modo B, como representado nas seguintes imagens (Figuras 14 e 15).

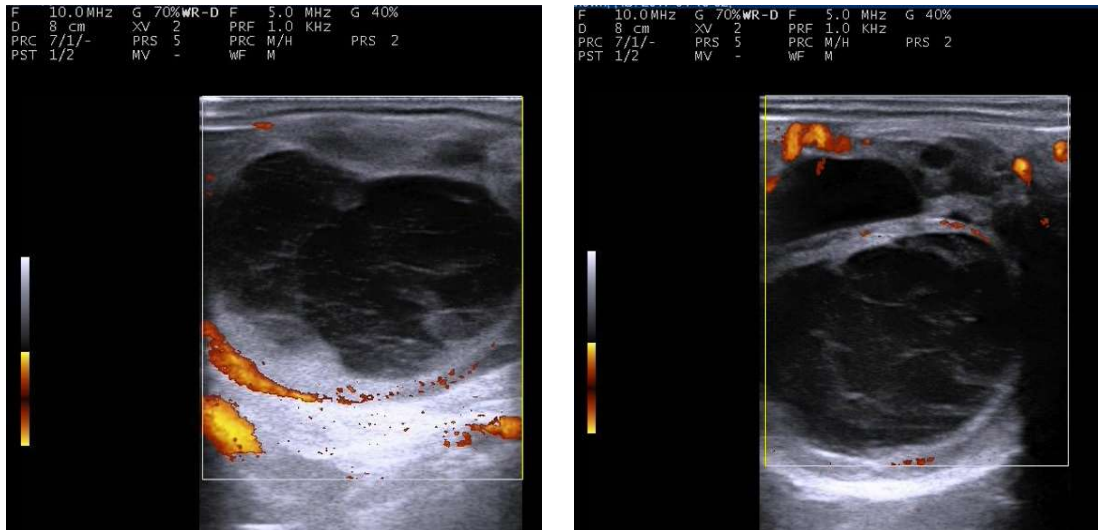


Figura 14 – Imagens representativas de FHA, com recurso à ecografia Doppler

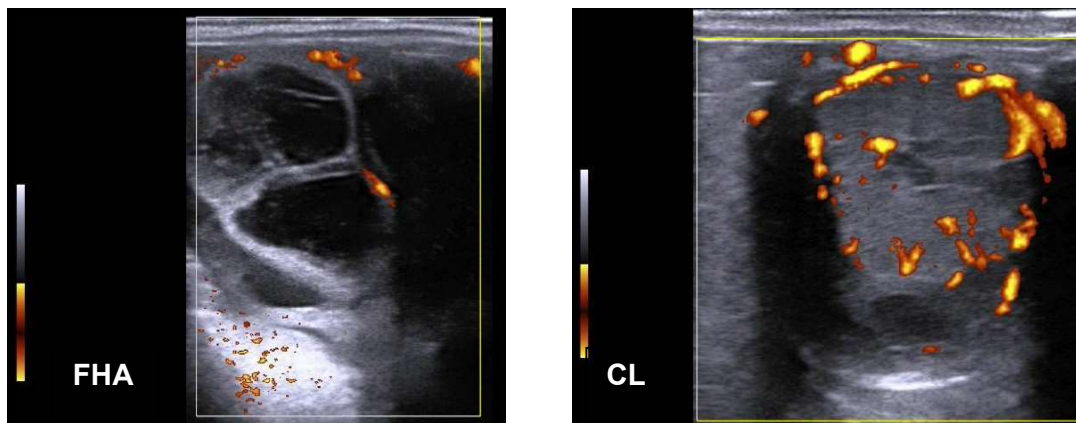


Figura 15 – Imagens representativas de um FHA (lado esquerdo) e de um CL (lado direito), com recurso à ecografia Doppler

IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Todas as éguas presentes neste estudo foram submetidas à indução da ovulação com hCG e em todas elas se registou a ocorrência da ovulação entre as 24 e as 48h posteriores à administração de hCG. A hCG difere quimicamente da LH, tendo, contudo, a sua atividade biológica primária é análoga à da LH. Assim, a administração de 750-1500 IU hCG, durante o estro, a éguas com folículos superiores a 35mm desencadeia a ovulação em 48h, em mais de 92% dos casos (Davies Morel e Newcombe, 2008).

Segundo Castro (2016), a administração de hCG provoca um aumento do fluxo sanguíneo ovárico, nos minutos que se seguem à sua administração. Contudo, a hCG não exerce qualquer efeito na regulação do fluxo sanguíneo ovárico, independentemente das doses administradas. Brito (2017), demonstrou o aumento do fluxo sanguíneo lúteo verificado em grupos de éguas tratadas com GnRH e hCG, através do aumento da percentagem de sinal color-Doppler registado em imagens ecográficas de CLs. A comparação das percentagens de fluxo sanguíneo existente em diferentes imagens é possível recorrendo a um software que permite a quantificação do sinal Doppler, como por exemplo Image Color Summarizer (software utilizado neste estudo, para quantificação do sinal Doppler, que é representado pela percentagem de píxeis).

As alterações detetáveis na vascularização local das estruturas ováricas podem ser registadas durante o crescimento folicular, a ovulação, a formação do CL e luteólise. A irrigação sanguínea dos folículos e CL aporta nutrientes, oxigénio, suporte hormonal e facilita ainda a libertação de hormonas esteróides (Brito, 2017).

1. Folículos pré ovulatórios

A avaliação do fluxo sanguíneo folicular com recurso ao color Doppler tem sido usada em éguas (Gastal et al., 2006d) como método para prever a viabilidade folicular. O fluxo sanguíneo folicular é associado com a maturidade e qualidade do oócito. (Ginther et al., 2007d).

Todas as imagens colhidas de folículos pré ovulatórios foram realizadas 24h após a administração de hCG. Os diâmetros dos folículos pré ovulatórios encontrados variaram entre os 38 e os 49 mm.

Segundo Gastal et al. (2006c), a vascularização folicular é máxima às 24h antes da ovulação e ocorre uma diminuição abrupta da perfusão sanguínea folicular durante as 4h que antecedem a ovulação.

No presente estudo verificou-se que o fluxo folicular está relacionado com o diâmetro folicular em todas as éguas, independentemente da idade, com um nível de significância de $p < 0,05$. Este

facto está provavelmente associado com a influência das prostaglandinas no aumento do fluxo sanguíneo folicular. Assim quanto maior o folículo pré ovulatório maior será o número de recetores de prostaglandinas no folículo e, conseqüentemente, maior será a percentagem de fluxo sanguíneo do folículo (Acosta et al., 2004b).

2. Corpos Lúteos maduros e ativos

No presente estudo verificou-se que o fluxo do CL está correlacionado com a área do CL de forma muito significativa ($p < 0,001$) em todas as éguas analisadas, o que está em consonância com os dados dos autores Brogan (2016) e Miró (2015).

Através da comparação gráfica do fluxo sanguíneo registado no folículo pré ovulatório e o posterior CL formado (Figura 7), de todas as éguas incluídas neste estudo, verificou-se que não existe qualquer relação entre o fluxo sanguíneo folicular e o fluxo sanguíneo do futuro CL. Segundo um estudo de 2012 (Romano et al.), o fluxo sanguíneo dos folículos pré ovulatórios não influencia a vascularização dos CLs futuros.

A circulação sanguínea é fundamental para que o CL mantenha as suas propriedades funcionais (Bollwein et al., 2002). Após a ovulação, a perfusão sanguínea do CL aumenta progressivamente até envolver praticamente toda a área ao quinto dia após a ovulação.

O color Doppler foi descrito como um meio de avaliação rápida da função do CL, pois a área ocupada pelo fluxo sanguíneo de um CL está diretamente correlacionada com a concentração de progesterona (P4) circulante, durante a fase lútea. A vascularização apresenta uma importante relevância na fisiologia do CL (Ferreira-Dias et al., 2006). Na prática, a presença de fluxo sanguíneo verificada num CL através da ecografia Doppler, permite saber se este é ativo ou não. Através da comparação de imagens ecográficas consecutivas do mesmo CL pode-se avaliar a sua evolução, sendo que esta é cronologicamente representada por um aumento, pico e diminuição do fluxo sanguíneo detetado no CL. Assim, a US Color Doppler é uma técnica usada para avaliar o estado de luteólise de uma forma rápida, fácil e económica (Miró, 2015). Na prática, a concentração de P4 plasmática é raramente avaliada, pois implica um aumento de tempo e de custos (Brogan, 2016; Miró, 2015).

O desaparecimento do fluxo sanguíneo num CL, detetado pela US color Doppler, indica que o CL já não é funcional relativamente à secreção de progesterona. Contudo, ainda podem ser detetadas concentrações de P4 em circulação pois, numa fase final, verifica-se a diminuição mais lenta da concentração de progesterona (10-14 dias após a ovulação), do que a diminuição do aporte sanguíneo ao CL (Ginther et al., 2007b). Estes resultados sugerem que o uso do PF Doppler é uma técnica efetiva na deteção de falhas e da regressão do CL antes que qualquer diminuição de P4 seja detetada ou que sejam identificadas alterações uterinas na US modo B (Brogan, 2016). Num exame ecográfico com recurso à ecografia modo B, apesar da diminuição do fluxo sanguíneo de um CL este continua a apresentar a sua forma

típica arredondada e hiperecogénico, comparativamente às restantes estruturas presentes num ovário. Os sinais ecográficos de involução (diminuição de tamanho e diminuição de ecogenicidade) apenas serão verificadas dias mais tarde após o início da regressão do CL.

3. Comparação de FHA com CL funcional

Inicialmente, pode-se distinguir um folículo ovulatório de um anovulatório a partir dos 25 mm de diâmetro, devido à menor irrigação detetada no folículo anovulatório. Contudo, numa fase mais avançada da onda de crescimento folicular verifica-se que os FHAs possuem uma vascularização proeminente ao longo de todo o seu perímetro durante os dias que antecedem a sua formação, contrariamente aos folículos pré ovulatórios que possuem baixa vascularização periférica momentos que antecedem a ovulação (quatro horas antes do momento da ovulação verifica-se uma diminuição do fluxo sanguíneo folicular) (Ginther et al. ,2007c).

Acosta et al. (2004), demonstraram que os folículos anovulatórios dominantes, característicos do período de transição estacional, possuem menor fluxo sanguíneo do que os folículos pré ovulatórios da estação reprodutiva. Este facto pode-se explicar devido aos folículos do período de transição possuírem menor número de recetores hormonais, como tal as prostaglandinas não têm o seu efeito sobre o folículo, o que se vai traduzir numa menor quantidade de fluxo sanguíneo folicular.

Todas as éguas incluídas neste estudo apresentaram folículos pré ovulatórios e CLs característicos da estação reprodutiva e funcionais, não se tendo verificado nenhuma anormalidade reprodutiva. Sabe-se que tanto folículos pré ovulatórios com elevada vascularização como folículos com menor vascularização dão origem a CLs funcionais e semelhantes (Romano et al., 2012). Assim, pode-se concluir que a irrigação do futuro folículo ovulatório não está relacionada com a posterior função secretora do CL.

Os FHAs tendem a reorganizar-se e originam estruturas semelhantes a CLs maduros, podendo dar origem a imagens ecográficas (modo B) muito semelhantes. Nestes casos, é de extrema utilidade recorrer à ecografia Doppler, pois o CL maduro possui fluxo sanguíneo evidente contrariamente ao FHA (Figura 15).

V. CONCLUSÕES

A perfusão vascular de uma estrutura pode ser quantificada pelo número de píxeis na imagem ecográfica ou estimada subjectivamente pela extensão das zonas coloridas presentes. O doppler tem o potencial de fornecer informação acerca do presente e futuro de acontecimentos reprodutivos, fornecendo uma perspectiva única da atividade reprodutiva de uma égua.

Neste estudo não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos etários de éguas (jovens e velhas) relativamente ao Fluxo Folicular, Diâmetro Folicular e Área do CL. Em contrapartida, registou-se uma diferença significativa entre os dois grupos etários estudados relativamente ao fluxo sanguíneo do CL, tendo-se verificado um fluxo sanguíneo superior em éguas jovens (< 8 anos).

Comprovou-se que não existe correlação entre o fluxo sanguíneo folicular e lúteo, não sendo possível através do US color Doppler prever o fluxo sanguíneo do futuro CL. Contudo, existe uma proporção direta entre o diâmetro e o fluxo do folículo pré ovulatório, tal como entre a área e o fluxo do CL ativo e maduro.

Neste estudo comprovou-se que com o uso da ecografia Doppler é possível determinar o potencial ovulatório de folículos >30 mm durante a estação reprodutiva, tal como diferenciar CLs ativos de inativos. Podemos concluir que esta técnica tem um enorme potencial para avaliar a hemodinâmica ovárica, que usado em conjunto com a ecografia convencional (modo B) poderá contribuir para o aperfeiçoamento do manejo reprodutivo equino diário, obtendo melhor aproveitamento do material genético e aumentando assim o retorno financeiro.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, T.J. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F (2 alpha) injection in the cow. *Biology of Reproduction* 66, 651-658
- Acosta, T.J. & Miyamoto, (2004a). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 127-140
- 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
- Allen, W.R. (2001). Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reproduction in Domestic Animals* 36, 121-131
- Allen, W.R. & Stewart, F. (2001). Equine placentation. *Reproduction, Fertility and Development* 13, 623-634
- Altermatt, J.L., Marolf, A.J., Wringley, 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
- Asa, C.S., Goldfoot, D.A., Garcia, M.C. & Ginther, O.J. (1980). Sexual behavior in ovariectomized and seasonally anovulatory mares (*Equus caballus*). *Horm Behav* 14, 46-54
- Asa, C.S., Goldfoot, D.A. & Ginther, O.J. (1983). Assessment of the sexual behaviour of pregnant mares. *Horm Behav* 38, 1-13
- Atayde, K.M. & Rocha, A. (2010). Selected Ovarian Ultrasonographic Characteristics During Vernal Transition are Useful to Estimate Time of First Ovulation of the Year.
- Aurich, C (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science* 124, 220-228
- Beg, M.A. & Bergfelt, D.R. (2011). Folliculogenesis. *Equine Reproduction 2nd edition* McKinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 2010-2019
- Bergfelt, D.R., Pierson, R.A. & Ginther, O.J. (2006). Regression and resurgence of the CL following PGF₂α treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology* 65, 1605-1619.
- Brendemuehl, J.P. (2001). Effect of oxytocin and PGF₂ alpha on luteal formation, function, and pregnancy rates in mares. *47th Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract*, 239-241.
- Bollwein, H., Mayer, R., Weber, F., Stolla, R. (2002). Luteal blood flow during the oestrous cycle in mares. *Theriogenology* 57, 2043-2051
- Bollwein, H., Kolberg, B., Stolla, R. (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
- Brito, L.F.C., Baldrighi, J.M., Wolf, C.A., Ginther, O.J. (2017). Effect of GnRH and hCG on progesterone concentrations and ovarian and luteal blood flow in diestrous mares. *Animal Reproduction Science* 176, 64-69

- Brogan, P.T., Henning, H., Stout, T.A.E. e Ruijter-Villani, M. (2016). Animals Reproduction Science 166, 22-27
- Camillo, D., Pacini, M., Panzani, D. Vannozi, I., Rota, A., Aria, G. (2004). Clinical use of twice daily injections of buserelein acetate to induce ovulation in the mares. *Vet. Res. Commun.* 28, 169-172
- Carnevale, E.M & Olsen, L.M. (2011). Normal anatomy. *Equine Reproduction, 2nd edition* Mckinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 2003-2008.
- Carvalho, C.F., Chammasii, M.C., Cerriiii, G.G. (2008). Princípios físicos do Doppler em ultrasonografia. *Ciência Rural* 38, 872-879
- Castro, T., Oliveira, F.A., Siddiquim M.A., Baldrighi, J.M., Wolf, C.A. e Ginther, O.J. (2016). Stimulation of LH, FSH and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. *Theriogenology* 85, 740-746
- Crowell-Davis, S.L. (2007). Sexual behaviour of mares. *Horm. Behav* 52, 12-17
- Cuervo-Arango, J & Newcombe, J.R. (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern on two consecutive cycles in he mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* 69, 681-687
- Cuervo-Arango, J & Newcombe, J.R. (2013). Ultrasound Confirmation of Ovulation in Mares: A Normal Corpus Luteum or a Haemorrhagic Anovulatory Follicle? *Reproduction Domestic Animals* 48, 105-111
- Davies Morel, M.C. & Newcombe, J.R. (2008). The efficacy of different hCG dose rates and the efect of hCG tratment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulationin the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 189-199
- Donadeu, F.X. & Watson, E.D. (2007). Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horses. *Anim. Reprod. Sci.* 100, 225-242
- Ferreira, J.C., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (2008). Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of size of the cystic area and age. *Reproduction* 135, 541-550
- Ferreira, J. C. (2011). Potential use of Doppler ultrasound in equine embryo transfer programs. *Ciência Rural* 41, 1063-1069
- Ferreira, J. C. (2013). Avaliação ultrassonográfica Doppler pré e pós-cobertura do trato reprodutivo de éguas Doppler ultrasonography pre and post-breeding evaluation of the reproductive tract in mares. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte*, 37(2), 108–114. Retrieved from www.cbpa.org.br
- Ferreira-Dias G., Pinto Bravo 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.
- Ferreira, J.C., Ignácio, F.S., Rocha, N.S., Thompson Jr., D.J., Pinto, C.R., Meira, C. (2015). Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial

- insemination. *Animal Reproduction Science* 160, 90-96
- Gastal, M.O., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (1998). The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology* 50, 1025-1038
- Gastal, M.O., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (2006a). Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to change in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 131, 699-709
- Gastal, E.L., Gastal, M.O. e Ginther, O.J. (2006b). The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology* 50, 1025-1038
- Gastal, E.L., Gastal, M.O. e Ginther, O.J. (2006c). Serrated granulosa and other discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. *Theriogenology* 50, 1025-1038
- Gastal, M.O., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (2006d). Effects of hCG on characteristics of the wall of the developing preovulatory follicle evaluated by B-mode and color-Doppler ultrasonography and interrelationships with systemic estradiol concentration in mares. *Anim Reprod. Sci.* 94, 186-190
- Gastal, E.L., Jacob, J.C. e Gastal, M.O. (2007). Accumulation of fluid in the infundibulum during the estrous cycle in mares. *J Equine Vet Sci.* 27, 251-259
- Gastal, E., & Gastal, M. (2012). Clinical use of B-mode and color-Doppler ultrasonography to evaluate preovulatory follicle status in mares, 359–369. Carbondale: IVIS. Retrieved from www.ivis.org
- Gentry, L.R., Thompson, D.L., Gentry, G.T., Davis, K.A. e Godke, R.A. (2002). High versus low body condition in mares: Interactions with responses to somatotropin, GnRH analog, and dexamethasone. *J Anim Sci* 80, 77-85
- Ginther, O.J. (1988). Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. *Vet Clin North Am Equine Pract* 4, 197-213
- Ginther, O.J. (1992). Reproductive Biology of the Mare: basic and applied aspects, 2nd edition. Madison: University of Wisconsin. Department of Veterinary Science
- Ginther, O.J. (1995). Follicles. Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses. Cross Plains: Equiservices, 44-66
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X. & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65, 638-647
- Ginther, O.J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 61-79
- Ginther, O.J. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 78, 239-257
- Ginther, O.J. Utt, M.D. (2004). Doppler ultrasound in equine reproduction: principles,

techniques and potencial. *J.Equine Vet Sci.* 24, 516-526

- Ginther, O.J., Beg, M.A., Gastral, M.O. & Gastral, E.L. (2004). Follicle dynamics and selection in mares. *Anim Reprod* 1, 45-63
- Ginther, O.J. (2007). Producing color-flow images. In *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Colo-Doppler Ultrasonography*, 39-60. Ed. OJ Ginther. Cross Plains: Equiservices Publishing, USA
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O. & Beg, M.A. (2007a). Incidence, endocrinology, vascularity and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *J.Eq.Vet.Sci.* 27, 130-139
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Utt, M.D., Beg, M.A. (2007b). Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 213-220
- Ginther, O.J., Gastal, E.L. & Gastal, M.O. (2007c). Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. *J Equine Vet Sci* 27, 20-27
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Siddiqui, M.A., Beg, M.A. (2007d). Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mare. *Biolog. Reprod.* 77, 2-208
- Ginther, O.J., Gastal E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A. (2008). Dynamics of the equine preovulatory follicle and preovulatory hormones: what's new? *J.Equine Vet. Scie.* 28, 454-460
- Ginther, O.J. (2008). Characterisation of pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF₂α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during and after luteolysis in mares. *Reproduction, Fertility and Development* 20, 684-693
- Ginther, O.J., Jacob, J.C. e Gastal, M.O. (2009). Development of one vs multiple ovulatory follicles and associated systemic hormone concentrations in mares. *Reprod Domest Anim.* 44, 441-449.
- Ginther, O.J. (2012). The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. *Theriogenology* 77, 1042-1049
- Ginther, O.J. (2014). How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology* 81, 112-125
- Handler, J., Schonlieba, S., Hoppenc, H.O. e Aurichb, C. (2006). Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDJ) in mares. *Theriogenology* 65, 45-58
- Heidler, B., Aurich, J.E., Pohl, W., Aurich, C. (2004). Body weight of mmares and foals, estrous cycles and plasma glucose concentration in lactating and non-lactating Lipizzaner mares. *Theriogenology* 61, 883-93
- Jacob, J.C., Gastal, E.L. & Gastal, M.O. (2009). Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. *Reprod Domest Anim* 44, 92-99.

- Kelley, K.K., Thompson, D.L., Storer, W.A., Mitcham, P.B., Gilleey, R.M. & Burns, P.J. (2006). Estradiol interactions with dopamine antagonists in mares: prolactin secretion and reproductive traits. *J Equine Vet Sci* 26, 517-28
- Kretser, D.M. & Robertson, D.M. (1993). The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod.* 106-47
- Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Allen, W.R., Sieme, H., Schoon, H.A. (2011). Morpho-funcional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology* 76, 1326-1336
- Mattioli, M. Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Zannoni, A., Castellani, G., Berardinelli, P., Scapolo, P.A. (2001). Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod.* 65, 1014-1019
- McCue, P.M. & Ferris, R.A. (2011). The abnormal estrous cycle. *Equine Reproduction 2nd edition* McKinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 1754-1768
- McKinnon, A., Squires, E., Vaala, W., & Varner, D. (2011). *Equine Reproduction. Journal of Chemical Information and Modeling* (2nd ed., Vol. 1). United Kingdom: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Medan, M.S., Nambo, Y., Nagamine, N., Shinbo, H., Watanabe, G., Groome, N. & Taya K. (1991). Plasma concentrations of In-inhibin, Inhibin A, Inhibin pro- α C, FSH, and estradiol-17 β during estrous cycle of mares. *J Equine Vet Sci* 11, 319-22
- Miyamotoa, A., Shirasuna, K., Wijayagunawardane, M.P.B., Watanabe, S., Hayashi, M., Yamamotoa, D., Matsui, M., Acosta, T.J. (2005). Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 329-339
- Miró, J., Muñoz, F., Piedrafita, J., Quintero, A. (2004). Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters measured during estrous. *Revista científica Fcv-UJZ* 14, 54-58
- Miró, J., Vilés, K., Anglada, O., Marín, H., Jordana, J., Crisci, A. (2015). Color Doppler provides a reliable and rapid means of monitoring luteolysis in female donkeys. *Theriogenology* 83, 485-490
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80, 1-29
- Ousey, J.C., Kolling, M., Newton, R., Wringht, M., Allen, W.R. (2012). Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Vet. J.* 41, 15-21
- Palmer, E., Chavatte-Palmer, P., Verdonck, E. (2006). Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*
- Pierson, R.A. & Ginther, O.J. (1985). Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the

- mare. *Theriogenology* 24, 359- 368
- Roser, J.F., McCue, P.M. & Hoye, E. (1994). Inhibin activity in the mare and stallion. *Domest Anim Endocrinol* 11, 97-100
- Samper, J.C. (2005). Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biology of Reproduction* 72, 755-761
- Samper, J.C. & Pycock, J.F. (2007). The normal uterus in estrus. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (eds) *Current Therapy in Equine Reproduction*. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 32-35
- Silva, L.A. (2005). Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biology of Reproduction* 72, 755-761
- Silva, L.A., Gastal, E.L. & Gastal MO. (2006). Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Anim Reprod* 3, 339-346.
- Schoon, D. (1999). Angioses in the equine endometrium – pathogenesis and clinical correlations. *Pferdeheilkunde* 15, 541-546
- Squires, E.L. (2008). Hormonal manipulation of the mare: a review. *J.Equine Vet. Sci.* 28, 627-634
- Staempfli, S.A. (2011). Prostaglandins. *Equine Reproduction 2nd edition* Mckinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 1797-1803
- Townson, D.H. & Ginther, O.J. (1987). Duration and pattern of follicular evacuation during ovulation in the mare. *Anim Reprod Sci* 15, 31-38
- Townson, D.H. & Ginther, O.J. (1989). Size and shape changes in the preovulatory follicle in mares based on digital analysis of ultrasonic images. *Anim Reprod Sci* 21, 63-71
- Townson, D.H. & Ginther O.J. (1989). Ultrasonic characterization of follicular evacuation during ovulation and the fate of the discharged follicular fluid in mares. *Anim Reprod Sci* 20, 131-141.
- Vanderwall, D.K. (2011). Early embryonic loss. *Equine Reproduction 2nd edition* Mckinnon, A.O., Squires, E.L., Wendy, E.V., Varner, D.D., Wiley-Blackwell. 2119-2122
- Watson, E.D., Thomassen, R. & Nikolakopoulos, E. (2002). Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. *Theriogenology* 59, 1-7
- Weems, C.W., Weems, Y.S., Randel, R.D. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J.* 171, 206-228