

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**A INFLAMAÇÃO UTERINA INTERFERE NA LUTEOGÊNESE DA ÉGUA?**

Doutorado

Henrique Kurtz Löff

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**A INFLAMAÇÃO UTERINA INTERFERE NA LUTEOGÊNESE DA ÉGUA?**

Autor: Henrique Kurtz Löff

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

Porto Alegre, julho de 2015.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### CIP - Catalogação na Publicação

Löf, Henrique Kurtz  
A INFLAMAÇÃO UTERINA INTERFERE NA LUTEOGÊNESE DA  
ÉGUA? / Henrique Kurtz Löf. -- 2015.  
63 f.  
Orientador: Rodrigo Costa Mattos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. ÉGUA. 2. INFLAMAÇÃO UTERINA. 3. PROGESTERONA PLASMÁTICA. 4. CORPO LÚTEO. I. Mattos, Rodrigo Costa, orient. II. Título.

**HENRIQUE KURTZ LÖF****A INFLAMAÇÃO UTERINA INTERFERE NA LUTEOGÊNESE DA ÉGUA?**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

**APROVADO POR:**

---

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos - UFRGS

Orientador

---

Prof. Dr. Claudio Alves Pimentel

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Gustavo Carneiro

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela possibilidade de realização deste estudo.

Ao Prof. Rodrigo Costa Mattos, por sua orientação desde o Mestrado. Sua busca incessante pelo conhecimento motiva e conduz seus orientados. Sua amizade cativa e sua genialidade ensina, muito obrigado Professor!

À Prof<sup>a</sup>. Concepta McManus Pimentel pela realização da análise estatística.

Ao estagiário Augusto Rafael de Castro Fróis pela ajuda na realização de uma parte do experimento.

Ao CNPq/ FAPERGS pelo financiamento do projeto.

À Caroline pelo apoio e paciência, por seu amor e por estar sempre presente, mesmo estando longe.

À Cabanha Santo Ângelo, Sr. Jorge Martins Bastos, pela cedência dos animais e da estrutura para a realização do experimento e seus funcionários Gabriel Barros e Valdoir Barros pelo manejo com os animais.

*“Estamos sempre correndo e, por isso, ficamos cada vez mais longe dos que amamos, por compromissos quase sempre inadiáveis. E aqueles que queremos junto conosco, que amamos, que fazem de nós o que somos, não os vemos.*

*À toda minha família que durante estes anos me apoiou incondicionalmente, mesmo à distância, nas minhas ausências justificadas pela busca do conhecimento.”*

*Dedico*

## RESUMO

### **A inflamação uterina interfere na luteogênese da égua?**

Autor: Henrique Kurtz Löff

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Após a ovulação do folículo ovulatório na égua, ocorre a formação do corpo lúteo (CL). Esta glândula endócrina transitória é responsável pela produção de progesterona (P4), necessária para a manutenção da gestação. O objetivo deste trabalho foi verificar a dosagem de P4 plasmática após inseminação com duas concentrações espermáticas, infecção experimental, infusão de leite desnatado e querosene no início da fase lútea. Nossa hipótese sugere que durante a formação do CL, inflamações uterinas de diferentes severidades provocam diminuição da concentração de P4 plasmática nos primeiros dias de diestro. Para tal, foram utilizadas 100 éguas que foram rufiadas diariamente e o crescimento folicular monitorado por palpação retal e ultrassonografia. Ao se detectar comportamento de estro e folículo dominante ( $> 35$  mm) com redução do grau de edema uterino as éguas receberam 1500 UI de hCG (Dia -1). Após 24hs da indução da ovulação (Dia 0) as éguas foram palpadadas e as que continuaram com folículo dominante foram distribuídas aleatoriamente em cada um dos seguintes grupos inflamatórios: STREPTO – infundidas com *Streptococcus zooepidemicus* no D0; INF-D1 – infundidas com querosene no dia da ovulação (D1); INF-D3 – infundidas com querosene 2 dias após a ovulação (D3); IA-100 – inseminadas com  $100 \times 10^6$  de espermatozoides no D0; IA-1000 – inseminadas com  $1 \times 10^9$  de espermatozoides no D0; LEITE – infundidas com leite desnatado no D0; CONTROLE – sem infusão. Desde a comprovação da ovulação (D1) foi realizada coleta de sangue e repetida a cada 24

horas, por seis dias, para verificar a dosagem de P4 plasmática. Observa-se que as éguas dos grupos STREPTO, INF-D1 e IA-100 apresentaram uma diminuição significativa da concentração plasmática de P4 entre D3 e D6 em relação ao CONTROLE. Já as éguas dos grupos INF-D3, IA-1000 e LEITE não se diferenciaram do CONTROLE. O processo inflamatório durante a formação do CL pode ter resultado num efeito subluteogênico, interferindo na formação do CL e conseqüentemente nos níveis de P4 plasmática. Os resultados observados permitem afirmar que a hipótese sugerida foi confirmada. O grau de inflamação no momento da formação do CL afeta a concentração de P4. Conclui-se que inflamações durante a formação do CL afetam a concentração plasmática de P4.

**Palavras-chave.** égua, inflamação uterina, progesterona plasmática, corpo lúteo.

## ABSTRACT

### **Does uterine inflammation interfere in the luteogenesis of the mare?**

Author: Henrique Kurtz Löff

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

After the ovulation of the ovulatory follicle in the mare, the formation of the corpus luteum (CL) occurs. This transitory endocrine gland is responsible of producing progesterone (P4), needed for the maintenance of the gestation. The objective of this study was to verify the P4 plasmatic dosage after insemination with two sperm concentrations, experimental infection, infusion of skim milk and kerosene in the beginning of luteal phase. Our hypotheses suggests that during the CL formation, uterine inflammations of different degrees of severity cause the decrease of plasmatic P4 concentration in the first days of diestrus. For such, 100 mares that were daily teased were used and the follicular growth monitored by rectal palpation and ultrasound. When detected estrous and dominant follicle (>35mm) behavior with a decrease of uterine edema degree the mares received 1500 UI of hCG (Day -1). After 24hs of the ovulatory induction (Day 0) the mares were palpated and the ones that continued with dominant follicle were randomly distributed into each one of the following groups: STREPTO – infused with *Streptococcus zooepidemicus* in D0; INF-D1 – infused with kerosene on the day of ovulation (D1); INF-D3 – infused with kerosene 2 days after ovulation (D3); IA-100 – inseminated with  $100 \times 10^6$  of spermatozoids on D0; IA-1000 – inseminated

with  $1 \times 10^9$  of spermatozoids on D0; MILK – infused with skim milk on D0; CONTROL – no infusion. Since verification of ovulation (D1) blood sample was taken again every 24 hours, for 6 days, to check the plasmatic P4 dosage. It was observed that the mares of the groups STREPTO, INF-D1 and IA-100 showed a significant decrease of P4 plasmatic concentration between D3 and D6 compared to CONTROL. However the mares of the groups INF-D3, IA-1000 and MILK did not differentiate from CONTROL. The inflammatory process during the CL formation may have resulted in a sub-luteogenic effect, interfering in CL formation and consequently in the P4 plasmatic levels. The results observed allow confirmation of the suggested hypotheses. The inflammation degree in the moment of CL formation affects the P4 concentration. It is concluded that inflammations during CL formation affect the P4 plasmatic concentration.

**Key words.** mare, uterine inflammation, plasmatic progesterone, corpus luteum.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribuição temporal da indução da ovulação, da realização dos tratamentos, da ovulação e das coletas das amostras para verificação da concentração de P4.....37

FIGURA 2. Box plot da concentração plasmática de progesterona (P4) nos dias 1 a 6 do experimento das éguas (A) do grupo controle e infectadas com *Streptococcus* e das éguas (B) do grupo controle e infundidas nos dias 1 e 3 com querosene. (\*\* P < 0,01).....42

FIGURA 3. Box plot da concentração plasmática de progesterona (P4) nos dias 1 a 6 do experimento das éguas (A) do grupo controle e inseminadas com  $100 \times 10^6$  e  $1 \times 10^9$  de espermatozoides e das éguas (B) do grupo controle e infundidas com leite. (\*\* P < 0,01).....43

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores médios e erro padrão da concentração de progesterona plasmática (ng/mL), dos grupos CONTROLE, STREPTO, INF-D1, INF-D3, IA-100, IA-1000 e LEITE...40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 O PROCESSO DE OVULAÇÃO</b> .....	16
<b>2.2 O CORPO LÚTEO</b> .....	17
<b>2.3 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO CORPO LÚTEO</b> .....	18
<b>2.4 ESTABELECIMENTO LUTEAL</b> .....	20
<b>2.5 REGRESSÃO LÚTEA</b> .....	22
<b>2.6 O INÍCIO DA LUTEÓLISE</b> .....	24
<b>2.7 AÇÕES EM CONJUNTO COM A PGF2<math>\alpha</math></b> .....	25
<b>3. ARTIGO</b> .....	29
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem o terceiro maior rebanho de equinos do mundo com aproximadamente 5,9 milhões de animais, perdendo apenas para a China com 7,9 milhões e o México com 6,2 milhões. A importância social e econômica da indústria equina se traduz por uma movimentação econômica da ordem de R\$ 7,3 bilhões por ano e a ocupação direta de cerca 640 mil pessoas, cifra que pode atingir a casa de 3,2 milhões somados os empregos indiretos. A indústria equina gera mais empregos do que o comércio atacadista, os correios e a indústria automotiva (LIMA et al., 2006).

Os problemas reprodutivos são considerados o terceiro problema clínico mais importante na prática equina, após distúrbios gastrointestinais e do trato respiratório (TROEDSSON, 1999). Na égua, o útero está protegido da comunicação com o meio externo por barreiras físicas que impedem o acesso de microorganismos ao útero: a vulva (CASLICK, 1937; PASCOE, 1979), a prega vestibulo-vaginal e a cérvix (LEBLANC et al., 1995).

A ovulação do folículo ovariano na égua é seguida pela formação do corpo lúteo (CL) (NISWENDER & NETT, 1993). Durante o início da fase lútea é crucial a relação entre o CL e o endométrio. O conhecimento detalhado da comunicação entre eles é relevante para a melhoria da fertilidade. De fato, uma melhor compreensão dos mecanismos endometriais que regulam a síntese e secreção de prostaglandina F<sub>2α</sub>

(PGF2 $\alpha$ ) levando a uma luteólise estrutural e funcional, são necessárias (GALVÃO, 2011).

Independentemente do método de cobertura, monta natural ou inseminação artificial, o sêmen é depositado diretamente no útero da égua. Isto promove uma contaminação pelas bactérias e componentes seminais resultando em uma inflamação uterina. Essa inflamação é caracterizada pelo influxo de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) no lúmen uterino (TROEDSSON, 1999), fagocitose dos espermatozoides e bactérias e liberação de PGF2 $\alpha$  (TROEDSSON et al., 1993). A finalidade da inflamação é limpar o útero dos espermatozoides defeituosos, mortos e de outros agentes contaminantes (TROEDSSON, 1999). Na maioria das vezes a inflamação é rapidamente resolvida dentro de 36-48hs (KATILA, 1995).

A inflamação uterina persistente pode resultar em luteólise precoce e perda embrionária pelo aumento da concentração de PGF2 $\alpha$ . Esta inflamação pode interferir diretamente na sobrevivência do embrião (NELLY et al., 1979).

Uma série de hormônios estão envolvidos na regulação da função do CL, como a progesterona (P4) e PGF2 $\alpha$ , e citocinas como fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ). Todos eles possuem um papel específico no estabelecimento luteal (GALVÃO et al., 2012a)

Conforme estudos prévios demonstrando a relação da inflamação uterina na égua com a dosagem de P4, que possivelmente pode ser alterada pela liberação precoce de PGF2 $\alpha$ , é necessário que haja um maior entendimento dos mecanismos endometriais e ovarianos que regulam a formação do CL e a dosagem de P4.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de progesterona plasmática durante a inflamação uterina no início da fase lútea.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. O PROCESSO DE OVULAÇÃO**

A ovulação na égua é um processo complexo que envolve uma sequência de eventos que levam a ruptura do folículo dominante, com mais de 30mm, na fossa ovulatória com a extrusão do fluido folicular, células da granulosa e do complexo cumulus oócito (GINTER, 1992).

O papel da ultrassonografia foi sem dúvida o passo mais importante para o entendimento do processo ovulatório e do desenvolvimento do CL. A onda folicular primária é a maior onda, caracterizada pelo folículo dominante e vários folículos subordinados. Para diferenciar o crescimento da regressão folicular, mais de um exame ultrassonográfico é necessário, especialmente porque folículos atrésicos da onda maior ou menor podem permanecer e confundir a identificação de novos folículos emergentes (BERGFELT & ADAMS, 2007).

Comparada com outras espécies, na égua o processo ovulatório é diferente. A ovulação ocorre em uma área especializada denominada de fossa de ovulação, um local restrito onde o epitélio germinativo e o infundíbulo podem se encontrar (RILEY, 2001).

Após a ovulação a cavidade folicular inicia a luteinização. O processo inicia na fossa ovulatória e se estende pela glândula resultando no CL. Todos os processos descritos sobre a ovulação são intimamente dependentes da relação estradiol, P4, LH e FSH (GALVÃO, 2011). O estradiol do folículo dominante aumenta no plasma e atinge

o pico 2 dias antes da ovulação e então diminui. Esse aumento coincide com a baixa no nível de FSH. Além disso, o folículo pré ovulatório alcança seu maior tamanho e cessa seu crescimento. A máxima liberação de LH acontece no 1º dia do ciclo estral. O aumento de LH, 2 dias antes da ovulação, é determinante para a diminuição de estradiol e do crescimento folicular (GINTHER, 2008). Outra consequência do pico de LH é a luteinização das células foliculares e a alteração da secreção de hormônios esteróides. Um aumento leve, porém significativo da P4 circulante ocorre no dia da detecção da ovulação (NISWENDER et al., 2000).

## **2.2.O CORPO LÚTEO**

Os principais alvos da P4 são o trato reprodutivo, a glândula mamária e o eixo hipotalâmico-hipofisário. A P4 prepara o útero para o início e manutenção da gestação e, em cada ciclo estral, logo após a ovulação, um processo complexo de luteinização conduz a formação do CL (NISWENDER et al., 2000).

O CL é uma glândula endócrina transitória secretora de P4 e seu desenvolvimento pode ser dividido em três estágios: luteogênese, fase de manutenção e luteólise (GINTHER, 1992). A luteogênese tem início durante o processo de maturação folicular final (WUTTKE et al., 1998) e é concluída três dias após a ovulação (NISWENDER et al., 1993).

Um decréscimo na produção de P4 é seguido pela regressão estrutural do CL. Um grande número de fatores têm sido apontados como responsáveis pela luteólise em várias espécies, tais como a PGF2 $\alpha$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF) (FRIEDMAN et

al., 2000) e outras citoquinas como o Ligando Fas, o interferon gama (IFNG) (DAVIS & RUEDA., 2002) e o óxido nítrico (NO) (VEGA et al., 2000).

### **2.3.CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO CORPO LÚTEO**

Após o pico de LH, as células remanescentes do folículo ovulado sofrem um processo de diferenciação chamado luteinização. Dois pontos-chave dessas células após a luteinização são a sua capacidade de produção de P4 e sua capacidade de regressão ou morte celular no momento apropriado (DIAZ et al., 2002).

As células da teca interna do folículo não contribuem para o tecido lúteo como em outras espécies. As células da teca são supostamente degeneradas e substituídas por fibroblastos hipertrofiados (VAN NIEKERK et al., 1975).

Os eventos cronológicos que conduzem à formação do CL são os seguintes: (1) alguns dias antes da ovulação, células fibroblásticas da teca interna proliferam e ampliam-se em células redondas e as células da granulosa param de se dividir, motivadas pela queda de estradiol; (2) pouco antes da ovulação, as células da teca estão em diferentes estágios de degeneração (com condensação do citoplasma, fragmentação e fagocitose) e as células da granulosa mudam de uma massa compacta para células fusiformes (GINTHER, 1992).

Aproximadamente 2 horas após a ovulação, as células da granulosa estão com cerca de 10µm de diâmetro e possuem o núcleo com 5 a 6µm de diâmetro. A parede interna do folículo colapsado é composta por células do estroma e vasos sanguíneos

distendidos, enquanto que 24 horas após a ovulação, células da granulosa estão com 15 $\mu$ m de diâmetro e possuem núcleo e citoplasma com vacúolos, indicando luteinização e atividade secretora. No dia 3 todas as células são luteinizadas, embora a máxima hipertrofia dessas células ocorre no dia 9 quando medem 37,5 $\mu$ m e o núcleo 10 $\mu$ m de diâmetro (VAN NIEKERK et al., 1975).

Células foliculares da granulosa se originam das grandes células lúteas e células da teca das pequenas células lúteas (NISWENDER & NETT, 1994). As grandes células (37,5 $\mu$ m), como o próprio nome diz, são muito maiores do que as pequenas (11 $\mu$ m). Há também uma distinção morfológica e funcional entre os dois tipos celulares. As grandes células possuem maior número de receptores para estradiol, PGF2 $\alpha$  e alta produção de P4 (DIAZ et al., 2002).

A proporção de pequenas células aumenta nos dias 12 e 14 para 25 e 60% respectivamente. Estas pequenas células apresentam eosinofilia homogênea e densa, escura coloração, e muitas vezes núcleo alongado e representam um antecessor da fase lútea de grandes células (VAN NIEKERK et al., 1975).

Com relação às células da granulosa, a partir do dia 12 ocorre uma diminuição progressiva pelos próximos 4 dias. No dia 16 estas células lúteas diminuem seu diâmetro para 20 $\mu$ m e no dia 20, próximo a ovulação, a maioria dessas células estão em estágio avançado de regressão. Além disso, o nível de P4 na circulação periférica está aumentando. O estroma começa a crescer na granulosa seguido por capilares em proliferação, que são cercadas pelos fibroblastos hipertrofiados os quais irão substituir as células da teca degeneradas. Já as grandes células são poliédricas, com citoplasma

vacuolizado e núcleo único, contendo um ou mais nucléolos (VAN NIEKERK et al., 1975).

Tal como demonstrado para as outras espécies, o CL contém células endoteliais, fibroblastos e células provenientes da corrente sanguínea (CHANNING, 1966). Entre os poucos estudos realizados sobre CL equino, diferentes tipos de células além das células pequenas e grandes lúteas, como fibroblastos, células do sistema imunológico ou as células endoteliais têm sido relatadas (ROBERTO DA COSTA et al., 2005).

#### **2.4.ESTABELECIMENTO LUTEAL**

Existe uma íntima relação entre o fluxo sanguíneo do CL e a concentração de progesterona plasmática que foi descrita recentemente na espécie equina. Conforme Ginther et al (2006a), um aumento simultâneo na perfusão sanguínea do CL e na concentração plasmática de P4 é observado entre os dias 01 e 06 pós-ovulação, enquanto que a partir de 40 minutos e 24 horas após o tratamento com PGF2 $\alpha$  uma diminuição progressiva na concentração plasmática de P4 e na perfusão sanguínea do CL, respectivamente, é detectada (GINTHER et al., 2006b).

O estabelecimento do CL pode ser visto de duas maneiras. Por um lado uma reorganização tecidual profunda e o crescimento dinâmico pela proliferação celular que deve ser realizado em poucos dias (JABLONKA SHARIFF et al., 1993). Por outro lado, a secreção de P4 e seus níveis de circulação devem assegurar a implantação da gestação (GRAHAM & CLARKE, 1997).

A ação das gonadotrofinas LH e GnRH mostraram-se determinantes para o estabelecimento e manutenção do CL não apenas em ruminantes (NISWENDER & NETT, 1994), mas também na égua (GINTHER, 1992; WATSON et al., 2000a). O papel luteotrófico do LH foi demonstrado quando a administração de GnRH em éguas no diestro causou um aumento na produção de P4 (JOHNSON et al., 1988). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* confirmam que as células lúteas fazem aumentar a secreção de P4, quando expostas a LH ou hCG (KELLY et al., 1988). Durante o diestro há uma baixa concentração de LH, mas a ocorrência ocasional de pulsos de LH deve manter em níveis necessários à manutenção do CL na égua (WATSON & SERTICH, 1990).

Na égua foi relatado um aumento da secreção da PGE2 a partir do início do CL por Watson e Sertich (1990), mas um papel luteotrófico para PGE2 em CL equino não foi descrito até o momento. Da mesma forma, a secreção de PGE2 foi aumentada em CL equinos pelo NO e TNF (FERREIRA-DIAS et al., 2011), sendo sugerido que o TNF realiza a interação entre NO e PGE2 durante o estabelecimento do CL na égua. Vários estudos têm demonstrado que a expressão de NO aumenta durante a luteólise em roedores (FRIDEN et al., 2000), bovinos (JAROSZEWSKI & HANSEL, 2000; SKARZYNSKI et al., 2003) e éguas (FERREIRA-DIAS et al., 2011). Apesar disso, foi descrito que o NO estimula a secreção de P4 pelas células do ovário de ratos (DONG et al., 2000) e, no início da atividade lútea em equinos (FERREIRA-DIAS et al., 2011). Os dados sobre a ação do NO são relativos e sugerem que ele pode agir de duas formas, dependendo da dose e da fase do ciclo (KEATOR et al., 2008).

## 2.5 REGRESSÃO LÚTEA

O primeiro relato do efeito luteolítico da  $\text{PGF}_2\alpha$  em éguas em 1972 (DOUGLAS & GINTHER, 1972), e as interpretações sobre os mecanismos fisiológicos da luteólise foram muitas vezes baseadas em doses ou formas que a PGF não ocorre normalmente. Comparações foram feitas em éguas entre um tratamento com bolus convencional de PGF (GINTHER et al., 2007) e a simulação de um pulso de PGFM por infusão de PGF durante 2 horas (GINTHER et al., 2009). O simples bolus luteolítico de PGF resultou em um aumento transitório imediato das concentrações de  $\text{P}_4$  circulante, porém a infusão lenta não. Os dois tratamentos resultaram em uma diminuição semelhante da  $\text{P}_4$  durante 6 a 12 horas após o início do tratamento. Os resultados indicaram que o tratamento convencional com uma única dose luteolítica de PGF produziu efeitos hormonais não fisiológicos, enquanto que a PGF infundida lentamente simulando um pulso natural de PGFM também induziu luteólise, mas com respostas fisiológicas (GINTHER et al., 2012).

O conhecimento em diferentes espécies mostrou que a  $\text{PGF}_2\alpha$  induz uma luteólise funcional agindo em vários locais da via esteroidogénica. As ações antiesteroidogénicas são evidenciadas no rompimento do transporte do colesterol para a mitocôndria, como éster proteína-2 de suporte (envolvida no transporte de colesterol para as mitocôndrias) e proteína Star ou na enzima de clivagem da cadeia (P-450 $\text{scc}$ ) na membrana mitocondrial interna (WATSON et al., 2005).

Equinos são aproximadamente 18 vezes mais responsivos ao efeito luteolítico da PGF do que outras espécies animais (GINTHER., 1992). Uma única dose de PGF de 5mg/égua comparada com 25mg/vaca é recomendada para a indução clínica da

luteólise. A reação da égua frente a várias doses de PGF é um indicador dessa sensibilidade. A dose mínima efetiva em éguas é 1,25mg, e uma dose de 0,25mg já tem um efeito parcial na dosagem de progesterona (MILLER et al., 1976).

Há uma grande diferença entre a rota de transporte da PGF entre o útero e o CL nas diferentes espécies. Na égua a rota da PGF do útero ao ovário possui algumas características: 1) nenhuma diferença no efeito luteolítico da PGF exógena quando administrado por via intramuscular ou intra-uterina; 2) nenhuma relação entre o lado de remoção do útero e a manutenção lútea; 3) nenhuma relação entre o lado de inserção de um dispositivo intra-uterino e da regressão luteal; 4) ausência de anatomia vascular que favoreceria uma via uteroovariana unilateral; e 5) resposta lútea semelhante à perfusão intravenosa e intra-uterina de PGF para simular um pulso de PGFM (GINTHER, 2012). Em novilhas, a dose eficaz mínima é aproximadamente 20 vezes menor quando realizada no útero do que quando administrado sistemicamente (GINTHER, 1992). A eficácia intra-uterina em vacas e ovelhas resulta de uma via unilateral entre o corno uterino e o CL (GINTHER et al., 1996). Veias e vasos linfáticos do corno uterino passam ao longo do pedículo ovariano. A PGF atravessa através da parede de ambos os vasos uterinos até a parede da artéria ovariana que está intimamente aderida. Em contraste, em éguas uma via unilateral não evoluiu e a superfície da artéria não tem maior contato com a superfície do útero ou com a veia uteroovariana (GINTHER et al., 1972).

A importância do útero para a luteólise foi inicialmente estabelecida por Loeb (1923). Na égua, ficou claro que a luteólise foi disparado por pulsos endometriais de

PGF2 $\alpha$  durante cerca de 14-16 dias depois da ovulação, originando uma queda na P4 em três ou quatro horas (DOUGLAS & GINTHER, 1976; KINDAHL et al., 1982).

## 2.6 O INÍCIO DA LUTEÓLISE

A ação luteolítica da PGF2 $\alpha$  é mediada por um receptor plasma específico de membrana (POWELL et al., 1975), o receptor de PGF2 $\alpha$  (FPr). Como consequência da ação da PGF2 $\alpha$  uterina no CL, a expressão de FPr pode aumentar como mostrado na vaca (RAO et al., 1979) durante a fase lútea final. Em equinos a ação relatada em células foliculares antes e após a ovulação não aumenta a transcrição do mRNA (BEG et al., 2005).

O início da luteólise não parece ser exclusivamente dependente da presença de FPr. Em vacas, a PGF2 $\alpha$  não foi eficaz antes do dia 5 da fase lútea (HENRICKS et al., 1974). No entanto, receptores para PGF2 $\alpha$  já são expressos no dia 2 (WILTBANK et al., 1995). Além disso, a afinidade de receptores diferenciais para PGF2 $\alpha$  para todo o ciclo estral pode contribuir para a refratariedade vista no início das fases do CL. Como demonstrado no caso dos ruminantes, sensibilidade discordante do CL para PGF2 $\alpha$  poderia ser devida à existência de estados de alta e baixa afinidade do FPr (McCRACKEN et al., 1999).

Alguns estudos sobre o efeito luteolítico da PGF2 $\alpha$  na fase lútea inicial na égua, até o dia 5 após a ovulação, tendem a contradizer relatos anteriores (DOUGLAS & GINTHER, 1972; PACCAMONTI et al., 1991). Mais recentemente, a administração de PGF2 $\alpha$  nos primeiros 2 dias após a ovulação foi eficaz e encurtou o intervalo

interovulatório (TROEDSSON et al., 2000; NIE et al., 2003; HOLLAND & PINTO., 2008).

## **2.7 AÇÕES EM CONJUNTO COM A PGF $2\alpha$**

O processo de ovulação requer reorganização da matriz extracelular, alterações microvasculares, expressão de citocinas e o recrutamento de leucócitos a partir da circulação (BRANNSTROM & ENSKOG., 2002). Além disso, os hormônios, tais como P4 e PGF, e fatores angiogênicos estão envolvidos em função da regulação do CL (FERREIRA DIAS et al., 2006, 2011). Também as citocinas, tais como TNF e o interferon gama (IFNg), principalmente produzidos por células do sistema imunológico do CL (PATE., 1995), desempenham papel específico no estabelecimento luteal (SKARZYNSKI et al., 2008).

Na ausência de gestação, é crucial para a luteólise a retomada de um novo ciclo ovariano. Em uma série de espécies, a presença de diferentes células inflamatórias, incluindo mastócitos, macrófagos e linfócitos (BRANNSTROM E NORMAN., 1993) foram demonstradas no ovário durante o ciclo estral. Particularmente na égua, as células T CD4 + e CD8 + T citotóxicas estão presentes no CL durante luteólise (LAWLER et al., 1999). Além dos linfócitos T, predominam neutrófilos e macrófagos no CL no momento da luteólise que podem estar diretamente envolvidos na destruição das células lúteas e subsequente diminuição da secreção de P4 (BRANNSTROM et al., 1994).

Além disso, as citocinas TNF e IFNg têm sido relacionadas na regressão do CL bovino (PATE, 1995; SKARZYNSKI et al., 2008). No entanto, a função exata das

citoquinas TNF e IFN $\gamma$  na regulação, diferenciação e regressão do CL equino só foi esclarecida recentemente por GALVÃO et al (2012) que demonstraram que na fase lútea inicial o TNF contribuiu para a secreção de P4 e diminuição de PGF2 $\alpha$  e no final da fase lútea auxiliou a síntese de PGF2 $\alpha$  e a redução da viabilidade celular.

A formação da estrutura lútea é caracterizada por repetidos padrões de proliferação celular, remodelação da matriz extracelular e alterações na vascularização lútea em cada ciclo do ovário. Muitos aspectos das mudanças cíclicas no trato reprodutivo durante o ciclo estral e a implantação, assim como a função da placenta são dependentes de angiogênese fisiológica, que consiste no crescimento vascular novo a partir de vasculatura preexistente (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

A luteólise não é exclusivamente constituída do desaparecimento da secreção de P4 pelas células lúteas. Resumidamente, ela compreende também as alterações vasculares (MIYAMOTO et al., 2005), a infiltração de leucócitos e a morte de células endoteliais e esteroidogênicas por apoptose (McCORMACK et al., 1998) e os mecanismos não apoptóticos (FRASER et al., 1999; GAYTAN et al., 2002). Como uma glândula endócrina incomum, o CL possui uma natureza transitória. Depois de um rápido crescimento e função por 10 a 14 dias, o CL involui para formar os corpo albicans, ricos em colágeno e compostos por tecido conjuntivo. Na maioria das espécies, tanto funcional quanto estrutural, a involução não está claramente documentada, sendo difícil de separar inteiramente os eventos (GALVÃO, 2011).

O sistema imunológico e as citoquinas têm sua participação na regressão estrutural e conduzem os eventos como morte celular e apoptose (DAVIS & RUEDA., 2002), reorganização do tecido e remodelamento da matriz extracelular (McCRACKEN

et al., 1999). Alguns trabalhos indicam a importância dos macrófagos e outras células imunitárias, através da liberação de TNF e outras citocinas, na regressão do CL, após o início da ação da PGF<sub>2</sub> (BENYO & PATE., 1992). A fagocitose de células lúteas e restos celulares também tem sido atribuída aos macrófagos (PAAVOLA, 1979).

Na égua também foi relatado um aumento das células imunológicas no momento da luteólise (LAWLER et al., 1999). O recrutamento de macrófagos para o CL, provavelmente, é regulado pela expressão da proteína 1 de monócitos MCP-1 (BOWEN et al., 1999; TOWNSON et al., 1996), estando a expressão de MCP-1 aumentada no momento da luteólise (BOWEN et al., 1999). Os macrófagos e linfócitos ativados no CL secretam citocinas. As citocinas podem participar tanto positiva como negativamente na regulação endócrina do CL. Em suínos, o sinal modulador de TNF sobre os efeitos da PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , alternando de luteoprotetor para luteolítico foi descrito por Wuttke et al (1997). Por outro lado as citocinas podem mediar ações da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  durante a luteólise, como o aumento da fosfolipase A<sub>2</sub>, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadear a apoptose (WU & CARLSON, 1990).

Conforme relatado no CL de bovinos (ZHENG et al., 1994) e suínos (BACCI et al., 1996), a apoptose é uma forma fisiológica de morte, distinguível de necrose por diferentes parâmetros morfológicos e bioquímicos (DAVIS & RUEDA, 2002). Ela é regulada por proteínas que podem originar uma cascata de sinalização intrínseca e extrínseca (KLIEM et al., 2009). A via intrínseca é regulada por estímulos apoptóticos causados dentro de uma célula, em resposta à drogas, radiação ou fatores de crescimento. Em primeiro lugar, alterações na permeabilidade mitocondrial são mediadas através de um desequilíbrio na proporção pró-apoptótica e anti-apoptótica da

família Bcl-2 (ADAMS & CORY, 1998). A via apoptótica extrínseca, por sua vez, é ativada por fatores extracelulares, como TNF e FASL após atuar em seus receptores TNFR1 e FAS, conhecidos como receptores de morte (NAGATA, 1997).

A apoptose tem sido relacionada a luteólise em equinos, após regressão natural ou induzida com PGF $2\alpha$  (AL-ZI'ABI et al., 2002). Ela é controlada através da expressão de uma série de genes reguladores, tais como os membros da família Bcl-2 (TILLY., 1996).

### 3. ARTIGO

#### **A inflamação uterina interfere na luteogênese da égua?**

Henrique Kurtz Löff, Augusto Rafael Castro Fróis, Rodrigo Costa Mattos

REPROLAB – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **Resumo**

Após a ovulação do folículo ovulatório na égua, ocorre a formação do corpo lúteo (CL). Esta glândula endócrina transitória é responsável pela produção de progesterona (P4), necessária para a manutenção da gestação. O objetivo deste trabalho foi verificar a dosagem de P4 plasmática após inseminação com duas concentrações espermáticas, infecção experimental, infusão de leite desnatado e querosene no início da fase lútea. Nossa hipótese sugere que durante a formação do CL, inflamações uterinas de diferentes severidades provocam diminuição da concentração de P4 plasmática nos primeiros dias de diestro. Para tal, foram utilizadas 100 éguas que foram rufiadas diariamente e o crescimento folicular monitorado por palpação retal e ultrassonografia. Ao se detectar comportamento de estro e folículo dominante (> 35 mm) com redução do grau de edema uterino as éguas receberam 1500 UI de hCG (Dia -1). Após 24hs da indução da ovulação (Dia 0) as éguas foram palpadas e as que continuaram com folículo dominante foram distribuídas aleatoriamente em cada um dos seguintes grupos inflamatórios: STREPTO – infundidas com *Streptococcus zooepidemicus* no D0; INF-D1 – infundidas com querosene no dia da ovulação (D1); INF-D3 – infundidas com querosene 2 dias após a ovulação (D3); IA-100 – inseminadas com  $100 \times 10^6$  de espermatozoides no D0; IA-1000 – inseminadas com  $1 \times 10^9$  de espermatozoides no D0; LEITE – infundidas com leite desnatado no D0; CONTROLE – sem infusão. Desde a comprovação da ovulação (D1) foi realizada coleta de sangue e repetida a cada 24

horas, por seis dias, para verificar a dosagem de P4 plasmática. Observa-se que as éguas dos grupos STREPTO, INF-D1 e IA-100 apresentaram uma diminuição significativa da concentração plasmática de P4 entre D3 e D6 em relação ao CONTROLE. Já as éguas dos grupos INF-D3, IA-1000 e LEITE não se diferenciaram do CONTROLE. O processo inflamatório durante a formação do CL pode ter resultado num efeito sub-luteogênico, interferindo na formação do CL e conseqüentemente nos níveis de P4 plasmática. Os resultados observados permitem afirmar que a hipótese sugerida foi confirmada. O grau de inflamação no momento da formação do CL afeta a concentração de P4. Conclui-se que inflamações durante a formação do CL afetam a concentração plasmática de P4.

**Palavras-chave.** égua, inflamação uterina, progesterona plasmática, corpo lúteo.

### **Does uterine inflammation interfere in the luteogenesis of the mare?**

#### **Abstract**

After the ovulation of the ovulatory follicle in the mare, the formation of the corpus luteum (CL) occurs. This transitory endocrine gland is responsible of producing progesterone (P4), needed for the maintenance of the gestation. The objective of this study was to verify the P4 plasmatic dosage after insemination with two sperm concentrations, experimental infection, infusion of skim milk and kerosene in the beginning of luteal phase. Our hypotheses suggests that during the CL formation, uterine inflammations of different degrees of severity cause the decrease of plasmatic P4 concentration in the first days of diestrus. For such, 100 mares that were daily teased were used and the follicular growth monitored by rectal palpation and ultrasound. When detected oestrous and dominant follicle (>35mm) behavior with a decrease of uterine edema degree the mares received 1500 UI of hCG (Day -1). After 24hs of the ovulatory induction (Day 0) the mares were palpated and the ones that continued with dominant

follicle were randomly distributed into each one of the following groups: STREPTO – infused with *Streptococcus zooepidemicus* in D0; INF-D1 – infused with kerosene on the day of ovulation (D1); INF-D3 – infused with kerosene 2 days after ovulation (D3); IA-100 – inseminated with  $100 \times 10^6$  of spermatozoids on D0; IA-1000 – inseminated with  $1 \times 10^9$  of spermatozoids on D0; MILK – infused with skim milk on D0; CONTROL – no infusion. Since verification of ovulation (D1) blood sample was taken again every 24 hours, for 6 days, to check the plasmatic P4 dosage. It was observed that the mares of the groups STREPTO, INF-D1 and IA-100 showed a significant decrease of P4 plasmatic concentration between D3 and D6 compared to CONTROL. However the mares of the groups INF-D3, IA-1000 and MILK did not differentiate from CONTROL. The inflammatory process during the CL formation may have resulted in a sub-luteogenic effect, interfering in CL formation and consequently in the P4 plasmatic levels. The results observed allow confirmation of the suggested hypotheses. The inflammation degree in the moment of CL formation affects the P4 concentration. It is concluded that inflammations during CL formation affect the P4 plasmatic concentration.

**Key words.** mare, uterine inflammation, plasmatic progesterone, corpus luteum.

## INTRODUÇÃO

A ovulação do folículo ovariano na égua é seguida pela formação do corpo lúteo (CL) (NISWENDER & NETT,1993), uma glândula endócrina transitória que produz progesterona (P4) (JABLONKA et al., 1993). Este processo essencial para o desenvolvimento luteal é caracterizado pela proliferação e diferenciação das células derivadas do folículo pós ovulatório (JABLONKA et al., 1993).

Durante o ciclo estral uma extensa angiogênese ocorre no CL. Esta neovascularização é essencial para suprir o substrato necessário para a biossíntese de P4 pelas células luteais (HANSEL & BLAIR, 1996). Na égua as mudanças do fluxo sanguíneo no CL e o nível de P4 no plasma estão correlacionados e aumentam nos primeiros dias após a ovulação; a circulação no CL alcança seu máximo no dia 5 e a concentração de P4 no sangue periférico no dia 7. A circulação sanguínea desempenha um papel vital para a ocorrência de uma função apropriada do CL (BOLLWEIN et al., 2002).

O Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produto secretório de macrófagos ativados é um potente indutor de angiogênese (LEIBOVICH et al., 1987). Durante a fase lútea inicial o TNF aparentemente encontra-se envolvido na regulação do crescimento do CL promovendo um efeito estimulatório na produção de P4 e na PGE2 e um efeito inibitório na secreção de PGF2 $\alpha$  (GALVÃO et al., 2012a).

A secreção normal de P4 pelo CL é necessária para a manutenção da prenhez (NISWENDER & NETT,1993). A produção de P4 e o tamanho do CL são maiores nas éguas prenhes do que nas vazias no oitavo e nono dia pós-ovulação (SEVINGA et al.,

1999). Em vacas com baixa dosagem de P4 o CL é de menor tamanho e há uma diminuição do fluxo sanguíneo luteal (LUTTGENAU et al., 2011). Já éguas com morte embrionária precoce apresentam menores níveis de P4 circulante do que éguas que mantêm a gestação (ADAMS et al., 1987).

É comumente aceita a ideia de que a luteólise pode ser consistentemente induzida com uma dose de PGF2 $\alpha$  após o quinto ou sexto dia pós-ovulação (SAMPER, 2008). Com base nessa prática, erroneamente se assumiu que o CL é refratário à ação luteolítica da PGF2 $\alpha$  antes desse período, existindo, entretanto, um efeito antiluteogênico da PGF2 $\alpha$  no início do período pós-ovulatório (COFFMAN et al., 2014). A aplicação de prostaglandina nos primeiros dois dias pós-ovulação provoca uma diminuição na progesterona circulante (TROEDSSON et al., 2000; NIE et al., 2003), promove a lise do CL (HOLLAND & PINTO, 2008; RUBIO et al., 2008) e reduz as taxas de prenhez em relação às éguas não tratadas (TROEDSSON et al., 2000). Também em vacas a aplicação de PGF2 $\alpha$  durante os primeiros quatro dias pós-ovulação promove uma diminuição na duração do ciclo estral e na dosagem de P4 (BEAL et al., 1980).

Processos inflamatórios uterinos na égua são responsáveis pelo aumento da secreção de PGF2 $\alpha$  (NEELY et al., 1979). A infusão de leite desnatado e a concentração espermática na dose inseminante provocam uma resposta inflamatória no útero de éguas (FIALA et al., 2007). Infecções uterinas perturbam o crescimento folicular e provocam a formação de um CL menor produzindo menos progesterona em vacas de leite (WILLIAMS et al., 2007). Da mesma forma, a inflamação uterina induzida após a infusão de iodo-povidona pós-ovulação interfere na dosagem de progesterona

plasmática e na expressão de receptores para progesterona nas éguas tratadas em relação às éguas não tratadas (KALPOKAS et al., 2010).

Nossa hipótese sugere que durante a formação do CL, inflamações uterinas de diferentes severidades provocam diminuição da concentração de progesterona plasmática nos primeiros dias de diestro.

O objetivo do trabalho foi verificar a dosagem de progesterona plasmática após inseminação com duas concentrações espermáticas, infecção experimental, infusão de leite desnatado e querosene no início da fase lútea.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas 100 éguas cíclicas da raça Crioula com fertilidade conhecida, pesando entre 350 e 400 kg e com idade variando entre 4 e 15 anos. As éguas utilizadas pertenciam a um rebanho comercial e eram solteiras – não foram cobertas no ano anterior, tinham sido cobertas na temporada anterior e não ficaram prenhes ou tiveram perda gestacional. Durante o experimento as éguas foram mantidas exclusivamente a campo sob condições similares de manejo e com acesso *ad libitum* à água. Utilizaram-se 3 garanhões com fertilidade comprovada com idade variando entre 5 e 15 anos, mantidos estabulados e alimentados com aveia, ração comercial e feno de alfafa e com

acesso *ad libitum* à água. Este experimento foi realizado entre os meses de novembro e janeiro durante as estações reprodutivas de 2012, 2013 e 2014 em uma propriedade localizada no município da Barra do Quaraí, RS e foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (processo nº 21249 de 17/9/2012).

### **Exames clínicos prévios**

As éguas candidatas ao experimento foram examinadas quanto à saúde reprodutiva, incluindo avaliação da conformação perineal, palpação retal, exame ultrassonográfico do trato genital e exame vaginal. A saúde reprodutiva, considerando-se ausência de secreções ao exame ultrassonográfico e vaginal, e a identificação prévia de um corpo lúteo foram critérios para a inclusão da égua no experimento.

### **Procedimentos experimentais**

As éguas foram rufiadas diariamente e o crescimento folicular monitorado por palpação retal e ultrassonografia (Aloka SSD 500, For Medical, Campinas, Brasil) por um único operador. Ao se detectar comportamento de estro e folículo dominante (> 35 mm) com redução do grau de edema uterino as éguas receberam 1500 UI de hCG (Chorulon, Intervet®) IV (Dia -1). Após 24hs da indução da ovulação (Dia 0) as éguas foram palpadas e as que continuaram com folículo dominante foram distribuídas aleatoriamente em cada um dos seguintes grupos inflamatórios:

STREPTO – infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus*, inflamação considerada de grau forte (KELLER et al., 2004) (n = 10);

INF-D1 – infusão intrauterina de querosene no dia da ovulação, inflamação considerada de grau forte (BRACHER et al., 1991) (n = 10);

INF-D3- infusão intrauterina de querosene 2 dias após a ovulação, inflamação considerada de grau forte (BRACHER et al., 1991) (n = 10);

IA-100 - inseminadas com  $100 \times 10^6$  espermatozoides, inflamação considerada de grau médio (FIALA et al., 2007) (n = 20);

IA-1000 - inseminadas com  $1 \times 10^9$  espermatozoides inflamação considerada de grau médio (FIALA et al., 2007) (n = 20);

LEITE – infusão intrauterina de leite desnatado inflamação considerada de grau fraco (FIALA et al., 2007) (n = 10) ;

CONTROLE- (n = 20) sem inflamação.

As éguas do grupo STREPTO foram infundidas com  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus* suspensos em 20 mL de solução salina (0,9%), com o uso de uma pipeta de inseminação, no útero (MATTOS et al., 1997) no dia 0. O *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* que foi utilizado, pertence ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Reprolab) e foi isolado de égua com sintomatologia clínica de endometrite (NEVES et al., 2007) e encontra-se estocado a  $-20$  °C. Antes da infusão as bactérias foram descongeladas em banho-maria a  $37$  °C, cultivadas em BHI por 24 horas ( $37$  °C) e cultivadas em placas de 100 mm de Agar sangue. As placas foram incubadas a  $37$  °C por 24 horas para permitir o crescimento

bacteriano. As placas foram lavadas com PBS para remover as colônias bacterianas. A suspensão bacteriana resultante foi filtrada para remover as partículas de Agar e resuspendida em PBS até uma concentração final de  $1 \times 10^9$  bactérias/mL. Para sua utilização 1 mL da suspensão foi diluída em 19 mL de solução salina (0,9%) e mantida a 5 °C até sua utilização.

As éguas do grupo INF D1 foram infundidas intrauterinamente com 20 mL de querosene (BRACHER et al., 1991) no Dia 1 enquanto que as éguas do grupo INF D3 foram também infundidas no Dia 3.

As éguas do grupo LEITE foram infundidas intrauterinamente com 20 mL de leite desnatado (Elegê - Brasil) no dia 0. As éguas do grupo IA-100 e IA-1000 foram inseminadas com sêmen fresco, depositado no corpo uterino no dia 0. Imediatamente antes da IA o sêmen foi coletado com vagina artificial modelo Hannover. As doses inseminantes de 20 mL contendo  $100 \times 10^6$  e  $1 \times 10^9$  de espermatozoides foram ajustadas com a utilização de leite desnatado em diluições superiores a 1 + 2 (sêmen + leite).

As éguas do grupo CONTROLE seguiram o protocolo até a indução da ovulação, não sendo inseminadas nem infundidas. A distribuição temporal dos grupos experimentais está expressa na Figura 1.

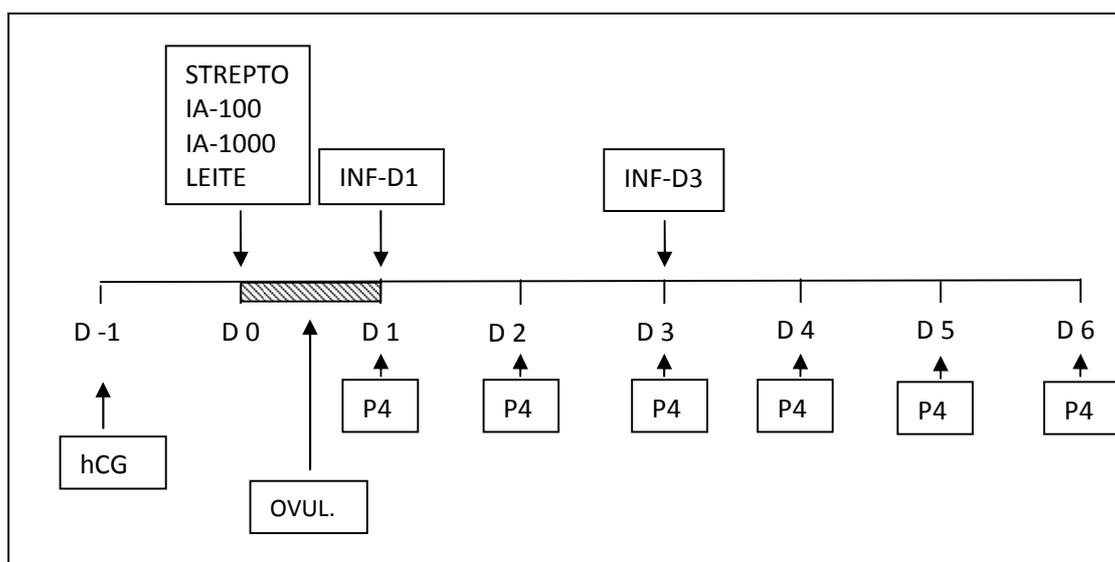


Figura 1 – Distribuição temporal da indução da ovulação, da realização dos tratamentos, da ovulação e das coletas das amostras para verificação da concentração de P4.

A partir da indução (D -1) todas as éguas foram examinadas a cada 24 horas até a comprovação da ovulação. Em todos os grupos experimentais foram utilizadas somente éguas com ovulação detectada no Dia 1 (24 a 48 horas após a indução). Foram excluídas do experimento éguas que ovularam antes ou após este período.

### **Coleta de sangue e dosagem de progesterona**

Desde o Dia 1 foi realizada coleta de sangue e repetida a cada 24 horas, por seis dias, para verificar a dosagem de progesterona plasmática. As coletas foram por venopunção, utilizando tubos a vácuo (Becton, Dickinson Vacutainer – Minas Gerais, Brasil) sem anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas a 500 X g por 20 minutos e o sobrenadante foi armazenado até o ensaio, a -20 °C, em tubos criogênicos estéreis com capacidade para 2 mL (Techno Plastic Products AG, Suíça). A concentração de progesterona foi determinada utilizando a técnica de quimioluminescência através do aparelho de automação IMMULITE 1000 Systems, SIEMENS. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio e a sensibilidade média foram 6.3%, 7.2%, e 0.13 ng/mL respectivamente.

### **Prenhez/Ciclo**

As éguas inseminadas (IA-100 e IA-1000) foram examinadas quanto à presença de vesícula embrionária no D14 por ultrassonografia (Aloka SSD 500, For Medical, Campinas, Brasil). Como só foi utilizado um ciclo por égua este valor representa prenhez/ciclo.

### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se o Statistical Analysis Software (SAS). Foi realizada Análise de Variância (LSM Least Squares Means) para comparar a concentração plasmática de progesterona de éguas submetidas aos grupos infusão de *Streptococcus*, de querosene no dia 1 e no dia 3 ou de leite, inseminadas com  $100 \times 10^6$  ou com  $1 \times 10^9$  e as do grupo controle durante os diversos dias de coleta e suas interações. O teste de Tukey-Kramer foi utilizado para verificar as diferenças existentes. Utilizou-se o Chi-Quadrado para se verificar diferenças de prenhez/ciclo entre os grupos IA-100 e IA-1000. Considerou-se  $P < 0,05$  como significativo.

## **RESULTADOS**

Foram realizadas concentrações plasmáticas de progesterona em 86 éguas. Amostras de quatorze éguas foram descartadas, 11 por terem as éguas ovulado após o

dia 1 e três por quebra dos frascos de coleta (n = 2) ou pela ocorrência de hemólise (n = 1). O número de éguas nos grupos experimentais ficou assim distribuído: CONTROLE n = 14, STREPTO n = 8, INF-D1 n = 10, INF-D3 n = 10, IA-100 n = 17, IA-1000 n = 15 e LEITE n = 10.

Na tabela 1 encontram-se expressas as médias e o erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona nos diferentes dias do experimento das éguas utilizadas conforme o seu grupo de tratamento.

Tabela 1. Valores médios e erro padrão da concentração de progesterona plasmática (ng/mL), dos grupos CONTROLE, STREPTO, INF-D1, INF-D3, IA-100, IA-1000 e LEITE.

Grupo	Progesterona (ng/mL)					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
CONTROLE	0,62±0,15	1,78±0,36	3,99±0,59	5,23±0,65	6,78±0,65	7,83±0,61
STREPTO	0,29±0,16	0,66±0,16	1,62±0,42	3,38±0,54	4,18±0,6	3,61±0,74
INF-D1	0,23±0,02	0,66±0,07	1,92±0,28	3,16±0,36	4,65±0,47	5,66±0,54
INF-D3	0,38±0,05	1,41±0,15	2,98±0,29	4,62±0,41	6,00±0,52	6,8±0,78
IA-100	0,62±0,12	0,91±0,09	2,22±0,22	3,82±0,38	4,29±0,39	5,05±0,49
IA-1000	0,49±0,04	1,19±0,14	3,00±0,45	4,13±0,53	5,68±0,61	7,23±0,75
LEITE	0,52±0,14	1,70±0,26	2,95±0,4	4,61±0,75	6,00±1,1	7,01±1,42

As concentrações plasmáticas de progesterona (P4), nos dias 1 a 6 do experimento, das éguas dos grupos CONTROLE e STREPTO estão expressas na Figura 2-A e as dos grupos CONTROLE, INF-D1 e INF-D3 na Figura 2-B. Ao se analisar a Figura 2-A observa-se que as éguas infectadas com *Streptococcus* apresentaram uma diminuição significativa da concentração plasmática de progesterona entre D3 e D6 em relação ao controle (D3 - P = 0,002; D4 - P = 0,01; D5 - P < 0,001 e D6 - P < 0,001) e a ocorrência de interação dia e tratamento (P < 0,001). Na Figura B observa-se que as éguas INF-D1 apresentaram uma diminuição significativa da concentração plasmática de progesterona entre D3 e D6 em relação ao controle (D3 - P = 0,004; D4 - P = 0,003; D5 - P = 0,002 e D6 - P = 0,001). Não se observaram diferenças (P > 0,05) entre as éguas INF-D3 e as éguas do grupo CONTROLE e as do grupo INF-D1, bem como não foi verificada interação dia e tratamento (P = 0,62) entre os grupos.

Na Figura 3-A estão descritas as concentrações plasmáticas de progesterona (P4), nos dias 1 a 6 do experimento, das éguas do grupo CONTROLE, IA-100 e IA- 1000 e na Figura 3-B as do grupo CONTROLE e LEITE. Ao se analisar a Figura 3-A observa-se que as éguas do grupo IA-100 apresentaram uma diminuição significativa da concentração plasmática de progesterona entre D3 e D6 em relação ao controle (D3 - P = 0,004; D4 - P = 0,01; D5 - P < 0,001 e D6 - P < 0,001) e a ocorrência de interação dia e tratamento (P = 0,05). Na Figura B observa-se que a P4 das éguas do grupo LEITE não se diferenciou em relação ao das éguas CONTROLE (P > 0,05) e não foi verificada interação dia e tratamento (P = 0,98) entre os grupos.

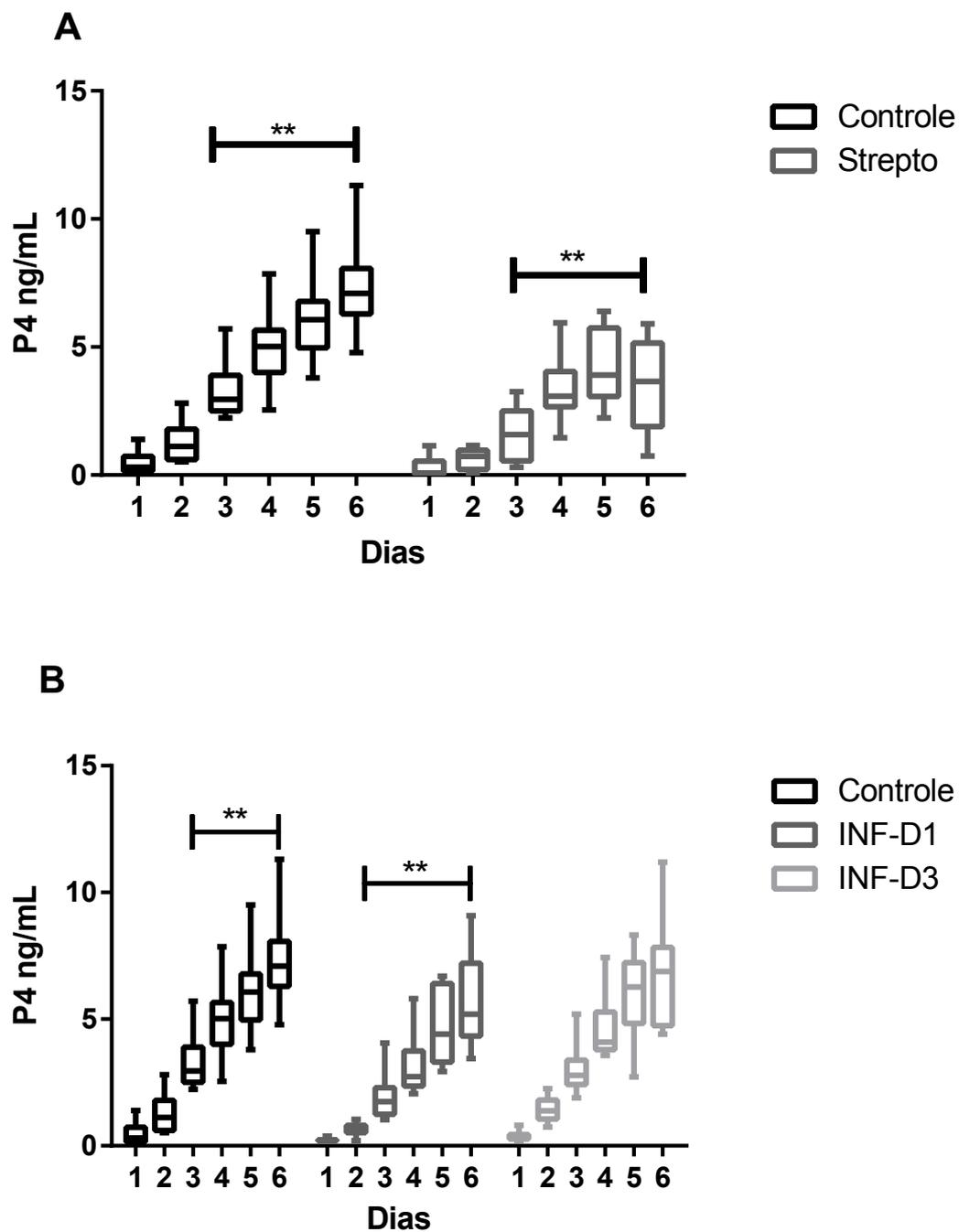


Fig. 2 Box plot da concentração plasmática de progesterona (P4) nos dias 1 a 6 do experimento das éguas (A) do grupo controle e infectadas com *Streptococcus* e das éguas (B) do grupo controle e infundidas nos dias 1 e 3 com querosene. (\*\* P < 0,01).

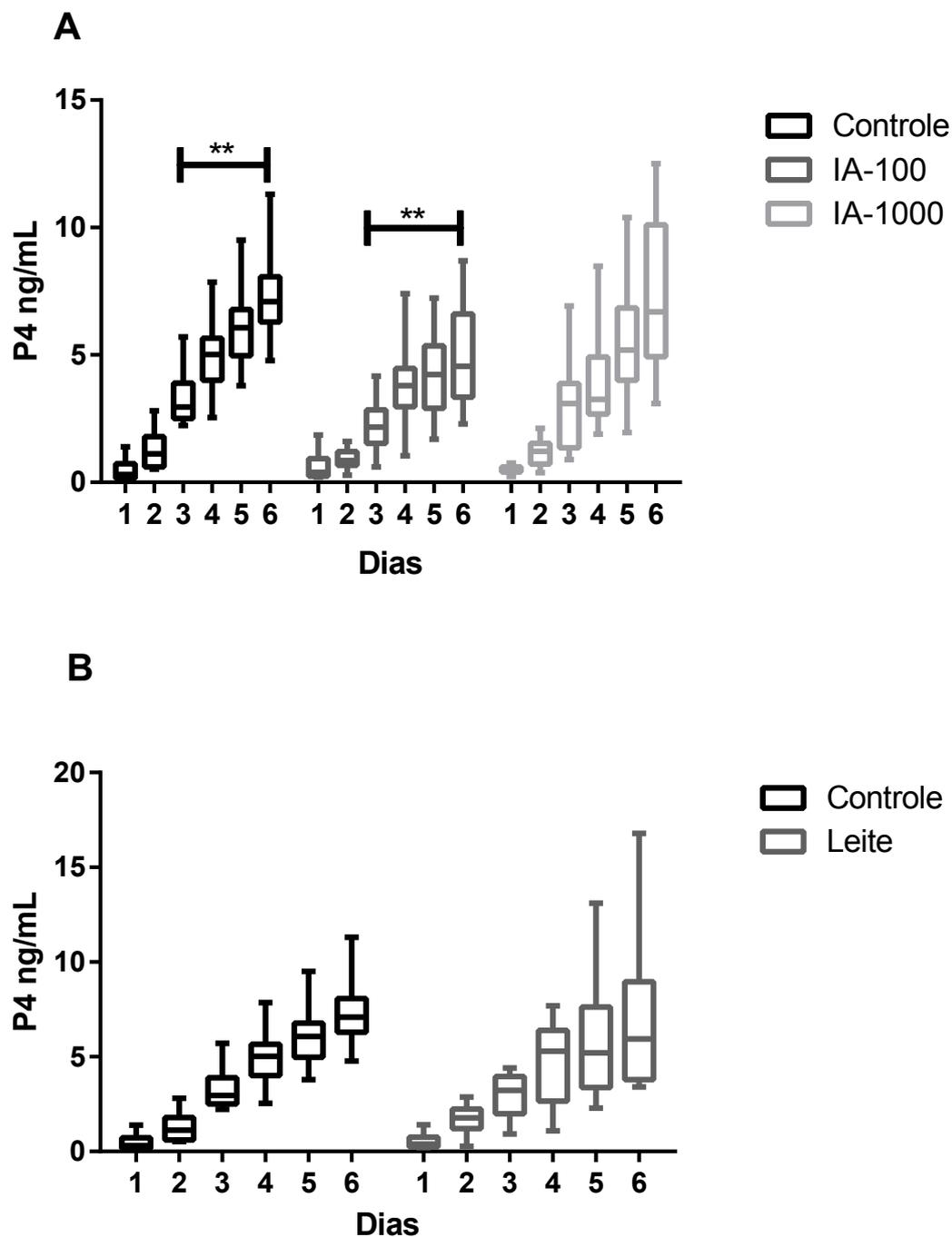


Fig. 3 Box plot da concentração plasmática de progesterona (P4) nos dias 1 a 6 do experimento das éguas (A) do grupo controle e inseminadas com  $100 \times 10^6$  e  $1 \times 10^9$  de espermatozoides e das éguas (B) do grupo controle e infundidas com leite. (\*\*  $P < 0,01$ ).

Observou-se diferença ( $P = 0,004$ ) na prenhez/ciclo entre as éguas do grupo IA-100 (35,3%) e as éguas do grupo IA-1000 (86,7%). Entretanto não se verificou ( $P = 0,07$ ) diferença na concentração de progesterona entre éguas prenhes e vazias nos diferentes dias nem interação dia e prenhez ( $P = 0,37$ ).

## **DISCUSSÃO**

No presente experimento verificou-se uma diminuição da concentração plasmática de P4 entre o D3 e o D6 nas éguas que compuseram os grupos STREPTO, INF-D1 e IA-100 em relação às do grupo CONTROLE. Porém, não se verificaram diferenças entre as éguas dos grupos LEITE, INF-D3 e IA-1000 em relação ao CONTROLE.

O endométrio de éguas vazias secreta  $PGF2\alpha$  em resposta a alterações inflamatórias causadas por infecção bacteriana ou infusão intrauterina de agentes irritantes, sendo a quantidade de  $PGF2\alpha$  liberada suficiente para diminuir a função lútea (DAELS et al., 1989). Da mesma forma, a aplicação de  $PGF2\alpha$  no início da fase lútea altera a formação do CL e conseqüentemente a concentração de P4 (TROEDSSON et al., 2000; NIE et al., 2003; BERGFELT et al., 2006). Nesse sentido a administração de múltiplas doses de  $PGF2\alpha$  no início do diestro pode alterar a função lútea, evidenciada pela mudança na concentração de progesterona plasmática por três diferentes vias. A primeira via é a indução da luteólise ou diminuição da função e concomitante declínio na concentração de progesterona plasmática. A segunda é a regressão luteal e

ressurgência, sendo caracterizadas pela diminuição na concentração plasmática de progesterona seguida pelo aumento até atingir concentrações maiores com variações no tempo de retorno ao estro. A terceira via é a anti-luteogênese, evitando a função lútea após a ovulação (COFFMAN et al., 2014).

Avaliando a concentração de P4 no presente experimento observou-se que ela aumentou significativamente com o transcorrer dos dias em todos os grupos experimentais. Portanto, as duas primeiras vias de ação da  $PGF2\alpha$  aparentemente não ocorreram neste experimento. Da mesma forma, não se evitou a função do corpo lúteo, pois ocorreu produção de P4 acima de 1 ng/mL (COFFMAN et al., 2014). Porém, o processo inflamatório durante a formação do CL pode ter resultado num efeito subluteogênico, interferindo na formação do corpo lúteo e conseqüentemente nos níveis de P4 plasmática.

Nos primeiros cinco dias do diestro as inflamações uterinas na égua aumentam significativamente a produção de  $PGF\ 2\alpha$  e de  $PGE\ 2$  (GAJOS et al., 2015). Com o início da inflamação ocorre, também, a liberação da potente citocina pró-inflamatória  $IL-1\beta$  que afeta a liberação de progesterona e promove a produção de prostaglandinas E e F e seus receptores no corpo lúteo (SIROTKIN, 2011).

Como a inflamação aguda pode causar danos ao tecido, ela deve ser mantida sob controle. O mesmo estímulo que induz a liberação dos mediadores pró-inflamatórios promove o aparecimento de mecanismos e de moléculas que atuam encerrando o processo inflamatório, tão logo ele deixe de ser necessário. Essas moléculas atuam inibindo a produção de citocinas, bloqueando receptores celulares ou induzindo a morte celular (MALSCHITZKY et al., 2007). Portanto, a Apolipoproteína A1 (APOA1),

proteína negativa de fase aguda com atividade anti-inflamatória apresenta maior abundância em éguas 12 horas após infecções experimentais (WOLF et al., 2012) e bloqueia ou inibe a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  *in vivo* (HYKA et al., 2001).

As células imunológicas são a fonte primária de PGE2 durante os processos inflamatórios (KALINSKI, 2012). Entretanto, a PGE2 altera a resposta das citocinas dos macrófagos e promove um fenótipo imunossupressor (AGARD et al., 2013), sendo os macrófagos, no corpo lúteo, a fonte primária de TNF- $\alpha$  (ZHAO et al., 1998).

Os macrófagos são também importantes no crescimento de vasos sanguíneos durante as inflamações, sendo que o TNF- $\alpha$  é um potente indutor de angiogênese (LEIBOVICH et al., 1987). A angiogênese parece ser controlada por fatores estimulantes e inibitórios que podem regular a vascularização lútea (REDMER et al., 1996; FERREIRA-DIAS et al., 2006). O fator de crescimento endotelial (VEGF) é o principal fator angiogênico encontrado no CL. Na égua o TNF- $\alpha$  regula o VEGF, estimula a angiogênese na formação do CL (AL-ZI'ABI et al., 2003; GALVÃO et al., 2012b). e a produção de P4 (GALVÃO et al., 2012a). Adicionalmente, o VEGF estimula a produção de P4 indicando que desempenha um papel no estabelecimento do Corpo Lúteo (GALVÃO et al., 2012b). Já, a aplicação de prostaglandina no quarto dia do ciclo promove uma redução do mRNA do VEGF, depois de quatro horas (ZALMAN et al., 2012).

Portanto, a inflamação no momento da luteogênese promove, entre outras substâncias, produção de PGE, PGF2 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e APOA1 que por diversas vias podem interferir na secreção e produção de TNF $\alpha$  e de VEGF interferindo na angiogênese e na produção de P4 pelo corpo lúteo em formação.

A progesterona, alguns fatores de crescimento e fatores angiogênicos estão envolvidos na sobrevivência lútea. Como o crescimento do CL e sua função endócrina são dependentes da formação de novos capilares, uma produção deficiente de P4 por insuficiência lútea pode estar relacionada a uma vascularização deficiente, resultando em morte embrionária precoce (REDMER et al., 1996).

No grupo STREPTO e INF-D1, inflamações fortes, foi verificado o efeito subluteogênico, ocorrendo uma diminuição da P4 desde o D3 em relação ao CONTROLE. Da mesma forma, a infusão intrauterina de iodo-povidona em éguas resultou na diminuição nos níveis de progesterona plasmática e na expressão dos receptores de progesterona (PR) comparado às éguas não tratadas (KALPOKAS et al., 2010). O momento da ocorrência destas inflamações pode ter afetado a formação do CL.

Entretanto, o grupo INF-D3, inflamação forte, não causou alteração na concentração de P4 em relação ao CONTROLE. Estes resultados estão de acordo com os verificados por NIE et al. (2003) que observaram que uma aplicação de cloprostenol, no mesmo dia que no presente experimento, apresentou uma concentração de P4 semelhante ao grupo não tratado. A luteogênese tem início durante o processo de maturação folicular final (WUTTKE et al., 1998) e é concluída três dias após a ovulação (NISWENDER & NETT, 1993), quando a máxima proliferação de vasos sanguíneos no CL é detectada (AL-ZI'ABI et al., 2003). Uma intensa neovascularização é observada no CL em formação e este fenômeno é modulado por diferentes fatores angiogênicos de origem ovariana e uterina (BERISHA et al., 2010). Portanto, provavelmente não houve alteração na concentração de P4 no grupo INF-D3 porque a inflamação iniciou após o fim da luteogênese.

Os dois grupos experimentais de inflamação média (IA-100 e IA-1000) apresentaram comportamentos antagônicos nas concentrações de P4 em relação ao CONTROLE. Curiosamente no grupo IA-100 a concentração de P4 foi afetada desde o D3 enquanto que IA-1000 não afetou a P4. Altas concentrações espermáticas provavelmente induzem uma forte quimiotaxia de PMN, levando a uma fagocitose rápida e eficiente de espermatozoides e bactérias, resultando em um processo inflamatório de curta duração (FIALA et al., 2007). Isto poderia explicar essa diminuição da dosagem de progesterona plasmática no grupo IA-100, pois menores agressões ao endométrio causam inflamações longas e residuais (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 2000b). Provavelmente, o tempo de duração da inflamação seja também um fator responsável pela diminuição da P4 circulante.

A inflamação fraca causada pelo LEITE não provocou alteração nas concentrações de P4 no início da fase lútea. Provavelmente este grau de inflamação não promove alterações sérias na luteogênese.

#### **4. CONCLUSÃO**

Conclui-se que o grau de inflamação uterina durante a fase lútea inicial afeta a concentração de progesterona. Portanto, inflamações uterinas durante a formação do corpo lúteo afetam a concentração plasmática de progesterona na égua.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. **Science**.v. 281, p. 1322 – 1326, 1998.

ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement 35, p. 445-454, 1987.

AL-ZI'ABI, M. O.; FRASER, H. M.; WATSON, E. D. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. **Reproduction**. v. 123, p. 67–77, 2002.

AL-ZI'ABI, M.O.; WATSON, E.D.; FRASER, H.M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**,v.125, p.259-270, 2003.

BACCI, M. L.; BARAZZONI, A. M.; FORNI, M.; COSTERBOSA, G. L. In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an early presence of DNA fragmentation. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 13, p. 361-372, 1996.

BEAL, W. E.; MILVAE, R. A.; HANSEL, W. Oestrous cycle length and plasma progesterone concentrations following administration of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  early in the bovine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement 59, p. 393-396, 1980.

BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; JI, S.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Changes in steady-state concentrations of messenger ribonucleic acids in luteal tissue during prostaglandin F<sub>2</sub> induced luteolysis in mares. **Animal Reproduction Science**. v. 90, p. 273-285, 2005.

BENYO, D. F.; PATE, J. L. Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. **Endocrinology**. v. 130, p. 854-60, 1992.

BERGFELT, D. R.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O.J. Regression and resurgence of the CL following PGF2 $\alpha$  treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology**. v.65, p.1605-1619, 2006.

BERGFELT, D. R.; ADAMS, G. P. Ovulation and corpus luteum development. In: Samper, J. C.; Pycocock, J. F.; McKinnon, A. O. **Current therapy in equine reproduction**. Philadelphia, W.B. Saunders, p. 1-13, 2007.

BERISHA, B.; MEYER, H.H.; SCHAMS, D. Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. **Biol Reprod.**, v.82, p.940-947, 2010.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**. v. 65, p. 2043-2051, 2002.

BOWEN, J. M.; TOWNS, R.; WARREN, J. S.; KEYES, P.L. Luteal regression in the normally cycling rat: apoptosis, monocyte chemoattractant protein-1, and inflammatory cell involvement. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 740–746, 1999.

BRACHER, V.; NEUSCHAEFER, A.; ALLEN, W. R. The effect of intra-uterine infusion of kerosene on the endometrium of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement 44, p. 706-707, 1991.

BRANNSTROM, M.; NORMAN, R. J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. **Human Reproduction**. v. 8, p. 1762–1775, 1993.

BRANNSTROM, M.; NORMAN, R. J.; SEAMARK, R. F.; ROBERTSON, S. A. Rat ovary produces cytokines during ovulation. **Biology of Reproduction**. v. 50, p. 88–94, 1994.

BRÄNNSTRÖM, M.; ENSKOG, A. Leukocyte networks and ovulation. **Journal of Reproduction and Immunology**. v. 57, p. 47–60, 2002.

CASLICK, E.A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell Veterinarian**. v.27, p.178-187, 1937.

CHANNING, C. P. Tissue culture of equine ovarian cell types: culture methods and morphology. **Journal of Endocrinology**. v. 43, p. 381–390, 1966.

COFFMAN, E. A.; PINTO, C. R. F.; SNYDER, H. K.; LEISINGER, C. A.; COLE, K.; WHISNANT, C. S. Antiluteogenic effects of serial prostaglandin F<sub>2α</sub> administration in cycling mares. **Theriogenology**. v.82, p. 1241-1245, 2014.

DAELS, P. F.; STABENFELDT, G. H.; KINDAHL, H.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of the reproductive cycle of the mare: a review. **Equine Veterinary Journal**. v. 21, p.29-34, 1989.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B.R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in Bioscience**. v. 7, p. 1949-1978, 2002.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2a</sub> production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 191, p.65-80, 2002.

DONG, Y. L.; GANGULA, P. R.; FANG, L. Nitric oxide reverses prostaglandin-induced inhibition in ovarian progesterone secretion in rats. **Human Reproduction**. v. 14, p. 27–32, 2000.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F<sub>2a</sub> on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**. v. 2, p. 265–268, 1972.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O.J. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins**. v. 11, p. 251-260, 1976.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A. S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; REDMER, D. A.; SKARZYNSKI, D. J. Proliferative processes within the equine corpus luteum may

depend on paracrine progesterone actions. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 57, p. 139-151, 2006.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A. S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A. J.; GALVÃO, A.; REDMER, D. A.; LUKASIK, K.; SZÓSTEK, A.Z.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; SKARZYNSKI, D. J.. Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E2 secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 40, p. 1-9, 2011.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**. v. 67, p. 556-562, 2007.

FRASER, H. M.; LUNN, S. F.; HARRISON, D. J.; KERR, J. B. Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and releasing-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. **Biology of Reproduction**. v. 61, p. 1468– 1479, 1999.

FRIDEN, B. E.; RUNESSON, E.; HAHLIN, M.; BRANNSTROM, M. Evidence for nitric oxide acting as a luteolytic factor in the human corpus luteum. **Molecular Human Reproduction**. v. 6, p. 397–403, 2000.

FRIEDMAN, A.; WEISS, S.; LEVY, N.; MEIDEN, R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 1905- 1912, 2000.

GAJOS, K.; KOZDROWSKI, R.; NOWAK, M.; SIEMIENIUCH, M. Altered secretion of selected arachidonic acid metabolites during subclinical endometritis relative to estrous cycle stage and grade of fibrosis in mares. **Theriogenology**. v. 84, p. 457-466, 2015.

GALVÃO, A. M. G. T. **New insights in the immuno-endocrine regulation of equine reproduction: *in vitro* studies on luteal and endometrial function**. Tese (Doutorado

em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, 2011.

GALVÃO, A.; SKARZYNSKI, D. J.; SZÓSTEK, A.; SILVA, E.; TRAMONTANO, A.; MOLLO, A.; MATEUS, L.; FERREIRA-DIAS, G. Cytokines tumor necrosis factor- and interferon- participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors. **Journal of Reproductive Immunology** v. 93, p. 28– 37, 2012a.

GALVÃO, A.; HENRIQUES, S.; PESTKA, D.; LUKASIK, K.; SKARZYNSKI, D.; MATEUS, L. M.; FERREIRA-DIAS, G. Equine Luteal Function Regulation May Depend on the Interaction Between Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor: An In Vitro Study. **Biology of Reproduction**. v. 86, p.1-9, 2012b.

GAYTAN, F.; MORALES, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J. E. Selective apoptosis of luteal endothelial cells in dexamethasone-treated rats leads to ischemic necrosis of luteal tissue. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 232–240, 2002.

GINTHER, O. J.; GARCIA, M. C.; SQUIRES, E. L.; STEFFENHAGEN, W. P. Anatomy of vasculature of uterus and ovaries in the mare. **American Journal Veterinary Research**. v. 33, p. 1561– 1568, 1972.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the mare: Basic and Applied Aspects**. 2<sup>a</sup> ed. Equiservices publishing. 1992.

GINTHER, O. J.; WOODY, C. O.; JANAKIRAMAN, K.; CASIDA, L. E. Effect of an intra-uterine plastic coil on the oestrous cycle of the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 12, p. 193– 198, 1996.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.20-27, 2006a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. ; BEG, M.A. Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. **Animal Reproduction**, v.3, p.29-40, 2006b.

GINTHER OJ, GASTAL EL, GASTAL MO, BEG MA. Effect of prostaglandin F2 on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. **Domest Anim Endocrinol.** v. 32, p. 315 – 328, 2007.

GINTHER, O. J.; RODRIGUES, B. L.; FERREIRA, J. C.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development.** v. 20, p. 684–693, 2008.

GINTHER, O. J.; SIDDIQUI, M. A.; BEG, M. A. Physiologic and nonphysiologic effects of exogenous prostaglandin F2 on reproductive hormones in mares. **Theriogenology** v. 72, p. 417– 424, 2009.

GINTHER, O. J. The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. **Theriogenology.** v. 77, p. 1042 – 1049, 2012.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. **Endocrine Reviews.** v. 18, p.502-519, 1997.

HANSEL, W.; BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: A historic overview and implications for future research. **Theriogenology.** v. 45, p. 1267-1294, 1996.

HENRICKS, D. M.; LONG, J.T.; HILL, J.R.; DICKEY, J.F. The effect of prostaglandin F2 $\alpha$  during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 41, p. 113–120, 1974.

HOLLAND, B. E.; PINTO, C. R. F. Luteal function and ovulation in mares treated with PGF2 $\alpha$  during early and mid-diestrus. **16th International Congress on Animal Reproduction**, Hungary, 2008.

HYKA, N.; DAYER, J.; MODOUX, C.; KOHNO, T.; EDWARDS III, C.; ROUX-LOMBARD, P.; BURGER, D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1b and tumor necrosis factor-a by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. **Blood.** v. 97, p.2381-2389, 2001.

JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**. v. 133, p. 1871–1879, 1993.

JAROSZEWSKI, J. J.; HANSEL, W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**. v. 22, p. 450–455, 2000.

JOHNSON, A. L.; BECKER, S.E.; ROMA, M. L. Effects of gonadotrophin-releasing hormone and prostaglandin F2 alpha on corpus luteum function and timing of the subsequent ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 83, p. 545-551, 1988.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **Journal of Immunology**. v. 188, p.21–28, 2012.

KALPOKAS, I., PERDIGÓN, F., RIVERO, R., TALMON, M., SARTORE, I., VIÑOLES, C. Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 52, p. 66-74, 2010.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. **Biol. Reprod. Mono.** v. 1, p. 515-518, 1995.

KEATOR, C. S.; SCHREIBER, D. T.; HOAGLAND, T. A.; MCCRACKEN, J. A. Luteotrophic and luteolytic effects of nitric oxide in sheep are dose-dependent in vivo. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 35, p. 74-80, 2008.

KELLER, A.; NEVES, A. P.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; SCHOON, H.; KLUG, E.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 32, p. 215-223, 2004.

KELLY, C. M.; HOYER, P. B.; WISE, M. E. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**.v. 84, p.593-600, 1988.

KINDAHL, H.; KNUDSEN, O.; MADEJ, A.; EDQVIST, L-E.. Progesterone, prostaglandin F2a, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. *Supplment*, 32, p. 353–359, 1982.

KLIEM, H.; BERISHA, B.; MEYER, H. H.; SCHAMS D. Regulatory changes of apoptotic factors in the bovine corpus luteum after induced luteolysis. **Mollecular Reproduction and Development**. v. 76, p. 220-230, 2009.

LAWLER, D. F.; HOPKINS, J.; WATSON, E. D. Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrous cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 117, p. 281-290, 1999.

LE BLANC, M. M.; JOHNSON, R. D.; CALDERWOOD MAYS, M. B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biology of Reproduction Monograph**. v. 1. P. 501-506, 1995.

LEIBOVICH, S. J.; POLVERINI, P. J.; SHEPARD, H. M.; WISEMAN, D. M.; SHIVELY, V.; NUSEIR, N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. **Nature**. v. 329, p.630-632, 1987.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Relatório Final**. CEPEA/ESALQ/USP. 2006.

LOEB, L. The effect of extirpation of the uterus on the life and function of the corpus luteum in the guinea pig. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 20, p. 441– 443, 1923.

LÜTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULBRICH, S. E.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**. v. 76, p. 12-22, 2011.

MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Endometrite na égua, novos conceitos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 31, p.17-26, 2007.

MATTOS, R.; CASTILHO, L. F. F.; MALSCHITZKY, E.; NEVES, A. P.; KELLER, A.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde**. v. 13, p. 521-524, 1997.

McCORMACK, J. T.; FRIEDERICHS, M. G.; LIMBACK, S. D.; GREENWALD, G. S. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence. **Biology of Reproduction**. v. 58, p. 255–260, 1998.

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

MILLER PA, LAUDERDALE JW, GENG S. Effects of various doses of prostin F2 alpha on estrous cycles, rectal temperature, sweating, heart rate and respiration rate in mares. **J Anim Sci**. v. 42, p. 901 – 911, 1976.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 29, p. 329–339, 2005.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**. v. 88, p. 355 – 365, 1997.

NEELY, D.P.; KINDAHL, I. I.; STABENFELDT, G. H.; EDQUIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mare: Physiological, pathophysiological, and

therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility.** (Suppl 27), p. 181-189, 1979.

NEVES, A. P.; KELLER, A.; TREIN, C. R.; MÖLLER, G.; JOBIM, M. I. M.; CASTILHO, L. F. F.; CARDOSO, M. R. I.; LEIBOLD, W.; ZERBE, H.; KLUG, E.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. **Animal Reproduction Science.** v. 97, p. 314-322, 2007.

NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W.; BRADEN, T. D. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. **Theriogenology.** v. 60, p.1111 -1118, 2003.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. **Equine Veterinary Journal.** v. 32, p. 164-166, 2000.

NISWENDER, D.; NETT, T. M. Luteal phase. In: Voss, J. L.; McKinnon, A. O. **Equine Reproduction.** Baltimore: Williams & Wilkins, p. 172- 175, 1993.

NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. Corpus luteum and its control in infraprimates species. In E. Knobil & J. D. Neill (Ed.) **The Physiology of Reproduction.** (pp. 781–816). New York: Raven, 1994.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews.** v. 80, p. 1-29, 2000.

PAAVOLA, L. G. The corpus luteum of the guinea pig. IV. Fine structure of macrophages during pregnancy and postpartum luteolysis, and the phagocytosis of luteal cells. **American Journal of Anatomy.** v. 154, p. 337-364, 1979.

PACCAMONTI, D. L.; RODRIGUEZ, H. F.; MYERS, M. W.; GODKE, R. A. Effect of PGF or hCG administration during the early luteal phase on progesterone secretion in

the mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**. v. 37, p. 151–159, 1991.

PASCOE, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.27(Supl.), p.299-305, 1979.

PATE, J. L. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. 49, p. 365–377, 1995.

POWELL, W. S.; HAMMARSTROM, S.; SAMUELSSON, B. Occurrence and properties of a prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  receptor in bovine corpora lutea. **European Journal of Biochemistry**. v. 56, p.73–77, 1975.

RAO, C. V. V. L.; ESTERGREEN, F. R.; CARMEN, JR.; MOSS, G. E. Receptors for gonadotrophin and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in bovine corpora lutea of early, mid and late luteal phase. **Acta Endocrinologica**. v. 91, p. 529 –537, 1979.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L.P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**. v. 1, p. 182-192, 1996.

RILEY, S.C.; GIBSON, A.H.; LEASK, R.; MAUCLINE, D.J.; PEDERSEN, H.G.; WATSON, E.D. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. **Reproduction**. v. 121, p. 553-560, 2001.

ROBERTO DA COSTA, R. P.; BRANCO, V.; PESSA, P.; SILVA, J. R.; FERREIRA-DIAS, G. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 659-666, 2005.

RUBIO, C.; PINTO, C. R.; HOLLAND, B. E.; DA SILVA JR. B. L.; LAYNE, S. A.; HEATON, L. H.; WHISNANT, C. S. Anti-luteogenic and luteolytic effects of PGF<sub>2</sub>a during the post-ovulatory period in mares. **Theriogenology**. v. 70, p. 576–591. 2008.

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

SEVINGA, M.; SCHUKKEN, Y. H.; HESSELINK, J. W.; JONKER, F. H. Relationship between ultrasonic characteristics of the corpus luteum, plasma progesterone concentration and early pregnancy diagnosis in Friesian mares. **Theriogenology**. v. 52, p. 585-592, 1999.

SIROTKIN, A. Cytokines: Signalling molecules controlling ovarian functions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 43, p.857-861, 2011.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; BAH, M. M.; DEPTULA, K. M.; BARSZCZEWSKA, B.; GAWRONSKA, B.; HANSEL, W.. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F<sub>2</sub>-induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**. v. 68, p.1674–1681, 2003.

SKARZYNSKI, D. J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; KORZEKWA, A.; BAH, M. M.; PIOTROWSKA, K.; BARSZCZEWSKA, B.; OKUDA, K. Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and l-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. **Biology of Reproduction**. v. 76, p. 619–627, 2008.

TILLY J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**. v. 1, p. 162-172, 1996.

TOWNSON, D. H.; PATE J. L. Mechanism of action of TNF- $\alpha$  -stimulated prostaglandin production in cultured bovine luteal cells. **Prostaglandins**. v. 52, p. 361–373, 1996.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I. K. M.; THURMOND, M. Function of uterine and blood derived polymorphonuclear neutrophils (PMN) in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection : Phagocytosis and chemotaxis. **Biol. Reprod.** v. 49, p. 507-514, 1993.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471, 1999.

TROEDSSON, M. H. T.; ABABNEH, M. M.; OHLGREN, A. F.; MADILL, S.; VETSCHER, N.; GREGAS, M. Effect of periovulatory prostaglandin F2a on pregnancy rates and luteal function in the mare. **Theriogenology**. v. 55, p. 1891–1899. 2000.

VAN NIEKERK C. H.; MORGENTHAL, J. C.; GERNEKE, W. H. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 23, p. 171-175, 1975.

VEGA, M.; URRUTIA, L.; INIGUEZ, G.; GABLER, F.; DEVOTO, L.; JOHNSON, M.C. Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro. **Molecular Human Reproduction**. v. 6, p. 681-687, 2000.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 88, p. 223-229, 1990.

WATSON, E. D.; PEDERSEN, H. G.; THOMSON, S. R.; FRASER, H. M. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. **Theriogenology**. v. 54, p. 599-609, 2000a.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 221-232, 2000b.

WATSON, E. D.; BAE, S. -E.; AL-ZI<sup>^</sup>ABI, M. O.; HOGG, C. O.; ARMSTRONG, D. G. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) during induced and natural regression of equine corpora lutea. **Theriogenology**. v. 64, p. 1371– 1380, 2005.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C. W.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**. v. 68, p. 549-559, 2007.

WILTBANK, M.C.; SHIAO, T. F.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**. v. 52, p. 74-78, 1995.

WOLF, C. A.; MASLCHITZKY, E.; GREGORY, R. M.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. **Theriogenology**. v. 77, p. 1351-1359, 2012.

WU, X. M.; CARLSON, J. C. Alterations in phospholipase A2 activity during luteal regression in pseudopregnant and pregnant rats. **Endocrinology**. v. 127, p. 2464–2468, 1990.

WUTTKE, W.; PITZEL, L.; KNOKE, I.; THEILING, K.; JARRY, H. Immune-endocrine interactions affecting luteal function in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 52, p. 19-29, 1997.

WUTTKE, W.; THEILING, K.; HINNEY, B.; PITZEL, L. Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. *Steroids*, v. 63, p. 299–305, 1998.

ZALMAN, Y.; KLIPPER, E.; FARBEROV, S.; MONDAL, M.; WEE, G.; FOLGER, J.; SMITH, G.; MEIDAN, R. Regulation of Angiogenesis-Related Prostaglandin F2alpha-Induced Genes in the Bovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**. v. 86, p. 1-10, 2012.

ZHAO, Y.; BURBACH, J.; ROBY, K.; TERRANOVA, P. F.; BRANNIAN, J. D. Macrophages Are the Major Source of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in the Porcine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 1385-1391, 1998.

ZHENG, J.; FRICKE, P. M.; REYNOLDS, M. P.; REDMER, D. A. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**. v. 51, p. 623-632, 1994.