

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

DINÂMICA OVARIANA E UTERINA EM ÉGUAS DA RAÇA
CRIOLA DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA

Autora: Luzia Hallal Duval

Porto Alegre, RS/Brasil

2017

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

DINÂMICA OVARIANA E UTERINA EM ÉGUAS DA RAÇA
CRIOLA DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA

LUZIA HALLAL DUVAL

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sandra Mara Fiala Rechsteiner

Porto Alegre, RS/Brasil

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Duval, Luzia Hallal

Dinâmica ovariana e uterina em éguas da raça Crioula durante a estação reprodutiva / Luzia Hallal Duval. -- 2017.

65 f.

Orientadora: Sandra Mara Fiala Rechsteiner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,

Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Dinâmica folicular. 2. Dinâmica uterina. 3. Éguas Crioulas. I. Rechsteiner, Sandra Mara Fiala, orient.

II. Título.

LUZIA HALLAL DUVAL

**DINÂMICA OVARIANA E UTERINA EM ÉGUAS DA RAÇA
CRIOULA DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA**

APROVADO POR:

Prof^a Dra. Sandra Mara Fiala Rechsteiner

Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Leite Gastal

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, o meu exemplo e grande incentivador pelo amor aos cavalos e à minha mãe, meu porto seguro e exemplo de força para eu seguir em busca dos meus objetivos.

Às minhas irmãs Eduarda, Luciana e Marina, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando à seguir lutando ao que me faz feliz. Aos meus cunhados Egbert, Paulo José e Rafael, por fazerem parte da minha família.

Ao meu namorado Antônio Carlos Gasparetto, por estar todos os dias ao meu lado me incentivando, encorajando e multiplicando comigo a vida.

À professora Sandra Mara Fiala Rechsteiner pelos ensinamentos, oportunidades proporcionadas, companheirismo e amizade desde o início da graduação.

Aos professores Eduardo Leite Gastal e Melba Gastal pelos ensinamentos, orientação e apoio.

Às amigas do Reprolab Anita Pimentel, Carla Coelho e Johana Buitrago pelo companheirismo e ajuda durante todo o período de mestrado.

Aos meus queridos estagiários e amigos que me acompanharam e auxiliaram durante o período experimental.

À ABCCC pelo apoio na realização deste estudo.

Aos cavalos, seres magníficos, produtores de amor à todos que, um dia, já tiveram a felicidade de compartilhar algum momento com eles. Animal que me encanta e me hipnotiza, que me ensina e que é o meu grande incentivador a exercer essa linda profissão que é a Medicina Veterinária.

Por fim e mais importante, à Deus. A quem eu agradeço todos os dias pela minha existência e por me permitir estar aqui.

DINÂMICA OVARIANA E UTERINA EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA

RESUMO

O cavalo Crioulo é originário de raças de cavalos espanhóis trazidos há quatro séculos e reproduziu-se livremente no sul do continente da América. A seleção natural que ocorreu durante séculos fez o cavalo Crioulo ser conhecido por sua rusticidade e resistência, o que pode ter influenciado positivamente a fertilidade e longevidade desta raça, mas informações sobre fertilidade e performance reprodutiva da égua Crioula sob manejo natural ou controlado ainda são escassas. Os objetivos do presente estudo foram: (1) elucidar a dinâmica folicular das éguas Crioulas; (2) caracterizar o desenvolvimento e a regressão do corpo lúteo; e (3) estudar as mudanças de tônus e de ecotextura uterina ultrassonográfica durante dois ciclos estrais consecutivos. No experimento, 26 intervalos interovulatórios (IIO) foram estudados em 13 éguas. O ciclo estral natural foi caracterizado por: (i) o comprimento do IIO foi de 21 dias; (ii) os folículos dominante e subordinado emergem juntos no dia 5 e a taxa de crescimento é lenta até o momento da divergência; (iii) a divergência folicular ocorreu quando o folículo dominante atingiu o diâmetro de 22mm; (iv) o diâmetro pré-ovulatório foi de 43 mm; (v) o corpo lúteo atingiu o tamanho máximo 1,5 dias depois da ovulação e no dia 15 já não pode ser mais visualizado por ultrassonografia transretal; e (vi) a forte correlação de repetibilidade demonstrou que o tônus uterino e cervical podem ser usados para determinar a fase do ciclo estral. Os resultados apresentados neste trabalho possuem grande importância para melhor compreensão das características reprodutivas naturais do ciclo estral da égua Crioula.

Palavras chaves: dinâmica folicular, dinâmica uterina, égua crioula

OVARIAN AND UTERINE DYNAMICS IN CRIOLLO BREED MARES DURING THE REPRODUCTIVE SEASON

ABSTRACT

The Criollo horse originates from breeds of Spanish horses that were brought four centuries ago and reproduced freely in the southern part of the American continent. The natural selection that occurred over the centuries made the Criollo horse known for its roughness and resistance, which may have influenced positively the fertility and longevity of this breed, but information regarding fertility and reproductive performance of Criollo breed mare under natural or controlled management conditions is scarce. The objectives of the present study were to: (1) elucidate the follicular dynamics of Criollo breed mares; (2) characterize growth and regression of the corpus luteum; and (3) study the tone and ultrasonographic uterine echotexture changes during two consecutive estrous cycles. In this trial, 26 interovulatory intervals (IOI) were evaluated in 13 mares. The spontaneous estrous cycles were characterized by: (i) the length of the IOI was 21 days; (ii) dominant and subordinate follicles emerge together at day 5 and their growth rate were slower until the deviation moment; (iii) deviation occurred when the dominant follicle has achieved 22 mm; (iv) diameter of the preovulatory follicle was 43 mm; (v) corpus luteum has achieved its maximum diameter 1.5 days after ovulation and at day 15 it can no longer be visualized by transrectal ultrasonography; and (vi) the strong correlation for repeatability demonstrated that the uterine and cervical tonus can be used to determine the phase of the estrous cycle. The results presented are of fundamental importance for a better understanding of the reproductive physiological patterns of the estrous cycle in the Criollo mare.

Keywords: follicle dynamics, uterine dynamics, criollo mares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. A raça Crioula.....	6
2.2. Ciclo reprodutivo da égua	7
2.3. Cronologia dos estudos sobre dinâmica folicular em éguas.....	10
2.4. Dinâmica folicular	12
2.5. Dinâmica uterina e cervical	15
2.6. Dinâmica do corpo lúteo e luteólise	16
2.7. Interação hormonal no ciclo estral.....	17
2.8. Éguas como modelo experimental.....	20
3. Artigo	23
4. Referências bibliográficas.....	51

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista social e econômico, a raça Crioula é considerada um dos pilares da indústria brasileira de criação de equídeos (ABCCC, 2014a). No Rio Grande do Sul, os cavalos da raça Crioula têm papel cultural importante por esses animais serem genuinamente originados na região do Pampa (GIANLUPPI *et al.*, 2009). Trazidos por espanhóis durante a colonização da América, os cavalos Crioulos reproduziram-se de forma livre pelo sul do continente, tornando-se extremamente adaptados à região (TEIXEIRA, 2011; PONS, 1993). A raça Crioula possui ativo mercado de leilões de animais, e um grande número de potros nascidos e inscritos anualmente. Deve-se ressaltar que são poucos os trabalhos científicos com esta raça (KURTZ e LÖF, 2007).

O período de atividade sexual é compreendido por ciclos com duração média de 21 a 22 dias em éguas e 24 dias em pôneis (GINTHER, 1992). Durante cada ciclo, observa-se o desenvolvimento e a regressão folicular, que ocorrem de forma dinâmica (CUNNINGHAM, 2004). Entende-se por dinâmica folicular um processo contínuo de crescimento e atresia de folículos nos ovários, sendo diretamente influenciada por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo. Assim, é fundamental compreender a dinâmica folicular da espécie estudada para a manipulação do ciclo estral e, conseqüentemente, a aplicação de biotecnologias reprodutivas (GURGEL *et al.*, 2008).

Enquanto os roedores são utilizados em laboratórios como modelo experimental para algumas pesquisas, no contexto da dinâmica folicular, eles oferecem poucas vantagens aos estudos em humanos e mamíferos maiores (MILLIGAN *et al.*, 1980). Já a égua é um bom modelo experimental devido ao grande tamanho folicular, ao fácil

controle da dinâmica folicular e também da ecotextura uterina (GINTHER, 1995). A semelhança entre as éguas e as mulheres nas ondas foliculares e nas taxas de crescimento entre o futuro folículo dominante e outros folículos da onda sustentam a conclusão de que a égua é um bom modelo para estudos comparativos da foliculogênese feminina (GINTHER *et al.*, 2004a).

A dinâmica folicular é analisada através da ultrassonografia transretal. Tal procedimento permite o acompanhamento do desenvolvimento e regressão folicular, do processo ovulatório e do desenvolvimento, manutenção e regressão do corpo lúteo de forma não invasiva (GINTHER e PIERSON, 1984). Assim, o objetivo do presente estudo foi: (1) elucidar a dinâmica folicular das éguas da raça Crioula; (2) caracterizar o crescimento e regressão do corpo lúteo; e (3) estudar as mudanças de tônus e de ecotextura uterina durante as diferentes fases do ciclo estral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A raça Crioula

Representando um papel de grande importância na cultura do Rio Grande do Sul, os cavalos da raça Crioula são originados na região do Pampa (GIANLUPPI *et al.*, 2009). São animais descendentes de raças espanholas, trazidos por colonizadores à América. O cavalo que aportou na América era a mais desenvolvida ferramenta de guerra existente na época. A partir do século XVII, muitos cavalos foram perdidos ou abandonados, reproduzindo-se de forma livre pelo sul do continente. Na região das cordilheiras e pampas, formaram-se manadas extremamente bem adaptadas à região devido à seleção natural ao longo de quatro séculos (TEIXEIRA, 2011; PONS, 1993). No final do século XIX e início do século XX, criadores argentinos, uruguaios e brasileiros começaram a conscientizarem-se da importância e da qualidade dos cavalos que habitavam suas propriedades e deram início à recuperação destes animais, contribuindo assim, para a formação da raça Crioula. Como consequência, esta nova raça passou a ser preservada, conquistando notoriedade a partir do século XX, quando várias associações foram criadas, comprovando o valor do cavalo Crioulo (ABCCC, 2014b).

Os cavalos da raça Crioula são considerados pôneis devido à sua altura, que varia entre de 1,40 a 1,50m nos machos e 1,38m a 1,48m nas fêmeas. A raça Crioula no Brasil possui um expressivo *Studbook* e um grande mercado de leilões de animais, além de um grande número de animais nascidos e inscritos anualmente (KURTZ e LÖF, 2007). O cavalo Crioulo está distribuído por todo território nacional e conta com mais de 310 mil animais, movimentando anualmente mais de 1,28 bilhão de reais (ABCCC, 2014a).

Com a valorização da raça, os animais foram destinados à reprodução independente dos problemas de fertilidade existentes (FIALA *et al.*, 2012). Em um estudo retrospectivo de três anos utilizando o manejo de monta controlada foi obtida uma taxa de prenhez de 80,9%, sendo que 15,5% das éguas tinham, no momento da cobertura, mais de 20 anos, e destas 55,6% destas emprenharam (DUVAL *et al.*, 2011). Em outro estudo retrospectivo de 28 anos de manejo reprodutivo de monta natural, a taxa de prenhez média foi de 85,3%, havendo diferença significativa na taxa de prenhez em função da idade (DUVAL *et al.*, 2012). Entretanto ainda há pouca informação disponível sobre a fertilidade, dados sobre o desempenho reprodutivo na raça são escassos e estudos sobre a dinâmica folicular e uterina são inexistentes.

Analisando o mercado e a indústria do cavalo, justifica-se a realização de pesquisas na área, já que essa atividade envolve um significativo impacto econômico (KURTZ e LÖF, 2007), tornando-se assim, necessária a utilização de biotécnicas reprodutivas que auxiliem e melhorem a criação, gerando e multiplicando produtos de alto valor zootécnico.

2.2. Ciclo reprodutivo da égua

A égua possui atividade reprodutiva influenciada pela estação do ano, sendo considerada uma espécie poliéstrica estacional, apresentando ciclos estrais nos meses de maior intensidade luminosa - primavera e verão (SHARP, 1980).

O ciclo reprodutivo das éguas pode ser definido em duas estações distintas: a anovulatória e a ovulatória, interligadas por períodos denominados transicionais (BAKER e KENNEY, 1980). A estação anovulatória é caracterizada como o período em que menos de 20% das éguas estão ciclando e no Rio Grande do Sul (TAROUCO *et al.*, 1994) compreende os meses de outono e inverno, com duração variável de 40 dias a

oito meses, principalmente de acordo com a localização geográfica (HUGHES *et al.*, 1975). A proximidade da primavera coincide com o início da atividade ovariana, quando estros anovulatórios normalmente ocorrem (OSBORNE, 1966). Com o aumento da duração do dia, ocorre o aumento do número e do diâmetro dos folículos. A primeira ovulação da temporada reprodutiva pode demorar entre 2 a 3 meses devido ao crescimento e regressão folicular. Este período é denominado de período transicional (GINTHER, 1979).

Durante o período transicional, folículos crescem e regridem antes de chegar à aproximadamente 40mm, entretanto uma nova onda folicular - ovulatória ou não - só emerge quando o maior folículo entra em uma fase de platô ou regride (GINTHER, 1990). O folículo dominante possui características que causam a regressão e bloqueiam a emergência de uma nova onda folicular. Desse modo, durante o período transicional ocorre uma falha na secreção de FSH durante o crescimento do maior folículo, o que possibilita a emergência de uma nova onda folicular (GINTHER, 1979). Além disso, a taxa de crescimento folicular é menor na primeira ovulação da temporada do que na segunda, o diâmetro ovulatório é maior na primeira ovulação e podem ocorrer distúrbios ovulatórios (ex: folículo hemorrágico) (PIERSON e GINTHER, 1987). Estes acontecimentos podem estar relacionados com o perfil do LH no início da temporada reprodutiva (FREEDMAN *et al.*, 1979). A ovulação marca o começo da estação ovulatória, que corresponde ao final da primavera e verão, onde a maioria das éguas apresentam ciclos em intervalos regulares e desenvolvem estros ovulatórios (OSBORNE, 1966).

O esclarecimento do ciclo estral das éguas, assim como sua manipulação é de grande importância para o emprego de técnicas reprodutivas (ROMANO *et al.*, 1998). O ciclo estral possui duração média de 21 a 22 dias em éguas e 24 dias em pôneis

(GINTHER, 1992) e é constituído por duas fases distintas, o diestro e o estro (HUGHES *et al.*, 1975). O comprimento do diestro se mantém relativamente constante em 14-15 dias, não sofrendo muita alteração (ADAMS e BOSU, 1988), entretanto o estro é diminuído no pico da estação reprodutiva (PALMER, 1978).

O estro ou fase folicular é definido pela presença de um folículo dominante no ovário, cujas células da granulosa produzem altos níveis de estrógenos (GINTHER, 1992). O estrógeno é responsável pela demonstração de sinais de estro, como a aceitação da aproximação do garanhão, como também a formação do edema uterino (BURATINI, 1997). A ovulação ocorre em 78% das éguas 48 horas antes do fim do estro (HUGHES *et al.*, 1975), e é o processo de rompimento da parede folicular, ocasionando uma rápida diminuição do tamanho da estrutura ovariana, ocorrendo, em média, em 42 segundos (CARNEVALE *et al.*, 1988). Neste processo ocorre o desaparecimento do folículo pré-ovulatório, formação de um corpo hemorrágico e subsequente observação de um corpo lúteo na imagem ultrassonográfica (GINTHER, 1995).

A fase seguinte à ovulação é denominada diestro, ou fase lútea, e é caracterizada pela presença do corpo lúteo (CL). Logo nas primeiras 24 a 48 horas após ovulação, as células lúteas iniciam a produção de progesterona, atingindo níveis de 10 ng/mL entre os dias 5 e 6 após ovulação. A duração do CL de um ciclo onde não houve a fecundação é de, geralmente, 14 dias (DAELS *et al.*, 1991). A luteólise começa por uma diminuição na vascularização e na produção de progesterona sob a influência da prostaglandina F_{2α} produzida pelo endométrio (GINTHER, 1985) até o total desaparecimento do CL, enquanto um novo ciclo se reinicia.

2.3. Cronologia dos estudos sobre dinâmica folicular em éguas

O crescimento e a seleção folicular são alguns dos maiores mistérios da reprodução em animais monovulatórios, o que levou a 90 anos de pesquisa sobre o tema (GINTHER, 2017). O primeiro estudo ocorreu em 1926 (AITKEN, 1926), crescendo o interesse sobre o assunto no início dos anos 2000, utilizando as técnicas de ultrassonografia transretal e de ultrassonografia com Doppler (GINTHER, 2017).

Neste estudo sobre dinâmica folicular realizado em 1926, foi utilizado o monitoramento do diâmetro folicular via palpação transretal. Vários folículos de 20-30mm foram identificados antes do estro, entretanto apenas 1 ou 2 aumentavam o diâmetro até ± 50 mm e ovulavam durante o estro (AITKEN, 1926). O grupo de folículos de 20-30mm diminuiu no dia -7 (dia 0 = ovulação) ou no primeiro dia em que o maior folículo continua a crescer (GINTHER, 1979). Sendo assim, em 1972, foi comprovado que o folículo que apresenta o maior diâmetro no primeiro dia de estro, é o mesmo que cresce culminando em ovulação em 62% das éguas estudadas (GINTHER *et al.*, 1972), enquanto os menores regridem. Estudando 3.631 ovários de abatedouro, foi observado maior prevalência de ovulações simples do que múltiplas, sendo destas 66,5% bilaterais (PIMENTEL *et al.*, 1995).

O primeiro estudo utilizando o monitoramento da estruturas reprodutivas da égua por ultrassonografia transretal ocorreu em 1980, entretanto folículos menores de 8mm não eram identificados, devido à baixa frequência do transdutor (3.0 MHz) (PALMER e DRIANCOURT, 1980). Em 1984, utilizando transdutores com maior frequência (5.0 MHz), folículos de 2mm foram identificados em equinos (GINTHER e PIERSON, 1984) e em bovinos (PIERSON e GINTHER, 1984) e a eficácia das mensurações foi comprovada pela alta correlação entre a ultrassonografia e amostras *in situ*.

O início do diestro é marcado pelo desenvolvimento de pequenos folículos, havendo atividade de um grupo de folículos de 20mm na metade desta fase. Próximo ao dia 8, os folículos crescem em paralelo por mais 7 dias, quando começam a diferir a taxa de crescimento (GINTHER e PIERSON, 1984). Esta dissociação na taxa de crescimento 6 a 7 dias antes da ovulação foi descrita em pôneis, Quarto de Milha (PIERSON e GINTHER, 1984) e Appaloosa (GINTHER, 1990). O fenômeno de dissociação foi descoberto e descrito como divergência folicular comparando gráficos apenas dos dois maiores folículos em ondas foliculares individuais (GASTAL *et al.*, 1997).

Através de imagens ultrassonográficas a dinâmica folicular pode ser elucidada por intermédio do acompanhamento do crescimento e regressão folicular, assim como o intervalo interovulatório. O exame complementar de ultrassonografia tornou-se um método não invasivo para a realização de um diagnóstico precoce de gestação, assim como detecção de gestações gemelares, além de avaliação das alterações das estruturas ovarianas (GINTHER, 1995).

Pequenos folículos podem ser visualizados com o uso da ultrassonografia. Desse modo, seu crescimento diário pode ser mensurado com o acompanhamento do período de crescimento comum da população folicular, a fase da divergência e o momento da ovulação podem ser estimados com mais precisão. O folículo pré-ovulatório perde sua forma esférica, tornando-se cônico, ou com formato de pêra, devido ao aumento da flutuação e à ação da $PGF_2\alpha$ (REDMER e REYNOLDS, 1996). Consequente à ovulação, ocorre a formação do corpo lúteo, entretanto devido a conformação anatômica do ovário da égua, a presença desta estrutura não é certificada pela palpação retal (SQUIRES *et al.*, 1988). Assim, a utilização de tal exame complementar é de suma importância para o conhecimento da presença do CL (GRIFFIN e GINTHER, 1992) e

seu acompanhamento até a ocorrência da luteólise e total desaparecimento (SQUIRES *et al.*, 1988).

Em 1999, as mudanças de diâmetro e ecotextura foliculares foram monitorados individualmente através da ultrassonografia transretal e a taxa de perfusão vascular dos folículos avaliadas por meio de ultrassonografia *Doppler* (ACOSTA *et al.*, 2004). Com o uso da ultrassonografia, os fenômenos da dinâmica folicular começaram a serem descritos e comprovados (GINTHER, 2017).

2.4. Dinâmica folicular

O processo de dinâmica folicular está relacionado a uma série de eventos capazes de estimular o crescimento ou a regressão de uma população folicular nos ovários de fêmeas (GURGEL *et al.*, 2008). Os ovários possuem o sistema corporal macroscópico mais dinâmico, e com mudanças contínuas, desenvolvem folículos ovarianos em ondas foliculares durante o ciclo estral ou intervalo interovulatório (IIO) (GINTHER *et al.*, 2004b).

O termo onda folicular refere-se a uma população de folículos que emerge e cresce inicialmente em sincronia (GINTHER *et al.*, 2004b). O número de ondas foliculares observadas durante o ciclo estral varia entre as diferentes espécies. Em éguas, uma ou duas ondas foliculares ocorrem durante o IIO e há o crescimento e regressão de vários folículos (GINTHER e BERGFELT, 1992). Em ondas maiores o maior folículo torna-se dominante, e estas ondas podem ser classificadas como primárias ou secundárias. O termo primária ou secundária descreve a fase do ciclo estral em que estas ocorrem, sendo considerada primária a onda que emerge no meio do diestro e que ocasiona o crescimento do folículo originando uma ovulação no final do estro; e secundária a onda que emerge no início do estro podendo ocasionar uma

ovulação de diestro (GINTHER, 1993). As ondas em que não há seleção folicular são denominadas de menores (GINTHER, 2000). Ondas foliculares maiores ou menores, ovulatórias ou anovulatórias são originadas pelo estímulo do surgimento do FSH (GINTHER e BERGFELT, 1992; GINTHER e BERGFELT, 1993; GASTAL *et al.*, 1997).

A emergência da onda folicular maior primária ocorre quando os folículos atingem um determinado diâmetro com conseqüente crescimento. Em éguas, este fenômeno ocorre quando o folículo atinge 6mm (GASTAL *et al.*, 1997). Já em vacas, a emergência ocorre quando o folículo atinge 4mm (GINTHER *et al.*, 2001a). Aproximadamente 7 a 11 folículos (GINTHER, 1992) entram em uma fase comum de crescimento, com crescimento médio de 3mm por dia, (GINTHER *et al.*, 2001a). Esta fase dura, em média, 3 e 6 dias em vacas e éguas, respectivamente (GINTHER *et al.*, 2001b).

O final da fase de crescimento comum é definido como divergência folicular e até então, todos os folículos da onda folicular tem capacidade de tornarem-se dominantes (BEG e GINTHER, 2006; GASTAL *et al.*, 2004). Divergência folicular é definida pelo momento em que as taxas de crescimento entre o futuro folículo dominante e o subordinado tornam-se discrepantes (GASTAL *et al.*, 1997). Em éguas a divergência ocorre quando o maior folículo alcança um diâmetro de 22mm e o segundo maior chega à 19mm (GINTHER, 2000), em bovinos com 8,5mm e 7,7mm (GINTHER, 2016) e em mulheres 10mm e 8mm (BAERWALD *et al.*, 2003). Geralmente, o folículo que atinge o maior diâmetro no momento da divergência emergiu, em média, 6 horas antes do que o segundo maior folículo em vacas e um dia antes em éguas (GINTHER, 2016). A dominância folicular é atingida quando o folículo atinge 30mm e 10mm em éguas e vacas, respectivamente. Segundo um estudo de GINTHER (2000), o folículo

que se tornou dominante foi aquele que alcançou primeiro o diâmetro de 20mm, em 93% das 29 ondas analisadas.

A ocorrência de mais de um folículo dominante em espécies monovulatórias pode ser considerado um distúrbio do mecanismo de seleção folicular (GINTHER, 1993). Em vacas de alta produção leiteira a incidência de ovulação dupla é maior, em torno de 20% (WILTBANK *et al.*, 2000). Em éguas, a incidência de ovulação dupla é muito variável envolvendo desde a raça, idade, predisposição genética e até *status* reprodutivo (GINTHER, 1979). A raça Brasileiro de Hipismo possui a incidência mais alta, podendo chegar em torno de 53% de ovulação duplas ou triplas (CARMO *et al.*, 2002), seguida pela raça de Polo Argentino que apresenta 27,1% (LOSINNO *et al.*, 2000), Puro Sangue Inglês (PSI) 15-22%, Standardbred 13-15%, Appaloosa 8-11% (GINTHER, 1982) e Árabe 0.8% (DESKUR, 1985). Existe uma correlação positiva entre a idade das éguas e a incidência de ovulação dupla (HENRY *et al.*, 1981; LOSINNO *et al.*, 2000), sendo mais comum em éguas com idade entre 6 a 10 anos do que em éguas com 2 a 5 anos de idade (HENRY *et al.*, 1982). Além disso, a ocorrência é menor em éguas com potro ao pé (6%) do que em éguas solteiras (16%) (GINTHER, 1982).

O diâmetro do folículo dominante é maior em ovulações simples do que em ovulações duplas, bem como a taxa de crescimento, principalmente se a co-dominância é no mesmo ovário (GINTHER *et al.*, 1996). Além disso, o diâmetro do folículo pré-ovulatório pode variar de acordo com a raça. Sendo assim, éguas pantaneiras apresentam o diâmetro pré-ovulatório de 49,5mm (ZÚCCARI *et al.*, 2002), Quarto de Milha de 43,3mm (DIMMICK *et al.*, 1993), PSI de 41,5mm (WATSON *et al.*, 1994), Árabe de 40,3mm (DIMMICK *et al.*, 1993), minipônei de 38mm (GASTAL *et al.*, 2008a) e jumentas de 36,7 (MEIRA *et al.*, 1995).

O diâmetro do folículo pré-ovulatório é usado para prever a ovulação (KOSKINEN *et al.*, 1989) e a análise de correlação pode ser usada para indicar a repetibilidade individual entre ciclos (GASTAL *et al.*, 2008b). Um folículo com uma borda ecogênica brilhante, formato irregular e uma fenda na parede folicular também pode auxiliar na predição da ovulação, já que o folículo pré-ovulatório muda o formato consideravelmente durante as três horas antes da ovulação (CARNEVALE *et al.*, 1988). A ovulação é definida como uma rápida diminuição no tamanho folicular, desaparecimento do folículo pré-ovulatório com formação de um corpo hemorrágico e subsequente visualização de um corpo lúteo na imagem ultrassonográfica (GINTHER, 1995).

2.5. Dinâmica uterina e cervical

A duração do estro é menor no pico da estação reprodutiva (PALMER, 1978). Em éguas, o estro é caracterizado pelo desenvolvimento de um edema do endométrio, bem como o desaparecimento do edema caracteriza a fase de diestro (HAYES e GINTHER, 1986). O aumento do edema das dobras endometriais durante o estro é indicativo da elevação de estradiol circulante e presença de um folículo ≥ 25 mm (PYCOCK *et al.*, 1995), resultando em uma mudança na avaliação do escore endometrial (GINTHER e PIERSON, 1984). O primeiro aumento do escore da ecotextura, indicando o crescimento do edema endometrial, ocorre entre os dias 10 e 14 em minipôneis e está associado com o início da luteólise e regressão final do CL, baseado na queda das concentrações plasmáticas de P4, e o pico do edema endometrial ocorre junto com o aumento de estradiol, no dia 16 (GASTAL *et al.*, 2008a). Após isto, atinge um platô e regride dois dias antes da ovulação em éguas (GINTHER e PIERSON, 1984) e quatro dias antes em minipôneis (GASTAL *et al.*, 2008a).

As mudanças no tônus cervical e uterino são usadas clinicamente e experimentalmente para determinar a fase do ciclo estral (GINTHER, 1979), e ocorrem pelos níveis circulantes de progesterona e estrogênio (NODEN *et al.*, 1975). Baseado na palpação transretal, o tônus uterino é mínimo durante o estro e máximo no diestro. Após a ovulação, os cornos uterinos são facilmente palpados entre 4 e 5 dias. Entre os dias 7 e 11, o tônus uterino permanece em um platô até o dia 14. O tônus neste período é atribuído à produção de progesterona pelo CL (BERGFELT e GINTHER, 1978). A partir de então, o tônus uterino e cervical torna-se reduzido. A luteólise é seguida pela diminuição do tônus uterino e cervical com associação à proximidade do estro (GINTHER, 1979). Em éguas vazias, o tônus começa a diminuir no dia 13, atingindo seu escore mínimo no dia 18 (HAYES *et al.*, 1985), permanecendo assim até a ovulação. O útero é frouxo no estro devido ao estrogênio circulante produzido pelo folículo dominante (BERGFELT e GINTHER, 1978).

2.6. Dinâmica do corpo lúteo e luteólise

O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação, já que é a responsável pela produção de progesterona (GINTHER, 1992; 2009). Esta glândula desenvolve-se a partir das células da teca e células da granulosa remanescentes do folículo que ovulou (DAVIS e RUEDA, 2002), apresentando rápido crescimento, diferenciação e luteinização (LUIS e QUINTERO, 1998).

A formação do corpo lúteo ou luteogênese consiste em mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem no folículo ovulatório até que se transforme em corpo lúteo funcional (SMITH *et al.*, 1999). A luteinização das células começa antes mesmo da ovulação, com mudanças na população de receptores de LH (MOURA,

2003). Imediatamente à ovulação é formado o corpo hemorrágico, visualizado como pontos ecogênicos, formando uma "rede" de fibrina e sangue, e pode ser visualizado até 2 dias após a ovulação (GINTHER, 1995). O desenvolvimento fisiológico do corpo lúteo e sua capacidade de produzir progesterona, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas dependem de sua vascularização. É sabido que a vascularização do folículo pré-ovulatório interfere na capacidade de ovulação, sendo menor a vascularização em folículos anovulatórios (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004) e que interferem também na produção de progesterona (TARSO *et al.*, 2017). A produção de progesterona começa nas primeiras 24 horas após a ovulação e os maiores níveis da produção são alcançados entre os dias 5 e 6 (GINTHER, 1995).

Sem a ocorrência da fertilização ou na incapacidade do reconhecimento materno, pulsos de $PGF2\alpha$ são liberados pelas células endometriais, para promover o desaparecimento funcional e estrutural do corpo lúteo, determinando o fim da fase lútea (KAWATE *et al.*, 2000; MILVAE, 2000; PATE E KEYES, 2001; WEBB *et al.*, 2002; BERTAN, 2004). A luteólise começa, em média, no dia 14, porém o CL ainda pode ser identificado até 17 dias após a ovulação ou 5 dias antes da próxima ovulação (PIERSON e GINTHER; 1985).

2.7. Interação hormonal no ciclo estral

A temporada fisiológica reprodutiva ou estação ovulatória começa na primavera e se estende até o final do verão. Entretanto, a duração da atividade reprodutiva é variável de acordo com a localização geográfica, clima, nutrição e genética, dentre outros fatores (GINTHER, 1992; NAGY *et al.*, 2000). A endocrinologia do ciclo estral envolve um delicado balanço de vários hormônios produzidos pela glândula pineal, hipotálamo, glândula pituitária, ovários e endométrio (IRVINE e ALEXANDER, 1994).

Em éguas, o aumento da duração do dia estimula a atividade reprodutiva. Os raios solares incidem sobre a retina ocular estimulando seus receptores que transmitem mensagens para o gânglio cervical superior e então para a glândula pineal, iniciando os eventos cerebrais, onde estão envolvidos também o hipotálamo e a hipófise anterior, e finalmente os ovários (SENGER, 1997). A glândula pineal, responsável pela síntese e secreção da melatonina (LINCOLN, 1987), diminui sua secreção, uma vez que a síntese deste hormônio é inversamente proporcional à duração da luminosidade ambiental diária. Assim, a síntese e secreção da melatonina são inibidas durante o estímulo luminoso (SHARP, 1980; GINTHER, 1992). O hipotálamo, por sua vez, produz Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH), que secretado em pulsos até a pituitária estimula a síntese das gonadotropinas, que são o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) (IRVINE *et al.*, 2000). Estas gonadotrofinas na circulação sanguínea, estimulam a atividade ovariana (GINTHER, 1992).

Nos ovários de éguas existem, em média, 40 mil folículos primordiais (GINTHER, 1992; DRIANCOURT *et al.*, 1982) e a formação do antro folicular ocorre quando o folículo atinge de 0,2 a 0,4mm de diâmetro (DRIANCOURT, 1979). O crescimento folicular ocorre em ondas foliculares (PIERSON e GINTHER, 1985) e a regressão é rara antes do folículo atingir 1mm de diâmetro (DRIANCOURT, 1979).

As ondas foliculares se desenvolvem de acordo com o estímulo de FSH (GINTHER *et al.*, 2003; GINTHER *et al.*, 2005) e podem ser monitoradas pelo uso da ultrassonografia 3 dias antes do pico de FSH. Este, por sua vez ocorre quando o maior folículo atinge 13mm de diâmetro quando as concentrações começam a decrescer. É necessário este declínio para que ocorra o divergência folicular, já que três dias antes todos os folículos são dependentes de FSH (GINTHER, 2000). A secreção de estrógeno

pelos maiores folículos também corrobora para o declínio do FSH. Entretanto, os maiores folículos são mais responsivos às baixas concentrações de FSH, continuando seu crescimento enquanto os menores tendem a regredir (GINTHER *et al.*, 2001a; GINTHER *et al.*, 2003). Além do estradiol, o FSH estimula, de forma indireta, IGF-1, inibina A e activina A, entre outros fatores intra-foliculares (GINTHER *et al.*, 2003; BEG e GINTHER, 2006; CAMPBELL e BAIRD, 2001).

Antes do divergência, o estradiol e a inibina produzidos pelos maiores folículos deprimem a produção de FSH. O estradiol começa a aumentar um dia antes do divergência e se mantém elevado até dois dias antes da ovulação, já a inibina é produzida antes do estradiol, justo no momento do declínio de FSH, e se mantém elevada sendo produzida pelo folículo dominante (GINTHER *et al.*, 2003; BERGFELT *et al.*, 2001; DONADEU e GINTHER *et al.*, 2001a). Após o declínio de FSH e do divergência folicular, as células da granulosa do folículo dominante adquirem receptores de LH, atingindo a concentração máxima de LH um dia depois da ovulação (GINTHER, 1992; GOUDET *et al.*, 1999).

Vários fatores intrafoliculares apresentam ação durante o divergência e seleção folicular. Concentrações de IGF-1, estradiol, inibina A e activina A são maiores no folículo dominante do que nos demais folículos no início do divergência, sendo a IGF-1 considerada fator iniciante, já que as concentrações aumentam somente no futuro folículo dominante (GINTHER *et al.*, 2004b; BEG e GINTHER, 2006; ARMSTRONG e WEBB, 1997). Em bovinos, *in vitro*, a IGF-1 é responsável pela proliferação das células da granulosa e da sensibilidade destas ao FSH, produção de estradiol e aumento da secreção de inibina e activina A (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995; MONGET e MONNIAUX, 1995; GLISTER *et al.*, 2001). A concentração do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) também é maior no futuro dominante do que no folículo

subordinado um dia depois do divergência (GINTHER *et al.*, 2004b), e estimula a mitose das células endoteliais, aumenta a permeabilidade vascular e a angiogênese (REYNOLDS e REDMER, 1998). O aumento da vascularização favorece o aporte dos fatores de crescimento, gonadotropinas, esteroides e outras fatores que favorecem o seu desenvolvimento, entretanto esses fatores ainda não estão completamente esclarecidos (RAZ e RAZ, 2012).

Após a ovulação, a secreção de progesterona inicia rapidamente, atingindo um platô de 6 – 10 ng/ml durante os dias 5 a 10 da fase luteal e, após o 10º dia há um decréscimo dos níveis deste hormônio. No 14º dia, se não ocorrer o reconhecimento materno, ocorre uma queda abrupta da progesterona, iniciando a luteólise (PALMER, 1978).

2.8. Éguas como modelo experimental

Os roedores são os mais populares modelos experimentais para pesquisas médicas, já que possuem vários atributos para isto. Em 98% das pesquisas que envolvem o uso de animais como modelo experimental, são utilizados os roedores, e em apenas 2% os animais de grande porte (IRELAND *et al.*, 2008). Entretanto, para pesquisas de dinâmica folicular ovariana em mulheres e em grandes mamíferos, os roedores apresentam poucas vantagens, devido ao pequeno tamanho corporal (JAISWAL *et al.*, 2009; MIRCEA *et al.*, 2009), além de possuírem um ciclo ovariano curto, incluindo a fase luteal que só ocorrerá se a fêmea estiver acasalada (MILLIGAN *et al.*, 1980). O uso de grandes animais para pesquisas nas últimas duas décadas, resultou em uma grande expansão do conhecimento sobre dinâmica folicular e luteal. Semelhante à mulher, as éguas são monovulares e policíclicas, além de apresentarem

semelhantes condições patogênicas (ex: cistos foliculares, folículos anovulatórios) (ADAMS e PIERSON, 1995; SINGH *et al.*, 2003).

Similaridades na dinâmica folicular ovariana entre mulheres e éguas indicam o potencial do uso do modelo experimental para estudos, com a vantagem do grande tamanho folicular. As semelhanças durante a onda ovulatória incluem emergência do futuro folículo dominante antes do folículo subordinado, taxa de crescimento folicular proporcional durante a fase de crescimento comum e diâmetro relativo similar do folículo dominante no início da divergência até ovulação (GINTHER *et al.*, 2004b).

Éguas e mulheres apresentam ondas foliculares maiores, primárias e secundárias, bem como ondas menores durante o ciclo estral e menstrual, respectivamente (BAERWALD *et al.*, 2003; GINTHER, 2003). Em ondas maiores, a divergência acontece com o conseqüente desenvolvimento de um folículo dominante. Em ambas espécies, as ondas maiores primárias desenvolvem a emergência folicular no meio do intervalo interovulatório e originam o folículo que irá ovular. Já em ondas maiores secundárias, o folículo dominante geralmente não atinge o diâmetro médio máximo comparado ao diâmetro máximo de folículos ovulatórios, e este fenômeno ocorre em torno de 22% em mulheres (BAERWALD *et al.*, 2003). Em ondas menores, é relatada uma diminuição do diâmetro dos seis maiores folículos da onda (GINTHER, 1993) e em mulheres, a redução do número de folículos (BAERWALD *et al.*, 2003).

A emergência folicular é descrita em éguas quando o folículo atinge 13mm (GINTHER *et al.*, 2003) e 6mm em mulheres (BAERWALD *et al.*, 2003), concomitantemente ao pico de FSH (GASTAL *et al.*, 1997; BAERWALD *et al.*, 2003). Assim como em éguas, o futuro folículo dominante em mulheres também apresenta uma vantagem de diâmetro comparado ao folículo subordinado. Durante a fase de crescimento comum, ambas as espécies apresentam taxa de crescimento similar entre os

dois maiores folículos até o início da divergência. Esta vantagem é proposta para o estabelecimento da dominância folicular para todas as espécies monovulares domésticas (GINTHER *et al.*, 2003). Em mulheres, a divergência ocorre quando o futuro folículo dominante atinge aproximadamente 10mm, sendo 2mm maior que o futuro folículo subordinado, fato semelhante proporcionalmente ao que ocorre em éguas (BAERWALD *et al.*, 2003). O diâmetro folicular no momento da divergência em éguas é 2,2 vezes maior do que em mulheres. Semelhante à égua, em mulheres também ocorre uma redução na taxa de crescimento um dia antes da ovulação. O diâmetro pré-ovulatório em éguas é 2,1 vezes maior do que em mulheres (45mm vs 20mm, respectivamente) (GINTHER *et al.*, 2004a).

Mulheres, éguas e vacas apresentam similaridades quanto a interferência da idade no ciclo reprodutivo, folículos e oócitos (CARNEVALE, 2008; MALHI *et al.*, 2005). Mudanças nos folículos e nas taxas hormonais ocorrem no decorrer da vida em ambas espécies. Com o avanço da idade, o sintoma inicial é a diminuição da duração do ciclo estral (CARNEVALE *et al.*, 1993; GINTHER *et al.*, 2008) e menstrual (SOULES *et al.*, 2000) respectivamente, seguido do aumento do IIO. Entretanto este aumento não envolve a fase lútea e sim a fase folicular em ambas as espécies (GINTHER *et al.*, 2009; GINTHER *et al.*, 1993; KLEIN e SOULES, 1998). Além disso, ocorre uma redução na qualidade dos oócitos em éguas acima de 12 anos e em mulheres acima de 43 anos (RAMBAGS *et al.*, 2005).

As semelhanças no desenvolvimento folicular, concentração hormonal e qualidade oocitária entre mulheres e éguas, comprovam que as éguas podem ser consideradas um bom modelo experimental para estudos de dinâmica folicular em mulheres (CARNEVALE, 2008).

3. ARTIGO

Ovarian and uterine dynamics in criollo breed mares during the reproductive season

DUVAL, L.H.^{1,2}; FIALA RECHSTEINER, S.M.^{1,2}; GASTAL, G.D.A.³; GASTAL, M.O.³; MATTOS, R.C.^{1,2}; GASTAL, E.L.³

¹ Postgraduate Program in Animal Medicine: Equine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Historep, Morphology Department, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

³ Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA.

Abstract

The Criollo horse was brought to America four centuries ago. The Criollo horse reproduced freely in the southern part of the American continent. The natural selection that occurred over the centuries made the Criollo horse known for its roughness, resistance, and endurance characteristics, which may have positively influenced the fertility and longevity of this breed, but information regarding fertility and reproductive performance of Criollo breed mares under natural or controlled management conditions is scarce. The objectives of the present study were to: (1) elucidate the follicular dynamics of Criollo breed mares; (2) characterize growth and regression of the corpus luteum; and (3) study the tone and ultrasonographic uterine echotexture changes during two consecutive estrous cycles. In this study, 26 interovulatory intervals (IOI) were evaluated in 13 mares. The spontaneous estrous cycles were characterized by the following: (i) the length of the IOI was 21 days; (ii) dominant and subordinate follicles emerged together at day 5 and their growth rate were slower until the deviation moment; (iii) deviation occurred when the dominant follicle had achieved 22 mm; (iv) the diameter of the preovulatory follicle was 43 mm; (v) the corpus luteum had achieved its maximum diameter 1.5 days after ovulation; and (vi) the strong correlation for

repeatability demonstrated that the uterine and cervical tonus can be used to determine the phase of the estrous cycle. The results herein presented are of fundamental importance for a better understanding of the reproductive physiological patterns of the estrous cycle in the Criollo mare.

Keywords: follicle dynamics, criollo mares, endometrial echotexture, ultrasound

1. Introduction

The Criollo horse originates from breeds of Spanish horses that were brought four centuries ago. After that, the Criollo horse reproduced freely in the southern part of the American continent, becoming extremely well adapted to the region (Pons, 1993; Teixeira, 2011). The natural selection that occurred over the centuries made the Criollo horse known for its roughness, resistance, and endurance characteristics, which may have positively influenced the fertility and longevity of this breed (Solonet, 1946; Dowdall, 1987). However, scarce information is available regarding fertility and reproductive performance of this breed under natural or controlled management conditions (Fiala *et al.*, 2012).

Nowadays, the Criollo breed is considered one of the pillars of the Brazilian equine industry due to its social and economic impacts on society (ABCCC, 2014a). In Brazil, the Criollo breed has an expressive Studbook with >310,000 animals registered and >US\$400 million in earnings per year. Currently, this breed has been distributed largely throughout the Brazilian territory, South American countries (e.g. Argentina, Chile, Uruguay, Paraguay; ABCCC, 2014a), and other countries such as the United States of America and Germany (Vila *et al.*, 1997). The Criollo horse has been classified as a large-pony-sized animal (height range, 1.38 to 1.50m) and has been used traditionally as a working horse for cattle and sheep herding and management in farms, different types of functional competitions, and leisure (ABCCC, 2014b).

Among the body organs, the ovary has the most dynamic macroscopic system that leads to development of ovarian follicles in follicular waves during the estrous cycle in several species (Ginther *et al.*, 2001; Baerwald *et al.*, 2003), including the mare (Sirois *et al.*, 1989). The term follicular wave refers to a population of follicles that emerges and grows initially in synchrony during a common growth phase (Ginther *et al.*, 2004).

During the interovulatory interval (IOI), different types and numbers of follicular waves may be observed (Ginther, 1995; Ginther *et al.*, 2004). A primary wave is a major wave that originates during the diestrous phase and gives origin to a dominant follicle (DF) that terminates in the primary ovulation associated with estrus. The secondary major wave, in turn, may emerge during late estrus or early diestrous in 25% of Standardbreds and Thoroughbreds (Sirois *et al.*, 1989), Quarter horses and Appaloosas (Ginther, 1993), and Brazilian Breton mares (small draft horses; Ginther *et al.*, 2004). The dominant follicle of a secondary major wave can ovulate during the diestrous or become hemorrhagic or even regress. Minor follicular waves are characterized by the absence of a dominant follicle (Ginther, 1995). The emergence of the ovulatory wave occurs, on average, in the middle of an IOI of 22-24 days. The future dominant follicle emerges one day earlier than the future subordinate follicle (SF) with a 3mm difference in diameter (Gastal *et al.*, 1997; Ginther *et al.*, 2004). The day or time when the dominant follicle reaches a diameter of >6 mm has been defined as the day of emergence of the ovulatory wave (Gastal *et al.*, 1997; 2004). The common growth phase of the future dominant and subordinate follicles begins at the emergence onset and ends in the phenomenon known as follicle deviation (Gastal *et al.*, 1997), which is characterized by the continuous growth rate of the dominant follicle and consequent regression of the subordinate follicles (Gastal *et al.*, 1997; 1999; Ginther *et al.*, 2003). The deviation in growth rates occurs when the future dominant and subordinate follicles reach approximately 22.5 and 19 mm, respectively (Gastal *et al.*, 1997; 1999). After this time, the subordinate follicles regress, and the dominant follicle maintains its continuous growth rate until approximately two days before ovulation (Gastal *et al.*, 2006; Gastal, 2009).

As a result of the follicle deviation mechanism, often only one dominant follicle develops, but double dominant follicles also occur (Ginther, 1993; Gastal, 2009). The incidence of double ovulation varies extensively, being considered higher in horses than in ponies (Ginther, 1992; Gastal *et al.*, 2008). The diameter of the dominant follicle is greater in single ovulations than in double ovulations, and the diameter of the preovulatory follicle may vary according to the mare type and breed (Ginther 1995). For example, the diameter of the preovulatory follicle is smaller in miniature ponies than in Breton mares; however, it does not differ from that in large ponies (Gastal *et al.*, 2008). Besides the ultrasonographic changes in follicle diameter and wall characteristics before ovulation (Carnevale 1988; Koskinen *et al.*, 1989; Gastal *et al.*, 1998, 2006, 2008, Tazawa *et al.*, 2017), a reduction in growth rate of the preovulatory follicle, estradiol systemic concentration, and endometrial echotexture before ovulation has been used to predict impending ovulation in the mare (Samper 1997; Gastal *et al.*, 1998, 2006, 2008a,b; Tazawa *et al.*, 2017). Furthermore, when studying the repeatability of preovulatory follicle diameter and endometrial echotexture between estrous cycles within mares, significant positive correlations were found, indicating animal repeatability (Cuervo-Arango and Newcombe, 2008; Ginther *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009).

The objectives of the present study in Criollo breed mares during two consecutive estrous cycles were to characterize: (1) follicular dynamics, (2) growth and regression of the corpus luteum, and (3) tone and ultrasonographic uterine echotexture changes.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All animal procedures in this study were performed in compliance with the animal use protocol by the Institutional Research Ethics Committee at Federal University of Pelotas, Brazil (#4588/2014). The study was performed in the south of Brazil (latitude 30° 58' 58" S), during the reproductive season (November to January). Fifteen non-lactating and cyclic Criollo mares with similar age (8.3 ± 0.4 years old), height (138.4 ± 0.2 cm), weight (372.3 ± 6.5 kg), and body condition (scores 6 to 8; Henneke *et al.*, 1983) were selected based on docility and absence of apparent clinical and reproductive abnormalities. All mares were maintained under the same management conditions, kept in natural pasture with free access to water and mineral salt, and had no exposure to artificial light.

2.2. Experimental design and ultrasound procedures

The experiment was performed from day -3 (Day 0 = ovulation) of the first interovulatory interval (IOI) until day +3 of the second IOI. The animals were ordered from 1 to 15 and evaluated in the same order during the experimental period to avoid time interference in data collection. Mares were examined daily by rectal palpation and transrectal ultrasonography using a B-mode ultrasound (Aquila Vet; PieMedical imaging, Maastricht, NL) connected to a linear-array transducer (7.5 MHz) to evaluate the reproductive tract. During procedures, mares were contained in a palpation chute without using any type of sedatives and/or anaesthesia. The rectal palpation and ultrasonographic procedures (~15 min per mare) were performed by one operator (L.H.D.).

2.2.3. Ovarian monitoring

The ovarian monitoring consisted of daily drawing the structures (antral follicles, corpus luteum, and corpus albicans) observed in each ovary, and individually recorded in a spreadsheet. The retrospective localization of follicles, corpus luteum, and corpus albicans was used as reference for identifying and monitoring the development of these structures. Follicles were monitored daily since its appearance (size, 2mm) on the ultrasonographic evaluation for the most appropriate characterization of follicular dynamics. Follicle and corpus luteum diameter was obtained from a single still image when the largest diameter was observed. Therefore, the diameter measurements of follicles and corpus luteum were determined based on the mean of width and height of the follicular antrum and luteal mass, respectively (Ginther, 1995; Bergfelt *et al.*, 1998).

The day of follicle emergence was defined as when follicles reached 6 mm in diameter with subsequent growth; follicle deviation was defined as when the growth rates of the largest and the second largest follicle became discrepant (Gastal *et al.*, 1997); the dominant follicle was considered the first follicle to reach ≥ 28 mm of diameter; and the secondary follicle was the second largest follicle of the major primary wave presented in a similar growth rate as the dominant follicle. The growth rates of each follicle was defined by the difference of the sum of the daily diameters divided by the number of days evaluated. Ovulation was considered the moment of disappearance of the preovulatory follicle, with formation of a hemorrhagic corpus luteum and consequent observation of a corpus luteum in the ultrasound image (Ginther, 1995).

Follicular activity was represented by the six largest follicles, which were classified from F1 (major) to F6 (minor), without using the daily follicular identification (Gastal *et al.*, 2008). In addition, all follicles were counted and grouped in 7 classes according to diameter sizes: 2-5mm, 5.1-10mm, 10.1-15mm, 15.1-20mm, 20.1-25mm, 25.1-30mm

e >30mm. Follicles that emerged with ≥ 2 days difference were considered part of another wave (Gastal *et al.*, 1999; 2000). Determination and classification of follicular waves were based on the mathematical method described by Ginther and Bergfelt (1992).

2.2.4. Uterine evaluation

The uterine and cervical tonus was estimated daily by transrectal digital compression of each uterine horn and cervix and classified based on a scoring system ranging from 1 to 4 (minimum and maximum; Hayes *et al.*, 1985).

The transrectal ultrasonography of the uterus aimed to evaluate the echotexture of the endometrium during the two IOIs, to identify possible fluid accumulation and uterine disorders. The assessment of endometrial echotexture was performed daily through visualization of cross sections of both uterine horns and longitudinal sections of the uterine body region (Ginther, 1995), using a scoring system (range, 1 to 4; Hayes *et al.*, 1985) where scores 3 and 4 were considered representative of estrus (Gastal *et al.*, 1998).

2.3. Statistical analyses

Ovarian and uterine parameters were analyzed by ANOVA for sequential data (SAS University Edition). Main effects of group/cycle, day, and group by day interaction were determined. The source of variation due to the sequential nature of the data was computed including the animal-by-group interaction as a random error to test the group effect. When a significant effect per day of group, group by day interaction was detected, the Tukey test was used to locate the mean differences between groups and within days. Simple variance analysis was used to determine group effects for

single point measurements and the Tukey test was used to locate possible significant contrasts of means between groups. Data were presented with mean and standard error (mean \pm s.e.m). Significance was indicated by the probability of $P < 0.05$. The Pearson correlation coefficient was measured to evaluate repeatability of follicular diameter, corpus luteum, uterine and cervical tone, and endometrial echotexture.

3. Results

Two mares developed persistent corpus luteum during one of the estrous cycles and, therefore, were removed from the study. Values for the mean intervals, follicles diameters, and growth rates during major ovulatory waves are depicted in Table 1. The length of IOI and the intervals between emergence to deviation, deviation to maximum diameter, and maximum diameter to ovulation, the follicle diameters, and the growth rate did not differ ($P > 0.05$) between cycles. However, cycle 1 had a shorter ($P < 0.05$) interval between ovulation to emergence of dominant and second largest follicles, and a smaller ($P < 0.05$) growth rate of the dominant follicle between days -2 and -1 before ovulation when compared with cycle 2. A moderate positive correlation of repeatability has been shown for the maximal diameter of the preovulatory follicle ($r = 0.55$; $P < 0.001$) as well as for the follicular diameter 1 day before ovulation ($r = 0.53$; $P < 0.001$) among mares/estrous cycle.

Table 1. Mean (\pm S.E.M.) intervals and follicles diameters and growth rates during major ovulatory waves.

End points	Cycle 1 Overall (n = 13)	Cycle (n = 13)	2 (n = 13)
Length of IOI (days)	21.0 \pm 0.7 ^A	21.2 \pm 0.5 ^A	21.1 \pm 0.4
Intervals (days) from:			
Ovulation to emergence [†]			
DF	3.9 \pm 1.1 ^{Ba}	7.1 \pm 0.8 ^{Aa}	5.5 \pm 0.7 ^a
SF	3.9 \pm 0.9 ^{Ba}	7.0 \pm 1.0 ^{Aa}	5.3 \pm 0.7 ^a
Emergence to deviation [‡]			
DF	7.5 \pm 0.5 ^{Aa}	7.4 \pm 0.7 ^{Aa}	7.4 \pm 0.4 ^a
SF	7.5 \pm 0.6 ^{Aa}	6.7 \pm 0.6 ^{Aa}	7.2 \pm 0.4 ^a
Deviation to max. diam.			
DF	8.1 \pm 0.6 ^{Aa}	6.6 \pm 0.6 ^{Aa}	7.4 \pm 0.5 ^a
SF	1.2 \pm 0.6 ^{Ab}	1.2 \pm 0.6 ^{Ab}	1.2 \pm 0.4 ^b
Max. diam. to ovulation	1.6 \pm 0.1 ^A	1.2 \pm 0.1 ^B	1.4 \pm 0.1
Follicle diameters (mm) at:			
Emergence			
DF	6.6 \pm 0.3 ^{Aa}	7.2 \pm 0.5 ^{Aa}	6.9 \pm 0.3 ^a
SF	7.1 \pm 0.4 ^{Aa}	7.5 \pm 0.4 ^{Aa}	7.3 \pm 0.3 ^a
Deviation			
DF	20.9 \pm 0.9 ^{Aa}	23.4 \pm 1.2 ^{Aa}	22.0 \pm 0.8 ^a
SF	21.7 \pm 0.8 ^{Aa}	20.8 \pm 0.9 ^{Aa}	21.3 \pm 0.6 ^a
Maximum			
DF	43.9 \pm 1.0 ^{Aa}	43.6 \pm 1.4 ^{Aa}	43.8 \pm 0.8 ^a
SF	21.9 \pm 1.3 ^{Ab}	22.7 \pm 1.0 ^{Ab}	22.2 \pm 0.8 ^b
Day -1			
DF	42.8 \pm 0.9 ^{Aa}	43.4 \pm 1.4 ^{Aa}	43.1 \pm 0.8 ^a
SF	15.1 \pm 1.3 ^{Ab}	16.2 \pm 1.6 ^{Ab}	15.5 \pm 1.0 ^b
Growth rate (mm/day) from:			
Emergence to deviation			
DF	2.0 \pm 0.1 ^{Aa}	2.3 \pm 0.2 ^{Aa}	2.1 \pm 0.1 ^a
SF	2.0 \pm 0.1 ^{Aa}	2.1 \pm 0.2 ^{Aa}	2.0 \pm 0.1 ^a
Deviation to max. diam.			
DF	3.1 \pm 0.2 ^{Aa}	3.0 \pm 0.2 ^{Aa}	3.0 \pm 0.1 ^a
SF	0.3 \pm 0.5 ^{Ab}	0.5 \pm 0.3 ^{Ab}	0.4 \pm 0.3 ^b
Max. diam. to ovulation			
DF	-1.8 \pm 0.5 ^A	-1.7 \pm 0.7 ^A	-1.8 \pm 0.4
Days -5 to -2 (DF)	3.1 \pm 0.4 ^A	2.9 \pm 0.3 ^A	3.0 \pm 0.2 ^a
Days -2 to -1 (DF)	0.0 \pm 0.8 ^B	2.6 \pm 0.7 ^A	1.3 \pm 0.6 ^b

[†]Emergence is the day the future ovulatory follicle was ≥ 6 mm.

[‡]Deviation refers to the first significant difference in growth rates between DF and SF. Day 0 = ovulation.

A,B Within a row, means with uncommon superscripts are different ($P < 0.05$).

a,b Within a column, paired means for dominant follicle (DF) and second largest follicle (SF) with uncommon superscripts are different ($P < 0.05$).

The deviation process was characterized by a significant difference in growth rate between the dominant and second largest follicle at day 7 after the day of emergence (Fig. 1a). When data was normalized to deviation, the dominant follicle grew at a constant rate (3 mm/day), while the second largest follicle stagnated (0.4 mm/day) until 4 days (Fig. 1b).

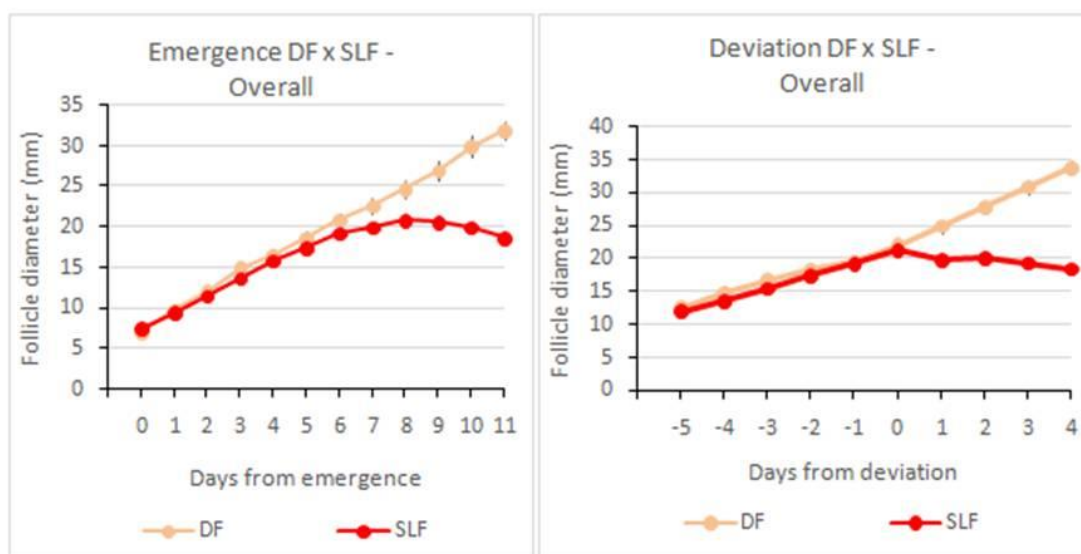


Figure 1. Follicular emergence (a) and deviation (b) of DF and SF.

The follicle diameter of the 6 largest follicles were similar ($P > 0.01$) between cycle 1 and cycle 2. However, the number of total follicles (2 to >30 mm) was higher ($P < 0.05$) in cycle 1 when compared with cycle 2. However, the number of corpus luteum, diameter, and the last day of detection did not differ ($P > 0.05$) between cycle 1 and 2. Considering the total number of follicles within the IOI, there was a significant reduction in number of follicles >15 mm. In addition, the major primary waves had a higher frequency in a regular estrous cycle (Table 2).

Table 2. Mean (\pm s.e.m.) diameter of six largest follicles, number of follicles per day, number of waves, and CL data per estrous cycle.

End points	Cycle 1 (n = 13)	Cycle 2 (n = 13)	Overall (n = 26)
Six largest follicles (mm)[†]			
F1 (largest)	24.4 \pm 1.8 ^{Aa}	25.0 \pm 1.5 ^{Aa}	24.7 \pm 1.7 ^a
F2	17.7 \pm 0.8 ^{Ab}	17.3 \pm 0.5 ^{Ab}	17.5 \pm 0.7 ^b
F3	15.3 \pm 0.7 ^{Ac}	14.7 \pm 0.3 ^{Ac}	15.0 \pm 0.5 ^c
F4	13.7 \pm 0.7 ^{Ad}	12.9 \pm 0.3 ^{Ad}	13.3 \pm 0.5 ^d
F5	12.1 \pm 0.5 ^{Ae}	11.8 \pm 0.3 ^{Ae}	12.0 \pm 0.4 ^e
F6	10.9 \pm 0.5 ^{Af}	10.8 \pm 0.3 ^{Af}	10.8 \pm 0.4 ^f
No. of follicles per day during the IOI			
2–5 mm	3.4 \pm 0.1 ^{Ab}	1.7 \pm 0.1 ^{Bb}	2.5 \pm 0.1 ^c
5.1–10 mm	5.4 \pm 0.2 ^{Aa}	4.5 \pm 0.1 ^{Aa}	4.9 \pm 0.1 ^a
10.1–15 mm	3.2 \pm 0.1 ^{Ab}	3.6 \pm 0.1 ^{Aa}	3.4 \pm 0.1 ^b
15.1–20 mm	1.8 \pm 0.1 ^{Ac}	1.7 \pm 0.1 ^{Ab}	1.7 \pm 0.1 ^d
20.1–25 mm	0.7 \pm 0.1 ^{Ad}	0.6 \pm 0.0 ^{Ac}	0.6 \pm 0.0 ^e
25.1–30 mm	0.2 \pm 0.0 ^{Ae}	0.2 \pm 0.0 ^{Ac}	0.2 \pm 0.0 ^f
>30 mm	0.2 \pm 0.0 ^{Ae}	0.3 \pm 0.0 ^{Ac}	0.3 \pm 0.0 ^f
Total	14.7 \pm 0.2 ^A	12.3 \pm 0.2 ^B	13.5 \pm 0.2
Follicle waves			
Overall number	17	23	40
Frequency			
Major			
Primary	76.5% (13)	56.5% (13)	65.1% (26)
Secondary	5.9% (1)	26.1% (6)	17.5% (7)
Minor			
Minor	17.6% (3)	17.4% (4)	17.5% (7)
Corpus luteum			
At maximum			
Day	1.4 \pm 0.3 ^A	1.8 \pm 0.3 ^A	1.6 \pm 0.2
Diameter (mm)	31.8 \pm 0.9 ^A	35.3 \pm 1.6 ^A	33.6 \pm 1.0
At last detection			
Day	16.0 \pm 0.7 ^A	15.2 \pm 0.5 ^A	15.6 \pm 0.4
Diameter (mm)	14.2 \pm 0.8 ^A	15.8 \pm 0.8 ^A	15.0 \pm 0.6

^{A,B}Within a row, means with uncommon superscripts are different ($P < 0.05$).

^{a-f}Within a column, means with uncommon superscripts are different ($P < 0.05$). Means represent the main effect of cycle for the six largest follicles, number of follicles in the seven diameter classifications, types of follicular waves, and corpus luteum.

[†]Follicles were ranked each day without regard to day-to-day identity.

The IOI involved the growth of only two follicles larger than 20 mm, and the second largest follicle, after divergence, entered a plateau phase and regresses (Fig. 2).

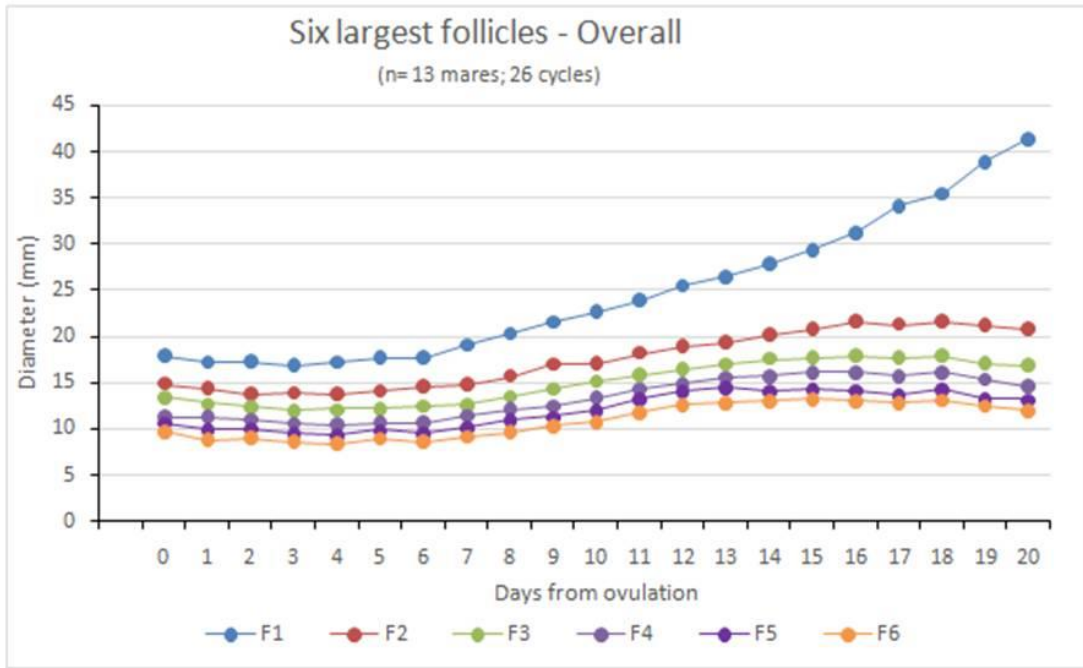


Figure 2. Six major follicles during IOI

In addition, independent of the cycle’s phase, the ovarian activity was maintained throughout the IOI with approximately 13 follicles (Fig. 3).

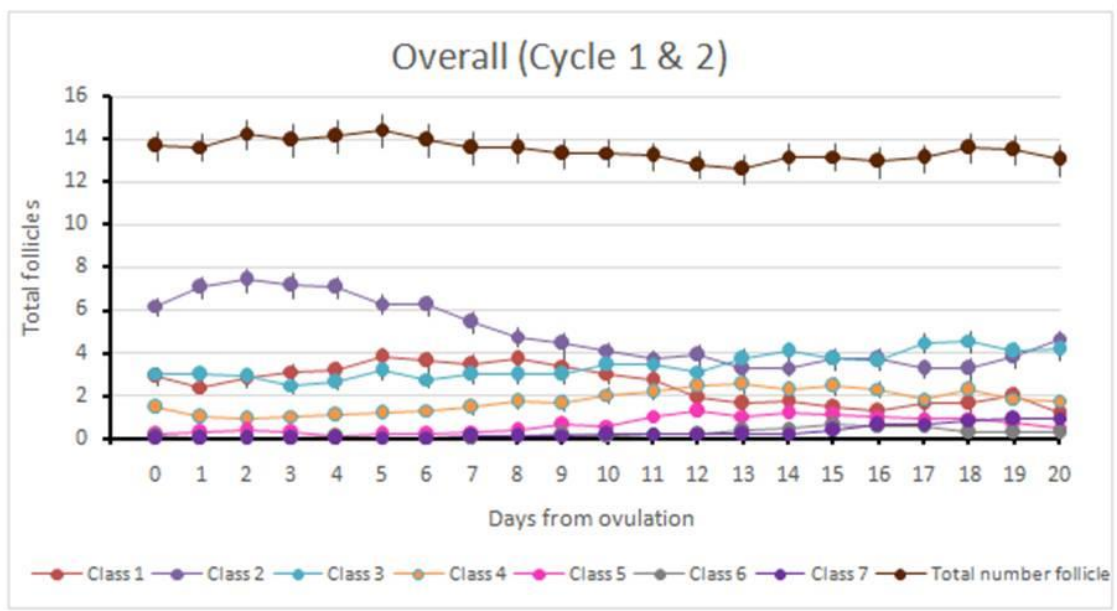


Figure 3. Follicular activity during IOI grouped in follicular classes

The diameter of the corpus luteum during the IOI began to slightly decrease after day 2 until day 14, and on day 15 its visualization was no longer possible (Fig. 4).

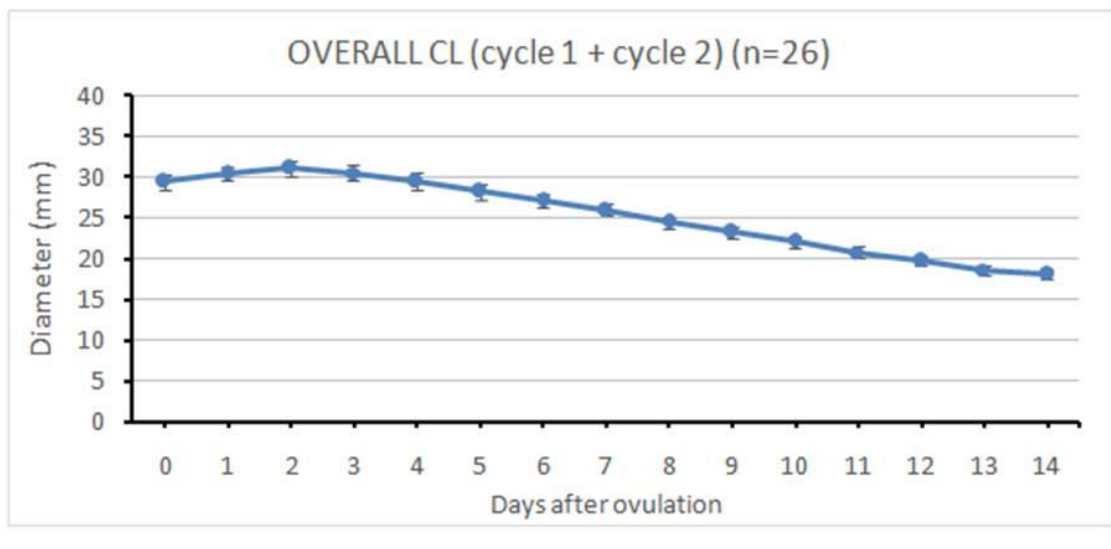


Figure 4. Development of CL during IOI

The uterine echotexture drastically increases ($P < 0.001$) after day 14 of the cycle, reaching its peak on day 16. Thereafter, the uterine echotexture decreases until ovulation, remaining close a tone score of 1 at the beginning of the diestrus (Fig. 5).

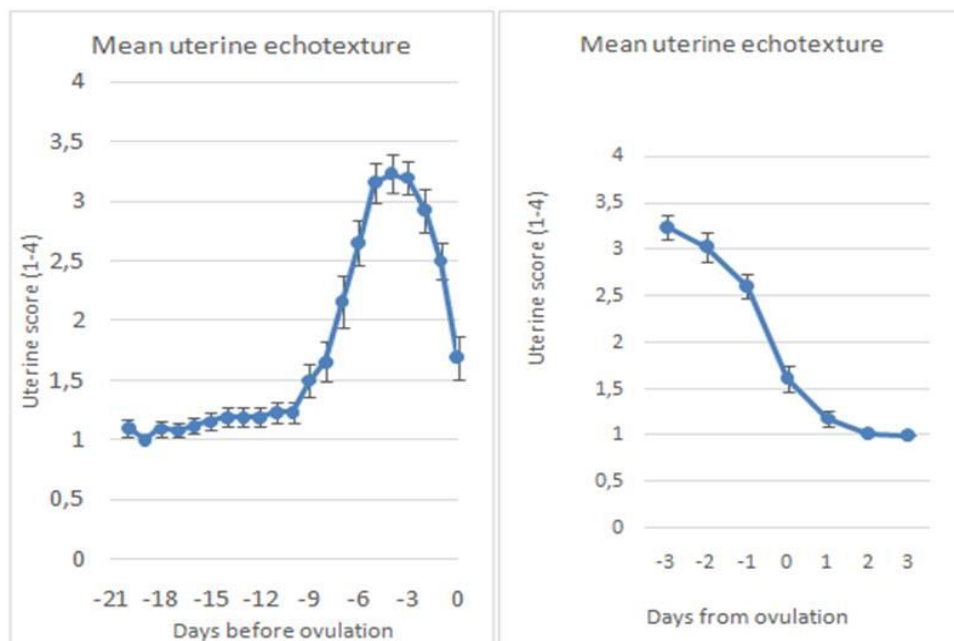


Figure 5. Uterine echotexture during IOI and the preovulatory period.

During diestrus, the uterine tone remains elevated until the onset of luteolysis (Fig. 6). In the presence of follicles larger than 20 mm, the score decreases until two days before the ovulation, concomitantly with the largest diameter of the dominant follicle. At this moment, the uterine tone starts increasing until after ovulation, reaching its plateau phase during diestrus. A strong positive correlation had been shown for the repeatability of uterine ($r = 0.72$; $P < 0.001$) and cervical tone ($r = 0.71$; $P < 0.001$) among mares/estrous cycle.

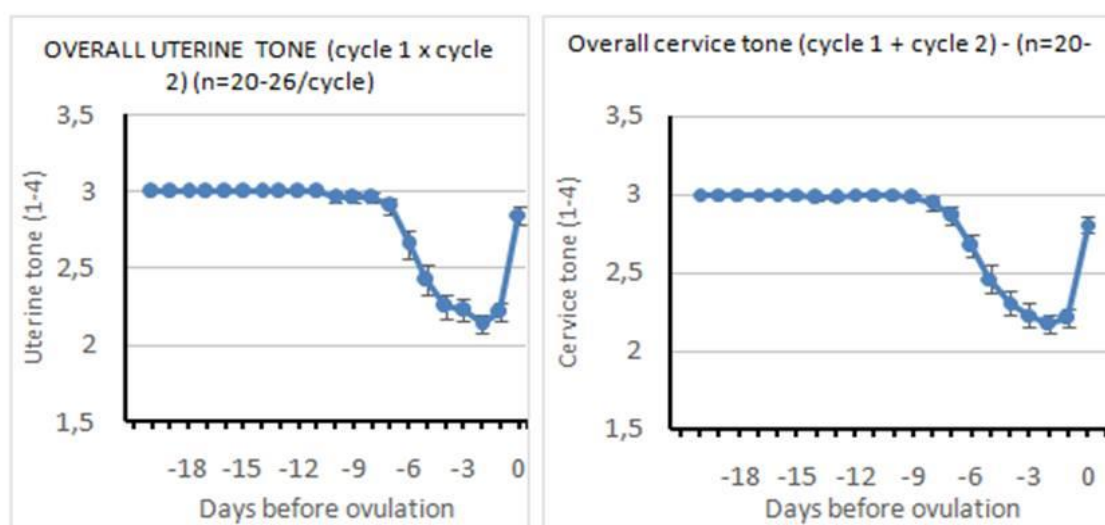


Fig. 6. Cervical and uterine tone during IOI.

4. Discussion

Researchers have reported that follicle size at ovulation (Carnevale *et al.*, 1988; Ginther and Pierson, 1989), duration of estrus and estrous cycle (Ginther, 1974; Cuervo-Arango and Newcombe, 2008), as well as time of ovulation (Koskinen *et al.*, 1989; Gastal *et al.*, 1997) can be influenced according to the breed type (Dimmick *et al.*, 1993). The understanding of ovarian dynamics within a specific horse breed is of fundamental and practical importance with respect to formulating hypotheses, and diagnoses and prognoses of reproductive function (Bergfelt and Ginther, 1996).

Therefore, to the best of our knowledge, this is the first study to describe in a detailed fashion the ovarian follicle dynamics in the Criollo breed horse. The main findings described in the present study includes but are not limited to the following: (i) the preovulatory follicle at maximum diameter and one day before ovulation had a moderate repeatability within mares during the estrous cycle; (ii) the uterine and cervix tonus had a strong repeatability within mares during the estrous cycle; (iii) animals had a total of 13 follicles between 2 to >30mm present in the ovary per day within an IOI, and (iv) major primary waves had a frequency higher than 65% in the IOI during the reproductive season.

The diameter of the preovulatory follicle in Criollo mares (43.1 ± 0.8 mm) was similar to that of ponies and Quarter horses (40.7 ± 1.4 , 44.5 ± 1.4 , respectively; Ginther *et al.*, 2004), and larger than miniponies (38.3 ± 0.7 ; Gastal *et al.*, 2008). Moreover, the repeatability of the preovulatory follicle diameter between estrous cycles within mares for the Criollo breed ($r = 0.55$) was similar to that for ponies ($r = 0.68$, Gastal *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2008). No double ovulation has been observed in Criollo mares. In addition, the largest subordinate follicle reached its maximum diameter 1.2 ± 0.4 days after deviation, and then entered in a plateau phase and regressed. In fact, the diameter of the preovulatory follicle can be influenced by several factors, such as age, season, double ovulation, type, and breed (Ginther, 1995; Ginther *et al.*, 2004; Gastal *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2010). Besides the diameter of the preovulatory follicle, the ultrasonographic changes in follicle diameter and wall characteristics before ovulation can help in predicting the exact moment of ovulation (Carnevale 1988; Gastal *et al.*, 1998, 2006, 2008, Tazawa *et al.*, 2017). Furthermore, the repeatability of preovulatory follicle diameter between estrous cycles within mare is used to foresee future estrous cycle behavior (Cuervo-Arango and Newcombe, 2008; Ginther *et al.*, 2009; Jacob *et al.*,

2009). Therefore, determining the diameter of the preovulatory follicle and its pattern during multiple estrous cycles for Criollo mares can contribute to better reproductive management in different stud farms.

Criollo mares have shown an average of 21 days for the length of the IOI. Although the length of the IOI is similar to the pattern already described for large breed horses and ponies (21 and 24 days, respectively, Ginther, 1992), the follicle emergence and deviation moment in Criollo mares occurred earlier than in large breed horses (Pierson and Ginther, 1987). The deviation moment has happened when the dominant follicle achieved 22.0 ± 0.8 mm and the subordinate follicle 21.3 ± 0.6 mm. At this moment, the growth rate between the dominant and the subordinate follicles became discrepant in the Criollo mare. Therefore, the largest follicle at the deviation moment will become the ovulatory follicle, as previously described (Ginther *et al.*, 1996; 1997, 2008). The interval between deviation to maximum diameter of the dominant follicle (8.1 ± 0.6 days) was similar to the interval between deviation to ovulation in ponies (Gastal *et al.*, 2008). The maximum diameter of the preovulatory follicle (43.8 ± 0.8 mm) occurs 1.4 ± 0.1 days before ovulation, with a negative growth rate until ovulation (-1.8 ± 0.4). According to a previous study (Ginther, 2004), 27.6% of follicles reach the maximum diameter two days before ovulation. However, the majority (66.6%) will reach the maximum diameter one day before ovulation (Gastal *et al.*, 2008). In addition, reduction in growth rate of the preovulatory follicle between the maximum diameter and ovulation has been described in miniponies (Gastal *et al.*, 2008), ponies (Gastal *et al.*, 2006), and large breed horses (Palmer and Driancourt, 1980, Koskinen *et al.*, 1989).

In the present study, Criollo mares had a higher cervical and uterine tonus after ovulation until day 14 of the estrous cycle, corresponding to the period of diestrus. Consequently, Criollo mares had a higher uterine echotexture at day 11 of the IOI, with

a maximum peak of echotexture at day 17, then decreasing during the estrous phase until the ovulation moment. Moreover, uterine and cervix tonus had a strong repeatability within mares during the estrous cycle. Similar characteristics of tonus have been described in large breed mares (Bergfelt and Ginther, 1978; Hayes, Ginther, 1986). Modifications in the cervical and uterine tonus are used, clinically and experimentally, to determine the phase of the estrous cycle (Ginther, 1979), being attributed to the progesterone and estradiol concentrations in the bloodstream (Noden *et al.*, 1975). The pattern of uterine echotexture during the estrous cycle has been well documented in miniponies (Gastal *et al.*, 2008). However, Criollo mares have the maximum endometrial echotexture score earlier than Quarter horse mares, which occurs between day 19 and 20 before ovulation (Ginther and Pierson, 1984, Gastal *et al.*, 2007). The estrous phase is shorter in the peak of the reproductive season (Palmer, 1978). The increasing of edema in the endometrial folds during estrous is indicative of high estradiol concentrations in the bloodstream and the presence of a follicle ≥ 25 mm (Pycock *et al.*, 1995), leading to changes in the evaluation of endometrial score (Ginther and Pierson, 1984). Therefore, definition of the exact moment of the beginning of the estrous phase by uterine echotexture and its repeatability within Criollo mares shows a powerful tool for the reproductive management.

Criollo mares have shown that approximately 65.1% of IOIs are major primary wave and 17.5% are secondary and minor waves. Moreover, Criollo mares had 13.5 ± 0.2 follicles between 2 to >30 mm per day within the IOI. In miniponies, a study reported only six follicles ≥ 2 mm (Gastal *et al.*, 2008), while in large breeds the number has been between 10 to 14 follicles per day within a IOI (Gastal *et al.*, 2004). Follicles between 5 to 10 mm are constantly present, growing and regressing, acting as a reservoir to the follicle waves in the equine ovary (Pierson and Ginther, 1987). In

miniponies, secondary waves are rare (Gastal *et al.*, 2008), while Quarter horses and draft horses have a 24% and 25% of incidence, respectively (Ginther, 1993; Ginther *et al.*, 2004). Furthermore, major secondary waves are common in the transition period, before the first ovulation of the reproductive season (Ginther, 1990), justifying the high incidence of only one major primary wave in Criollo mares.

In the present study, the largest diameter of the CL has been observed at 1.6 ± 0.2 days after ovulation. In addition, CL cannot be observed by ultrasound after day 15 of the estrous cycle. Although the diestrous length is similar to that in other horse breeds (Adams and Bosu, 1988) during the reproductive season, Criollo mares have achieved the largest CL diameter earlier than miniponies and large breed horses (Bergfelt and Ginther, 1996).

In conclusion, this study has shown in a comprehensive fashion the ovarian dynamics in Criollo mares during two consecutive IOI during the reproductive season. This study has characterized the pattern of the estrous cycle in the Criollo mare for the following characteristics: (i) the length of the IOI was 21 days; (ii) the emergence of the follicular wave has occurred at day 5 of the cycle; (iii) dominant and subordinate follicles emerge together and their growth rate were slower until the deviation moment; (iv) deviation occurred when the dominant follicle has achieved 22 mm; (v) the diameter of the preovulatory follicle was 43 mm, with moderate repeatability within mares; (vi) the corpus luteum has achieved its maximum diameter 1.5 days after ovulation; and (vii) the strong correlation for repeatability demonstrated that the uterine and cervical tonus can be used to determine the phase of the estrous cycle. Therefore, the results herein presented are of fundamental importance for a better understanding of the reproductive physiological patterns of the estrous cycle in the Criollo mare.

Acknowledgments

The authors thank Estância Ginkgo for the mares, undergraduate who assisted in the handling of animals during the study and Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC) for the financial support of this project.

5. References

ABCCC. Anuário da raça Crioula 2014, v.54, n.51, p.360, 2014a.

ABCCC. Manual do criador da Associação dos Criadores dos Cavalos Crioulos. Pelotas: Associação Brasileira de criadores de cavalos Crioulos, p.25, 2014b.

ADAMS, G.P.; BOSU, W.T. Reproductive physiology of the nonpregnant mare: an overview and update. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.4, p.161-176, 1988.

BAERWALD, A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1023–1031, 2003.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.16, p.66–72, 1996.

BERGFELT, D.R.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. **Form and function of the corpus luteum**. In: Rantanen N, McKinnon A, editors. Equine diagnostic ultrasonography. Baltimore: Wiley; p.221-232, 1998.

BERGFELT, S.L.; GINTHER, O.J. Effect of estrogens on uterine tone and life span of the corpus luteum in mares. **Journal of Animal Science**, v.9, p.203-208, 1978.

CARNEVALE, E.M.; MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.8, p.428-431, 1988.

CUERVO-ARANGO, J; NEWCOMBE, J.R. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. **Theriogenology**, v.69, p.681-687, 2008.

DIMMICK, M.A.; GIMENEZ, T.; SCHLAGER, R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in arabian vs. Quarter horse mares. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.123-129, 1993.

DOWDALL, R.C. **Criando Criollos**. 3rd ed. Montevideo: Editorial Hemisférico Sur S.A; p. 409, 1982.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; HAMMES, A.M.; LADEIRA, S.; TAROUCO, A.K.; MATTOS, R.C. Inflammatory and degenerative changes in the endometrium of mares of the Crioulobreed. **Pferdeheilkunde**, v.8, p.21-26, 2012.

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J.. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, v.50, p.1025–1038, 1998.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v.61, p.31-39, 1999a.

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.53, p.925–940, 2000.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Interrelationships among follicles during the common growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**, v.128, p.417-422, 2004.

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

GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.F.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Accumulation of fluid in the infundibulum during the estrous cycle in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.251–259, 2007.

GASTAL, E.L.; NEVES, A.P.; MATTOS, R.C.; PETRUCCI, B.P.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Miniature ponies: 1. Follicular, luteal, and endometrial dynamics during the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.376-385, 2008.

GASTAL, E.L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction**, v.6, p.144-158, 2009.

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

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**, 1st Ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1979.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**, v.1, p.471-483, 1984.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.9, p.4-12, 1989.

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.3113-20, 1990.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare, basic and applied aspects**. 2nd Ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, p.642, 1992.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Ultrasonic characterization of follicular waves in mares without maintaining identity of individual follicles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.12, p.349-354, 1992.

GINTHER, O.J. Major and minor follicular wave during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.18-25, 1993.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2, Horses. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1995.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBINS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.181-186, 1997.

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v.1, p.45–63, 2004.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.417–423, 2008.

GINTHER, O.J.; JACOB, J.C.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A. Development of one versus multiple ovulatory follicles and associated systemic hormone concentrations in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.441-449, 2009.

HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25, p.581-590, 1986.

HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T.; GINTHER, O.J. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, v.24, p.465-477, 1985.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATES, B.F. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.371-72, 1983.

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

KOSKINEN, E.; KUNTSI, H.; LINDEBERG, H.; KATILA, T. Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. **Journal Veterinary Medical**, v.36, p.299–304, 1989.

MOREL, M.; DAVIES, C.G.; NEWCOMBE, J.R.; HAYWARD, K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). **Theriogenology**, v.74, p.1241-1247, 2010.

NODEN, P.A.; OXENDER, W.D.; HAFS, H.D. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.189-192, 1975.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.13, p.203–216, 1980.

PALMER, E. Control of the oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.495-505, 1978.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.3, p.203–216, 1980.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.359-368, 1985.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Animal Reproduction Science**, v.14, p.219-231, 1987.

PONS, D.S. **O Cavalo Crioulo – Seis décadas de experiência**. Guaíba: Editora Agropecuária, p.143, 1993.

PYCOCK, J.F.; DIELEMAN, S.; DRIFJHOUT, P.; VAN DER BRUG Y, O.E.I. C.; VAN DER WEIJDEN, G.C. Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrous behaviour in the cycling mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.30, p.224-227, 1995.

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

SIROIS, J.; BALL, B.A.; FORTUNE, J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the oestrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.8, p.43–48, 1989.

SOLANET, E. **Tratado de hipotecnia**. Buenos Aires: Editora Morata, p.401, 1946.

TAZAWA, S.P.; GASTAL, M.O.; SILVA, L.A.; EVANS, M.J.; GASTAL, E.L. Preovulatory follicle dynamics, ovulatory and endometrial responses to different doses of hCG, and prediction of ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.56, p.40–51, 2017.

TEIXEIRA, A.L. **Cavalo Crioulo – O símbolo do Rio Grande do Sul**. 2nd ed. Porto Alegre: Editora Viver no campo, p.252, 2011.

VILA, F.; VALERA, M.; MOLINA, A. The Criollo horse in Uruguay. **Animal genetic resources information**, v.22, p.43-52, 1997.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCCC, Manual do Criador da Associação dos Criadores dos Cavalos Crioulos. p.25, 2014a.

ABCCC. Anuário da raça Crioula 2014, v.54, n.51, p.360, 2014b.

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

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p.127-140, 2004.

ADAMS, G.P.; BOSU, W.T. Reproductive physiology of the nonpregnant mare. An overview and update. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.4, p.161-176, 1988.

ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v.43, p.113–120, 1995.

AITKEN, W.A. The oestrous cycle of the mare. **Veterinary Practice Bulletin**, v.8, p.178–189, 1926.

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: The role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reproduction**, v.2, p.139-146, 1997.

BAERWALD, A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1035–1043, 2003.

BAKER, C. B.; KENNEY, R. M. **Systemathic approach to the diagnosis of the intertile and subfertile mare**. In: MORROW (ed) Current therapy in theriogenology. Phyladelphia: W. B. Saunders Co. p. 721-736, 1980.

BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle and horses: Role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v.132, p.365-377, 2006.

BERGFELT, S.L.; GINTHER, O.J. Effect of estrogens on uterine tone and life span of the corpus luteum in mares. **Journal of Animal Science**, v.9, p.203-208, 1978.

BERGFELT, D.R.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v.65, p.426-432, 2001.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F₂ α no endométrio de fêmeas bovinas**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.185, 2004.

BURATINI, J.J. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga utilizando a ultrassonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante**. Tese (Mestrado) – Departamento de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.66, 1997.

CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Inhibin a is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. **Journal of Endocrinology**, v.169, p.333-345, 2001.

CARMO, M.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M., MEDEIROS, A.S.L; ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de

Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.252-254, 2002.

CARNEVALE, E.M.; MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.8, p.428-431, 1988.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Aging effect on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.287-299, 1993.

CARNEVALE, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, p.23-30, 2008.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Animal**. 3.ed. Guanabara Koogan, p.596, 2004.

DAELS, P.F.; DEMORAES, M.J.; STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P.; LASLEY, B.L. The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.501-508, 1991.

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

DESKUR, S. Twinning in Thoroughbred mares in Poland. **Theriogenology**, v.23, p.711-718, 1985.

DIMMICK, M.A.; GIMENEZ, T.; SCHLAGER R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian vs. Quarter Horse mares. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.123-129, 1993.

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and fsh in mares. **Reproduction**, v.121, p.897-903, 2001.

DRIANCOURT, M.A. Follicular kinetics in the mare ovary. **Annales de Biologie Animale Biochimie**, Biophysique, v.19, p.1443-1453, 1979.

DRIANCOURT, M.A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J.C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reproduction Nutrition Development**, v.22, p.1035-1047, 1982.

DUVAL, L.H; E.J.C.P. DUVAL; CORCINI, C; FIALA, SM. Eficiência reprodutiva de éguas Crioulas em monta controlada. Anais do Salão d Iniciação Cientifica UCPEL. 2011.

DUVAL, L.H; E.J.C.P. DUVAL; CORCINI, C; FIALA RECHSTEINER, S.M. Aspectos reprodutivos de equinos Crioulos em sistema de manada durante 28 anos. Anais do Salão de Iniciação Cientifica UCPEL. 2012.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; HAMMES, A.M.; LADEIRA, S.; TAROUCO, A.K.; MATTOS, R.C. Inflammatory and degenerative changes in the endometrium of mares of the Crioulo breed. **Pferdeheilkunde**, v.28, n.1, p.21-26. 2012.

FREEDMAN, L.J.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Influence of ovaries and photoperiod on reproductive function in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, p.79-86, 1979.

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**, v.128, p.417-422, 2004.

GASTAL, E. L.; NEVES, A. P.;MATTOS, R. C.; PETRUCCI, B. P. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Miniature ponies: Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.376–385, 2008a.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; NEVES, A.P.; PETRUCCI, B.P.L.; MATTOS, R.C; GINTHER,O.J. Miniature ponies: Similarities and differences from larger breeds in follicles and hormones during the oestrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.9, p. 508-517, 2008b.

GIANLUPPI, L. D. F.; BORTOLI, E. C.; SCHVARZ, R.; FALCÃO, B. T. F.; SILVA, T. N. Agregação de valor em equinos da raça Crioula: um estudo de caso. **Archivos de Zootecnia**. v.58 n.223, p.471-474, 2009.

GINTHER, O.J.; WHITMORE, H.L.; SQUIRES, E.L. Characteristics of estrus, diestrus, and ovulation in mares and effects of season and nursing. **American Journal Veterinary Research**, v.33, p.1935–1939, 1972.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, p.417, 1979.

GINTHER, O.J. Twinning in mares. A review of recent studies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.21, p.127-135, 1982.

GINTHER. O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**,v. 21,p.471-483, 1984.

GINTHER, O.J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v.3, p.41-47, 1985.

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.311–320, 1990.

GINTHER, O.J.; BERGFELT D. R. Ultrasonic characterization of follicular waves in mares without maintaining identity of individual follicles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.12, n.6, p.349-354, 1992.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**. 2nd ed. Equiservices Publishing: Cross Plains, WI, USA. 1992.

GINTHER, O.J. Major and minor follicular wave during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.18-25, 1993.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.105-111, 1993.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 2, Horses**. Equiservices Publishing: Cross Plains, WI, USA. 1995.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBINS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v.60, n.61, p.61-79, 2000.

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

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: relationship among growth rate, diameter ranking and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**,v.65, p.345–350, 2001b.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; GASTAL E.L.; GASTAL, M.O.; BERGFELT, D.R.; BAERWALD, A.R.; PIERSON R.A. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and woman. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1195-1201, 2004a.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v.1, p.45–63, 2004b.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A.: Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: A comparative study. **Reproduction**, v.130, p.379-388, 2005.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB , J.C.; SIDDIQUI, M.A.; BEG, M.A. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.955– 963,2008.

GINTHER, O.J. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis.**Theriogenology**,v.72, p.591–598, 2009.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v.71, p.780-788, 2009.

GINTHER, O.J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.57, p.85–99, 2016.

GINTHER O.J. Systemic and intrafollicular components of follicle selection in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.59, p.116–133, 2017.

GLISTER, C.; TANNETTA, D.S.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1020-1028, 2001.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, J.; GERARD, N.: Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, alpha-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1120-1127, 1999.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Research application of ultrasonic imaging in reproductive biology. **Journal of Animal Science**, v.70. p.953, 1992.

GURGEL, J.R.C.; VIANA, C.H.C.; PEREZ, E.G.A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.122-132, 2008.

HAYES, K. E. N.; PIERSON, R.A.; SCRABA,S.T; GINTHER,O.J. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, v.24, n.4, p.465-477,1985.

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25, n.4, p.581-590, 1986.

HENRY, M. **Some Special Aspects of the physiopathology of reproduction in mares**. Gent. Tese (Doutorado), Universidade de Gent, Bélgica, p. 219 1981.

HENRY, M.; CORYN, M.; VANDEPLASSCHE, M. Multiple ovulation in the mare. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe**, v.29, p.170-184, 1982.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. The oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.161-166, 1975.

IRELAND, J.J.; ROBERTS, R.M.; PALMER, G.H.; BAUMAN, D.E.; BAZER, F.W. A commentary on domestic animals as dual-purpose models that benefit agricultural and biomedical research. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2797– 2805, 2008.

IRVINE, C.H.; ALEXANDER, S.L. The dynamics of gonadotrophin releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. **Journal of Endocrinology**, v.140, p.283-295, 1994.

IRVINE, C.H.; ALEXANDER, S.L.; MCKINNON, A.O. Reproductive hormone profiles in mares during the autumn transition as determined by collection of jugular blood at 6 h intervals throughout ovulatory and anovulatory cycles. **Journal of reproduction and fertility**, v.118, p.101-109, 2000.

JAISSWAL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. High-resolution ultrasound biomicroscopy for monitoring ovarian structures in mice. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v.7, p.69, 2009.

KAWATE, N.; MORITE, A.N.; TSUJI, M.; TAMADA, H.; INABA, T.; SAWADA, T. Roles of pulsatile release of LH in the development and maintenance of corpus luteum function in the goat. **Theriogenology**, v.54, p.1133-1143, 2000.

KLEIN, N.A.; SOULES, M.R. Endocrine changes of the perimenopause. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.41, p.912–920, 1998.

KOSKINEN, E.; KUNTSI, H.; LINDEBERG, H.; KATILA, T. Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. **Journal Veterinary Medical**, v.36, p.299–304, 1989.

KURTZ, M., LÖF, H.K. Biometria de equinos da raça Crioula no Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.12, n.1, p.47-51, 2007.

LINCOLN, G. A. The pineal gland. In: AUSTIN, G. H.; SHORT, F. R. S. (eds). **Reproduction in Mammals, Hormonal control of Reproduction**. 2. ed. New York: Cambridge University press. p. 52-75, 1987.

LOSINNO, L.; AGUILAR, J.; LISA, H.; Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v.3, p.81-83, 2000.

LUIS, J.H.C; QUINTERO, A.Z. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. **Ciência Veterinária**, v.8, p.1-28, 1998.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: Follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of Reproduction**, v.73, p.45–53, 2005.

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

MILLIGAN, S.R.; KHAN, A.A.; THORNE, B.C. Delayed pseudopregnancy in the mouse. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.60, p.49 –51, 1980.

MILVAE, R.A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2alpha in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.1-5, 2000.

MIRCEA, C.N.; LUJAN, M.E.; JAISWAL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Ovarian imaging in the mouse using ultrasoundbiomicroscopy (UBM): A validation study **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.365–370,2009.

MONGET, P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**,v.49, p.321-333, 1995.

MOURA, C.E.B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, p123, 2003.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P.: Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.245-262, 2000.

NODEN, P.A.; OXENDER, W.D.; HAFS, H.D. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.189-192, 1975.

OSBORNE, V. E. Analysis of the pattern of ovulation as it occurs in the annual reproductive cycle of the mare in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.42, p.149-154, 1966.

PALMER, E. Control of the oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.495-505, 1978.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.13, p.203–216, 1980.

PATE, J.L.; KEYES, P.L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v.122, p.665-676, 2001.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.21, p.495–504, 1984.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.359-368, 1985.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Animal Reproduction Science**, v.14, p.219- 231, 1987.

PIMENTEL, A.P.; TAROUCO, A.K.; HAMMES, A.M. Ovulações múltiplas em éguas abatidas em Pelotas-RS. **Ciência Rural**, v.25, n.2, p. 271-275, 1995.

PONS, D. S. **O cavalo crioulo – seis décadas de experiência**. Editora Agropecuária. Guaíba, p.142, 1993.

PYCOCK, J. F.; DIELEMAN, S.; DRIFJHOUT, P.; VAN DER BRUG, Y.; OEI, C.; VAN DER WEIJDEN, G.C. Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrous

behaviour in the cycling mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.30, n.4, p.224-227, 1995.

RAMBAGS, B.P.B.; VAN BOXTEL, D.C.J.; THARASANIT, T.; LENSTRA, J.A.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Oocyte mitochondrial degeneration during reproductive ageing in the mare. **Havemeyer Foundation Monograph**, v.18, p. 25–27, 2005.

RAZ, T.; AHARONSON-RAZ, K. Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in the Mare. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.67, n.1, p.11-18, 2012.

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

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1671-1681, 1998.

ROMANO, M.A.; MUCCIOLO, R.G.; SILVA, A.E.F. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n.1, p.25-28, 1998.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**, 2nd ed. Department of Animal Sciences, State University, Pullman, USA, p.272, 1997.

SHARP, D. C. Environmental influences on reproduction in horses. **Veterinary Clinics of North America**, v. 2, p. 207-223, 1980.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.371–399, 2003.

SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.V.; RICKE, W.A.; KOJIMA, F.N.; SMITH, G.W. Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function.

Journal of Reproduction and Fertility, v.54, p.367-381, 1999.

SOULES, M.R.; BATTAGLIA, D.E.; KLEIN, N.A. The endocrinology of ovarian (reproductive) aging in women. **In: Female Reproductive Aging**, Parthenon, p.79–100, 2000.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulinlike growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.223-245, 1995.

SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; SHIDELER, R. K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, n.29, v.1, p.55-70, 1988.

TAROUCO, A.K.; HAMMES, A.M.; PIMENTEL, C.A. Estacionalidade reprodutiva de éguas abatidas em Pelotas-RS. **Arquivos Da Faculdade De Veterinária Da UFRGS**, v.23, p.22-36, 1994.

TARSO, S.G.S.; GASTAL, G.D.A.; BASHIR, S.T.; GASTAL, M.O.; APGAR, G.A.; GASTAL, E.L. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p. 448–457, 2017.

TEIXEIRA, A. L. **Cavalo Crioulo – O símbolo do Rio Grande do Sul**. Editora: Viver no Campo, 2ed., 2011.

WATSON, E.D.; MCDONNELL, A.M.; CUDDEFORD, D. Characteristics of cyclicity thoroughbred mares in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.135. p.104-106, 1994.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.277-285, 2002.

WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; SANGSRITAVONG, S.; SARTORI, R.; GINTHER, O.J. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.83, p.1–10, 2000.

ZÚCCARI, C.E.S.N.; NUNES, D.B.; CORRÊA FILHO, R.A.C. Eficiência reprodutiva de éguas da raça pantaneira durante as estações de monta 1995/2000. **Arquivos Brasileiros de Zootecnia**, v.51, p. 139-148, 2002.