

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ISABELA DE SOUSA VAZ

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO EDEMA ENDOMETRIAL E OS
PARÂMETROS REPRODUTIVOS NO ESTRO, DIESTRO E A RELAÇÃO COM A
FERTILIDADE EM ÉGUAS**

UBERLÂNDIA

2025

ISABELA DE SOUSA VAZ

ASSOCIAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO EDEMA ENDOMETRIAL E OS
PARÂMETROS REPRODUTIVOS NO ESTRO, DIESTRO E A RELAÇÃO COM A
FERTILIDADE EM ÉGUAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de
Uberlândia como exigência parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

UBERLÂNDIA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

V393a Vaz, Isabela de Sousa, 1995-
2025 Associação entre a duração do edema endometrial e os parâmetros reprodutivos no estro, diestro e a relação com a fertilidade em éguas [recurso eletrônico] / Isabela de Sousa Vaz. - 2025.

Orientadora: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.5555>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Éguas. 3. Fertilidade. 4. Progesterona. 5. Reprodução animal. I. Silva, Elisa Sant'Anna Monteiro da, 1985-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico PPGCVET Nº 13/2025				
Data:	20 de maio de 2025	Hora de início:	14:00 h	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	12312MEV012				
Nome do Discente:	Isabela de Sousa Vaz				
Título do Trabalho:	ASSOCIAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO EDEMA ENDOMETRIAL E OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS NO ESTRO, DIESTRO E A RELAÇÃO COM A FERTILIDADE EM ÉGUAS				
Área de concentração:	Produção Animal				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Técnicas laboratoriais e moleculares na reprodução animal				

Reuniu-se no Anfiteatro do Hospital Veterinário, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Dra. Ricarda Maria dos Santos - (FMVZ/UFU); Dr. Juan Cuervo-Arango Lecina - (Universidad CEU Cardenal Herrera - Valencia, Espanha) e Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva - (FMVZ/UFU), orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Sant'anna Monteiro da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/05/2025, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/05/2025, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juan Cuervo-Arango Lecina, Usuário Externo**, em 20/05/2025, às 19:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6306442** e o código CRC **AC811036**.

Referência: Processo nº 23117.028876/2025-75

SEI nº 6306442

ISABELA DE SOUSA VAZ

ASSOCIAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO EDEMA ENDOMETRIAL E OS
PARÂMETROS REPRODUTIVOS NO ESTRO, DIESTRO E A RELAÇÃO COM
A FERTILIDADE EM ÉGUAS

Dissertação aprovada para a obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia, pela banca
examinadora formada por:

Uberlândia, 20 de maio de 2025.

Prof^a. Dr^a. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Prof. Dr. Juan Cuervo Arango Lecina

Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos

RESUMO

Várias associações envolvendo parâmetros reprodutivos do estro e diestro, como duração e intensidade do edema endometrial, diâmetro do folículo pré-ovulatório, tamanho do corpo lúteo e dosagem de progesterona, já foram descritas. No entanto, não há relatos de associação da duração do edema endometrial, que já foi relacionada positivamente com a receptividade uterina e fertilidade, com parâmetros relevantes encontrados no estro e diestro. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se existe associação entre os dias de edema endometrial (DEdema) e os parâmetros: grau máximo de edema (MEdema), maior folículo pré-ovulatório (LPF), tamanho do CL e tônus uterino no D5 (CLD5 e TD5) e concentração de progesterona (P4), bem como com a fertilidade. Foram avaliados 88 ciclos divididos entre Estro Curto (EC), Estro Longo (EL), Inseminados (IA) e Não Inseminados (N-IA), e a partir da detecção de um folículo dominante e edema uterino $\geq 1,5$, o acompanhamento ultrassonográfico foi realizado diariamente até o dia da ovulação (D0). Nesse período, os dados de diâmetro do folículo dominante e grau de edema endometrial foram registrados e, no D5 foram avaliados tamanho de CL, tônus uterino e realizada coleta sanguínea para dosagem de P4. Dos ciclos avaliados, 30,7% (27/88) foram EC e 69,3% (61/88) EL. As principais correlações observadas foram entre DEdema e as variáveis LPF ($p=0,001$; $r=0,32$), MEdema ($p=0,002$; $r=0,31$) e TD5 ($p=0,01$; $r=0,28$). Ainda, DEdema foi significativamente maior nas éguas gestantes. Como conclusão, a duração do edema endometrial influencia características importantes do ciclo e também a fertilidade.

Palavras-chave: edema uterino, progesterona, corpo lúteo.

ABSTRACT

Several associations among reproductive parameters during estrus and diestrus - such as the duration and intensity of endometrial edema, pre-ovulatory follicle diameter, corpus luteum (CL) size and progesterone concentration - have been previously described. However, no studies have examined the relationship between the duration of endometrial edema - which has been positively associated with uterine receptivity and fertility in mares - and other key parameters observed during estrus and diestrus. Therefore, the objective of this study was to evaluate the relationship between the Days of Endometrial Edema (DEdema) and the parameters: Maximum Edema (MEdema), Largest Pre-ovulatory Follicle (LPF), CL size and uterine tone on day 5 (CLD5 and TD5), progesterone concentration (P4), and fertility. A total of 88 cycles from 36 mares were evaluated and divided into Short Estrus (SE), Long Estrus (LE), Inseminated (AI), and Non-Inseminated (N-AI) groups. From the detection of a dominant follicle and uterine edema ≥ 1.5 , mares were monitored daily until ovulation (D0). During this period, data on dominant follicle diameter and endometrial edema were recorded. On D5, CL size and uterine tone were assessed and blood was collected for P4 measurement. Of all cycles, 30.7% (27/88) were SE and 69.3% (61/88) LE. Significant correlations were observed between DEdema and the variables: LPF ($p = 0.001$; $r = 0.32$), MEdema ($p = 0.002$; $r = 0.31$), and TD5 ($p = 0.01$; $r = 0.28$). Furthermore, DEdema was associated with higher pregnancy rates. In conclusion, the duration of endometrial edema influences key estrous cycle parameters, as well as fertility.

Keywords: Uterine edema, Progesterone, Corpus luteum.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	7
1. Introdução.....	8
2. Revisão de Literatura.....	9
2.1 Sazonalidade Reprodutiva	9
2.2 Ciclo Estral	10
2.3 Relação entre estro e fertilidade	11
2.4 Associação entre características do estro, diestro e fertilidade	12
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO II	17
Abstract.....	18
1. Introduction	19
2. Materials and Methods.....	19
2.1 Animals.....	19
2.2 Experimental Design	20
2.3 Ultrasound and Rectal Palpation	22
2.4 Blood collection and P4 measurement	22
2.5 Semen and inseminations	23
2.6 Pregnancy Diagnosis and Embryo Recovery	23
2.7 Statistical Analysis.....	24
3. Results	24
3.1 Overall correlations between reproductive parameters of estrus and diestrus	25
4.2 Correlations within groups.....	25
4.3 Correlations between reproductive parameters and P4 concentration	26
4.4 Comparisons between groups.....	26
4. Discussion.....	29
References	32

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS
(Redigido de acordo com as normas da Biblioteca – UFU)

1. Introdução

Éguas são poliétricas sazonais que apresentam ciclicidade reprodutiva em períodos do ano com maior luminosidade diária (AURICH, 2011). Os ciclos estrais são divididos em estro e diestro: O estro, período entre a luteólise e a ovulação, é caracterizado pela predominância de estrógeno produzido pelos folículos ovarianos e possui duração variável, de 2 a 14 dias (GINTHER; PIERSON, 1989; SANTOS et al., 2015). Já o diestro se inicia após a ovulação, a partir da formação do corpo lúteo (CL), responsável por secretar o hormônio progesterona (P4), que se encontra em altas concentrações durante a fase, que dura em média, entre 12 e 16 dias (GINTHER, 1992; SANTOS et al., 2015).

Durante a rotina de programas de reprodução equina, a palpação e ultrassonografia transretal são frequentemente realizadas para avaliar características importantes do ciclo estral das éguas. Durante o estro, as principais variáveis avaliadas são o edema endometrial e o diâmetro dos folículos ovarianos, enquanto no diestro, são avaliadas características do CL, como tamanho, morfologia e ecogenicidade, bem como o tônus uterino.

Estudos prévios associaram algumas características do estro com variáveis do diestro e a fertilidade em éguas. Um estudo de Cuervo-Arango et al. (2018) correlacionou positivamente a duração do estro, acompanhado de edema uterino, com as taxas de prenhez subsequentes. Outro estudo concluiu que folículos pré-ovulatórios maiores produzem CL's maiores e mais vascularizados, levando a uma maior concentração de P4 durante o diestro (ISHAK et al., 2017), enquanto Colombo et al. (2022) encontraram somente correlação fraca entre o tamanho do folículo pré-ovulatório com a produção de P4, área do CL e o edema pré-ovulatório. Ainda, foi relatado que a concentração plasmática de P4 no período pós ovulatório teve correlação positiva com as taxas de gestação em éguas (HOLLINSHEAD et al., 2022).

Embora muitas associações já tenham sido observadas, não há relatos que investiguem a correlação entre a duração do estro, representada pela duração do edema endometrial, com parâmetros reprodutivos do estro e principalmente diestro. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo principal avaliar se há correlação entre a duração do edema endometrial com os parâmetros do estro: diâmetro folicular e grau de edema máximo; do diestro: tamanho do CL, tônus uterino e concentração

plasmática de P4; e com a fertilidade. Além disso, também foi avaliado se existe correlação entre todas as variáveis investigadas.

2. Revisão de Literatura

2.1 Sazonalidade Reprodutiva

Éguas são caracterizadas como poliêstricas estacionais e a ocorrência de ciclos ovulatórios está associada aos períodos de maior luminosidade diária, o que ocorre entre o início da primavera e o final do verão (AURICH, 2011). A sazonalidade reprodutiva das éguas está diretamente relacionada à fisiologia hormonal, mas também depende de fatores extrínsecos, como idade, raça, temperatura do ambiente e condição corporal (GINTHER, 1992; NAGY et al., 2000). A melatonina é secretada pela glândula pineal quando há ausência de luminosidade, e é responsável por inibir a secreção de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), dessa forma, a concentração de melatonina é inversamente proporcional à concentração de hormônios reprodutivos (BERGFELT, 2009; RESENDE et al., 2022). A região geográfica também influencia esse processo, sendo que em latitudes mais ao norte ou ao sul, onde a variação no fotoperíodo é mais acentuada, a sazonalidade se torna ainda mais pronunciada. Segundo Ginther (2004), a estação reprodutiva de éguas é dividida em quatro fases, baseada na dinâmica folicular: fase de anestro, de transição de primavera, ovulatória e de transição de outono.

A fase de anestro ocorre geralmente durante o outono e inverno, quando há queda da incidência de luz diária, o que leva a diminuição da incidência de ovulações (GINTHER, 1992). Durante essa fase, as éguas permanecem com pouca atividade folicular e com ovários pequenos (SHARP, 1980), os quais são consequência da queda estacional da produção do GnRH pelo hipotálamo, em função de períodos prolongados de secreção da melatonina (AURICH, 2011).

A fase de transição de primavera é caracterizada pelo aumento gradual da luminosidade diária e do crescimento folicular. Nesta fase há o desenvolvimento de algumas ondas foliculares anovulatórias previamente a ocorrência da primeira ovulação da estação (DONADEU; WATSON, 2007). O fator mais importante para o início da atividade ovulatória no final da fase de transição é o aumento na

concentração do LH circulante, responsável pela maturação final do folículo (AURICH, 2011).

Durante a estação ovulatória, correspondente aos meses de maior luminosidade diária (final da primavera e verão), as éguas ciclam em intervalos regulares e apresentam ondas de crescimento folicular que dão origem aos folículos ovulatórios (GINTHER, 2004). Já no período de transição de outono, ocorre redução na concentração do LH e consequente desenvolvimento de folículos anovulatórios, redução na taxa de crescimento folicular e posteriormente redução na atividade ovariana (IRVINE et al., 2000; AURICH, 2011).

2.2 Ciclo Estral

O ciclo estral tem duração média de 21 dias em éguas e é definido como o intervalo entre duas ovulações (BERGFELT, 2000). Cada ciclo é dividido em duas fases: estro ou fase folicular e diestro ou fase luteal (GINTHER, 1992).

O estro se caracteriza pela presença de folículos ovarianos em diferentes tamanhos e pelo aumento, principalmente, do estrógeno 17 β -estradiol (E2; SATUÉ; GARDÓN, 2013). O folículo dominante e posteriormente pré-ovulatório é responsável pela secreção de estrógeno, levando a altas concentrações plasmáticas desse hormônio que é responsável por induzir comportamentos típicos de cio manifestados durante o estro (CROWELL-DAVIS, 2007). Além disso, os estrógenos são responsáveis pelas alterações no aparelho reprodutivo que asseguram o recebimento e transporte do sêmen para o oviduto, assim como a fertilização do oócito (BERGFELT, 2000). No útero, os estrógenos aumentam a vascularização e extravasamento de líquido dos vasos para a área intersticial, caracterizando o edema endometrial observado durante o exame ultrassonográfico (GINTHER, 1992). O estro tem duração média de 5 a 7 dias, mas pode variar muito, de 2 até 14 dias de duração, e se encerra com a ovulação, quando as concentrações dos estrógenos reduzem até atingir níveis basais (GASTAL, 2009).

O diestro se inicia logo após a ovulação, por meio da formação do CL, responsável pela síntese de P4. Nesta fase observa-se a ausência do edema uterino e a égua não é mais receptiva ao macho (SATUÉ; GARDÓN, 2013; CROWELL-DAVIS, 2007). A P4 é responsável pelo aumento do tônus uterino e estímulo à secreção histotrófica, responsável pela nutrição inicial do embrião no útero

(VANDERWALL, 2011). A fase luteal tem duração aproximada de 14 a 15 dias e, na ausência de um conceito e do reconhecimento materno da gestação, o CL é lisado pela PGF2 α de origem endometrial por volta dos 13 a 16 dias pós-ovulação. Desta forma, ocorre a diminuição da concentração de P4, o que permite o início de uma nova fase folicular (DAELS; HUGHES, 1993).

Nas éguas, a concentração circulante de P4 aumenta imediatamente após a ovulação (D0), e atinge concentrações máximas entre D6 e D8, quando então reduz gradativamente até o início da luteólise (D13), período no qual há queda abrupta até atingir concentrações basais. Esse processo se dá após a secreção endometrial de PGF2 α e é caracterizado pela redução das concentrações de P4 plasmática, já que a regressão morfológica do CL é mais lenta e tardia (CASTRO et al., 2021; AURICH, 2011).

2.3 Relação entre estro e fertilidade

O estro das éguas possui duração variável e pode ser classificado como estro curto, com duração de até 3 (CUERVO-ARANGO et al., 2018) ou 4 dias (MATEU-SANCHEZ et al., 2016), ou como estro longo (4 dias ou mais de duração; CUERVO-ARANGO et al., 2018).

Alguns estudos demonstraram que estros mais duradouros, com maior tempo de exposição à altas concentrações de estrógeno, podem ser benéficos para as taxas de gestação subsequentes (CUERVO-ARANGO et al., 2018; MATEU-SANCHEZ et al., 2016). A maior duração do estro influencia positivamente a qualidade do oócito, além de melhorar o ambiente do oviduto, o que favorece o processo de fertilização (GEBHARDT et al., 2012) e, consequentemente, as taxas de gestação.

Outros estudos, realizados com éguas receptoras acíclicas, também observaram que mais dias de exposição ao estrógeno e presença de edema endometrial favoreceram o ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário. Em um primeiro experimento, Silva et al. (2019) avaliaram o efeito de três tratamentos sobre a expressão gênica uterina: LE (estro longo) com 5 aplicações de estrógenos e edema endometrial presente por 7 dias previamente à aplicação de P4, SE (estro curto) com apenas 1 aplicação de estrógeno e presença de edema uterino por 2 dias e NE (sem estro) grupo que recebeu apenas administração de P4 e não apresentou edema endometrial. Além disso, Silva et al. (2021) realizaram outro estudo com os mesmos

grupos LE e SE, somados a outro grupo de estro longo, porém com apenas duas aplicações de estrógeno, com o intuito de tornar o protocolo mais praticável para os profissionais de campo. Em ambos os experimentos foi concluído que a expressão gênica de uterocalina (proteína que fornece nutrientes ao embrião em seus estágios iniciais) foi significativamente maior nos protocolos de estro longo quando comparados aos demais grupos.

Posteriormente, Silva et al. (2024) realizaram os mesmos tratamentos (LE, SE e NE) para avaliar seus efeitos sobre a viabilidade embrionária, e concluíram que maior exposição ao estrógeno tende a melhorar a sobrevivência embrionária dentro de 48 horas após a transferência de embrião.

2.4 Associação entre características do estro, diestro e fertilidade

Algumas associações entre as características do estro, diestro e fertilidade já foram relatadas. Em relação ao edema endometrial, um estudo objetivou determinar o efeito da sua duração nas taxas de gestação e na perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião. Os autores concluíram que os ciclos com estros mais longos (acima de 3 dias de duração), acompanhados de edema endometrial, tiveram taxa de gestação mais altas quando comparados às éguas com menos de 3 dias de edema (CUERVO-ARANGO et al., 2018).

A fim de determinar diferença de concentração de P4 e a área de tecido luteal entre éguas não inseminadas, inseminadas gestantes e inseminadas não gestantes, Colombo et al. (2022) avaliaram as variáveis: tamanho do folículo pré-ovulatório, edema endometrial pré ovulação e a concentração de P4 e área do CL desde o dia da ovulação (D0) até o D10. Como resultado, os autores observaram apenas uma fraca correlação positiva entre o tamanho do folículo pré-ovulatório com a concentração de P4, área do CL e com o edema pré-ovulatório.

Ainda considerando parâmetros do estro e diestro, Ishak et al. (2017) testaram duas hipóteses: de que os diâmetros do folículo pré-ovulatório e CL tinham correlação com a sua vascularização e com a concentração de P4; e que o tamanho e vascularização dos folículos pré-ovulatórios de uma mesma égua são semelhantes tanto na primavera quanto no outono. Para isso, dados de tamanho e vascularização do folículo pré-ovulatório e CL e de concentração de P4 foram registrados durante o início (primavera) e final (outono) da estação de monta. Entre os resultados

encontrados, foi observada correlação positiva moderada a forte entre o diâmetro do folículo e vascularização do CL com a concentração de P4.

Grabowska e Kozdrowski (2022) realizaram outro estudo, utilizando éguas gestantes, no qual correlacionaram a dosagem de P4 no D14 com as variáveis: edema máximo, líquido intrauterino após inseminação artificial, número de lavados uterinos realizados até o útero encontrar-se livre de líquido, e o tempo, em dias, entre o dia da inseminação e o 1º dia do útero sem líquido; a fim de testar a hipótese de que um baixo grau de edema durante o estro poderia influenciar na função do CL durante o diestro. Após o estudo, foi concluído que o baixo desenvolvimento do edema endometrial durante o estro pode ser associado a uma menor produção de P4 no D14.

Hollinshead et al. (2022), por sua vez, avaliaram apenas parâmetros do diestro e, para isso, coletaram os dados de concentração de P4 no período inicial do diestro (D5) para correlacionar com as taxas de gestação subsequentes (D14), hipotetizando que não haveria diferença entre éguas gestantes e não gestantes. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, houve correlação positiva entre a concentração de P4 no D5 e o diagnóstico de gestação.

Adicionalmente, em estudos realizados por Okada et al. (2020 e 2022) foram avaliados dois grupos de éguas inseminadas artificialmente com sêmen fresco: em um grupo foi induzida a luteólise parcial, o que reduziu a concentração de P4, e no outro não foi feito tratamento e a concentração de P4 seguiu o padrão. Nos dois experimentos foi avaliada a correlação entre a concentração de P4 no diestro inicial com outras variáveis. Como resultados, Okada et al. (2020) observaram uma fixação tardia dos conceitos, embriões menores, mais leves e com sinais de subdesenvolvimento nas éguas do grupo tratamento. Já no segundo estudo, a baixa concentração de P4 no diestro inicial foi associada a um subdesenvolvimento endometrial e da cinta coriônica na fase inicial da placentação (OKADA et al., 2022)

Embora a duração e intensidade do edema endometrial durante o estro, como observado nos estudos prévios, tenha se mostrado relevante para as taxas de gestação em éguas (MATÉU-SANCHEZ et al., 2016; CUERVO-ARANGO et al., 2018; SILVA et al., 2019 e 2021), ainda não há informações publicadas acerca da sua correlação com os demais parâmetros avaliados durante o ciclo das éguas.

REFERÊNCIAS

- AURICH, Christine. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 220–228, 2011.
- BERGFELT, D.R. Estrous synchronization. In: Samper, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia: Saunders Company, p. 165-177, 2000.
- BERGFELT, D. R. Anatomy and physiology of the mare. In: SAMPER, J. C. 2ed. **Equine breeding management and artificial insemination**, Missouri: Saunders Elsevier, p. 113-131, 2009.
- CASTRO, T. et al. Concentrations of progesterone and a PGF2 α metabolite during the interovulatory interval compares to the corresponding days of pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 165, p. 10-17, 2021.
- COLOMBO, I. et al. Luteal Tissue Area and Immunoreactive Concentration of Progesterone in Plasma of Bred and Non-bred Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104075, 2022.
- CROWELL-DAVIS, S.L, Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, v. 52, p. 12-17, 2007.
- CUERVO-ARANGO, J. et al. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Vet J.** v.50(3), p.386-90, 2018.
- CUERVO-ARANGO, J. et al. The effect of the interval from PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. **Theriogenology**, v.83(8), p.1272–1278, 2015.
- DAELS, P.F.; HUGHES, J.P. The normal estrous cycle. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. **Equine Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993, p. 121-132.
- DONADEU, F.X.; WATSON, E.D. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**. 100, 225–242, 2007.
- GEBHARDT, S. Exploration of Global Gene Expression Changes During the Estrous Cycle in Equine Endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, p. 1-13, 2012.
- 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.; PIERSON, R.A. Regular and Irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 1, 1989
- GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992, 642p.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p. 31-44, 2004.

HOLLINSHEAD, F.K. et al. The Correlation of endogenous progesterone concentration in diestrus on early pregnancy rate in thoroughbred mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104127, 2022.

IRVINE, C.H.G., 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.

ISHAK, G.M. et al. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 1-12, 2017.

MATEU-SÁNCHEZ et al. The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. **Theriogenology**, v.86, p.1506-15, 2016.

NAGY, P.; GUILLLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, 60-61, p.245-62, 2000.

OKADA, C.T.C. et al. Low plasma progestin concentration during early postovulatory phase impairs equine conceptus development in the late preimplantation phase. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, p. 1156-1167, 2020.

OKADA, C.T.C. et al. Low plasma progesterone concentration during the early luteal phase delays endometrial development and the beginning of placentation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p. 107149, 2022.

RESENDE, H. R. A. et al., Avaliação morfológica da glândula pineal de éguas em atividade reprodutiva e em anestro fisiológico. *Pubvet*, v. 16, n. 9, p. 1-9, 2022.

SANTOS, V.G. et al. Long-term characteristics of idiopathic persistent corpus luteum in the mare. **Theriogenology**, v.84, p.242-251, 2015

SATUÉ, K.; GARDÓN, J.C. A review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. **Journal of Steroids and Hormonal Science**, v.4, n.2, 2013.

SHARP, D. C. Environmental influences on reproduction in horses. **Veterinary Clinical of North America**, v. 2, p. 207-23, 1980.

SILVA, E.S.M. et al. Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrous mares. **Theriogenology**, v. 131, p. 96-105, 2019.

SILVA, E.S.M. et al. Artificial Long Estrus Protocols Administered Prior to Progesterone Increase Endometrial Uterocalin Expression in Anestrous

Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 103, p. 103669–103669, 6 jun. 2021.

SILVA, E.S.M. et al. Effect of duration of estradiol exposure on embryo survival and endometrial gene expression in anestrous embryo recipient mares. **Theriogenology**, v. 226, p. 1-9, 2024.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2º Ed. Blackwell Publishing, vol.2, cap.170, pg. 1637-1641, 2011.

CAPÍTULO II

(Redigido de acordo com as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*)

Relationship between the duration of endometrial edema and reproductive parameters of estrus, diestrus, and fertility in mares

Isabela de S. Vaz¹, Michelle B. Silva¹, Arthur P. Maran¹, Maria Eduarda R. de Almeida¹, Ednaldo C. Guimarães², Juan Cuervo-Arango³, Elisa S. M. Silva^{1,*}

¹ School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil | ² School of Mathematics, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

* Corresponding author at: Animal Reproduction Laboratory, Bloco 2D, Sala 1 - Rua Ceará s/n, Bairro Umuarama, Uberlândia - MG - CEP 38405-302, Brazil. E-mail address: elisasmsilva@ufu.br

Abstract:

This study aimed to evaluate whether there is a relationship between the duration of endometrial edema (DEdema) - which has been positively correlated with uterine receptivity and likelihood of pregnancy - and other key parameters of the estrous cycle: maximum edema (MEdema), largest follicle diameter (LPF), corpus luteum and uterine tone on day 5 post ovulation (CLD5 and TD5), progesterone concentration (P4) and fertility. A total of 88 cycles from 36 mares were evaluated and divided into Short Estrus (SE), Long Estrus (LE), Inseminated (AI), and Non-Inseminated (N-AI) groups, also AI group was divided in pregnant (P) and non-pregnant (N) mares. From the detection of a dominant follicle and uterine edema ≥ 1.5 , mares were monitored daily until ovulation (D0). During this period, data on dominant follicle diameter and endometrial edema were recorded. On D5, CL size and uterine tone were assessed and blood was collected for P4 measurement. Of all cycles, 30.7% (27/88) were SE and 69.3% (61/88) LE. Correlations were observed between DEdema and the variables: LPF ($p = 0.001$; $r = 0.32$), MEdema ($p = 0.002$; $r = 0.31$), and TD5 ($p = 0.01$; $r = 0.28$). Furthermore, DEdema was associated with a higher probability of a positive pregnancy outcome (OR= 1.45; $p = 0.049$) and pregnancy rates were higher ($p = 0.006$) in LE group (67.5%) than SE (16.6%). In conclusion, the duration of endometrial edema influences key estrous cycle parameters, as well as fertility.

Keywords: Uterine edema, Progesterone, Corpus Luteum.

1. Introduction

In equine breeding programs, transrectal palpation and ultrasonography are essential tools for evaluating important reproductive parameters of the mare's estrous cycle. The main parameters assessed during estrus are endometrial edema and ovarian follicle diameter; and in diestrus, the CL characteristics - such as size, morphology, and echogenicity - as well as the uterine tone (Aurich, 2011; Ginther, 1992).

Previous studies have associated estrous characteristics with diestrus variables and fertility in mares. Cuervo-Arango et al. (2018) positively correlated estrus duration, accompanied by uterine edema, with subsequent pregnancy rates. Another study concluded that larger pre-ovulatory follicles produce larger and more vascularized CLs, leading to higher concentrations of P4 during diestrus (Ishak et al. 2017), while Colombo et al. (2022) found only a weak correlation between pre-ovulatory follicle size and P4 production, CL area, and pre-ovulatory edema. Furthermore, plasma P4 concentration in the post-ovulatory period was reported to have a positive correlation with pregnancy rates in mares (Hollinshead et al. 2022).

Although many associations have been previously observed, there are no reports investigating the relationship between estrus duration, represented by the duration of endometrial edema, and reproductive parameters found in estrus and diestrus. Therefore, to aid the veterinary practitioner to identify parameters in estrus that can be predictors of fertility, the main objective of this study was to evaluate whether there is a relationship between the duration of endometrial edema and reproductive parameters during estrus (follicular diameter and maximum edema), diestrus (CL size, uterine tone, and plasma P4 concentration), and fertility.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

The experiment was conducted in two properties located in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil (southern hemisphere; latitudes -19.13469 and -18.94776). All the selected animals were healthy and had good body condition during the experiment.

The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Uberlandia under protocol number 23117.004712/2025-52.

A total of 36 mares of the Mangalarga Marchador breed (n=17) and mixed breed (n=19), aged between 4 and 12 years and weighing between 300 and 500 kg were evaluated and, during the experiment, were kept on pasture, under a rotational grazing system on Tifton grasslands (*Cynodon dactylon*), supplemented with mineral salt and with free access to water. Data was collected during two consecutive breeding seasons and resulted in a total of 88 cycles in the study, and those showing clinical signs of endometritis - free of intrauterine fluid - were excluded from the experiment.

The Mangalarga Marchador mares belonged to the breeding herd of a private property, therefore, the study followed the procedures of artificial insemination and embryo transfer routinely performed at the property, in which all broodmares intended for breeding were evaluated. The mixed breed mares belonged to the equine experimental and teaching herd of the Federal University of Uberlandia.

All mares from both properties were evaluated by transrectal ultrasonography and palpation to detect cyclicity, and those with characteristics of the ovulatory phase were selected for the study.

2.2 Experimental Design

The 88 cycles evaluated were subdivided into the following groups: short estrus (SE; n=27; ≤ 3 days of edema score ≥ 1.5 until ovulation) and long estrus (LE; n=61; > 3 days of edema score ≥ 1.5 until ovulation); and inseminated (AI; n=49) and non-inseminated (N-AI; n=39) cycles. In addition, when considering the inseminated cycles, they were subdivided into positive (P, n=27) and negative (N; n=22) outcomes. For inseminated cycles, both breeding and embryo donor mares were included in the study.

Ovarian activity and endometrial edema were monitored through transrectal ultrasonography. Data for each cycle were recorded starting from the first day of estrus, which was defined as the first day in which endometrial edema ≥ 1.5 and a dominant follicle (≥ 23 mm) were detected. Follicular diameter and degree of endometrial edema were recorded daily until ovulation (D0; Figure 2).

Ovulation was induced in all inseminated mares and in 41% (16/39) of the non-inseminated. After detecting a pre-ovulatory follicle accompanied by endometrial

edema, GnRH analogs (250 µg of histrelin - Strelin®, Botupharma or 750 µg of deslorelin – Sincrorrelin, Ourofino) were administered to induce ovulation (Figure 2). In the AI group, 46% (23/49) were inseminated with fresh semen from two Mangalarga Marchador stallions located at the same property 24 hours after ovulation induction. Inseminations with frozen semen were performed in 53% of the cycles (26/49) using semen from 10 different Mangalarga Marchador stallions, between 36 and 44 hours after ovulation induction.

After ovulation, mares were reassessed on day 5 post-ovulation (D5) to measure the size of the corpus luteum and uterine tone, using transrectal ultrasonography and rectal palpation, respectively; along with blood collection for subsequent P4 concentration measurement. Pregnancy diagnosis in bred mares was performed on day 14, and in embryo donor mares the embryo recovery attempt was performed between days 7 and 9 after ovulation (Figure 1).

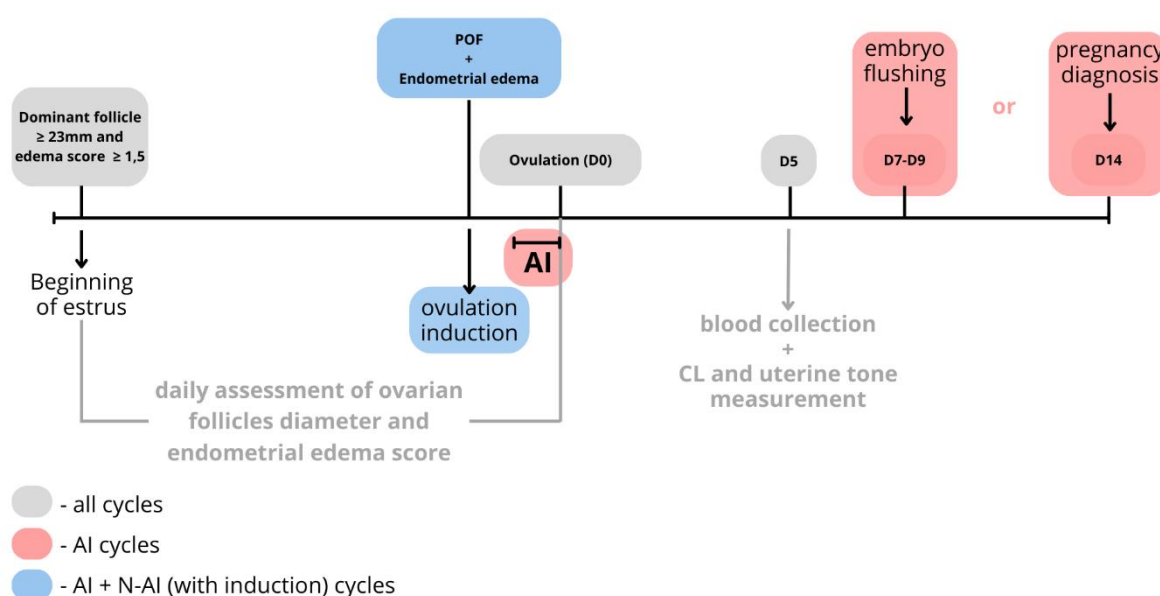


Figure 1. Representative scheme of the experimental design using different colors for each cycle category (AI cycles = inseminated cycles; N-AI cycles with induction = non inseminated cycles with induction of ovulation). D = Days in relation to ovulation (D0=day of ovulation, D5=day 5 after ovulation); POF = pre-ovulatory follicle; AI = artificial insemination;

2.3 Ultrasound and Rectal Palpation

Follicular diameter, endometrial edema, and CL size were assessed via transrectal ultrasonography using a 5 MHz frequency linear transducer, while uterine tone was evaluated through rectal palpation.

Follicular diameter and CL size were obtained by calculating the average of the width and height measurements for each structure using electronic calipers (Ishak et al., 2017; Figure 2). Endometrial edema was subjectively scored on a scale from 0 to 3 based on the intensity of the endometrial fold pattern (0 = absence of edema, 1 = minimal edema, 2 = moderate edema, 3 = maximum edema) as proposed by McCue et al. (2011).

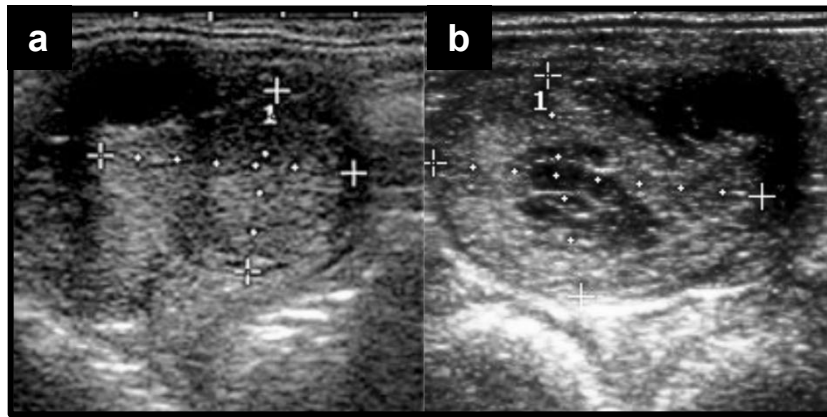


Figure 2. Representative images of the measurement of the mare's CLs (a and b) height and width using ultrasound electronic calipers.

Uterine tone was subjectively scored by two experienced veterinarians on a scale of 0 to 3 (0 = absence of tone, 1 = minimal tone, 2 = moderate tone, 3 = maximum tone), following the classification system of Hayes and Ginther (1986).

2.4 Blood collection and P4 measurement

Blood samples were collected from jugular vein after antisepsis of jugular sulcus with 70% alcohol, using Vacutainer needles for puncture and vacuum tubes containing EDTA. The animals were physically restrained in a horse restraining chute. After collection, blood was centrifuged, and the plasma was separated and stored in cryogenic tubes at -20°C for subsequent plasma P4 measurement.

P4 measurement was performed on seven samples from each group (SE, LE, P, and N; 28/88), at the BET Laboratories (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The samples selected for the SE group were from cycles with up to three days of endometrial edema, whereas the samples for the LE group were from cycles with six or more days of edema. For the P4 assay in the P and N groups, the samples were randomly selected. Concentrations were determined by radioimmunoassay using a commercial kit (RIA Progesterone, Beckman Coulter, Minnesota, EUA).

2.5 Semen and inseminations

Semen from resident stallions was collected with an artificial vagina (Botupharma, Botucatu, SP, Brazil) using a stallion phantom. After collection, the semen was immediately filtered and maintained on a heated plate at 37°C during manipulation. The concentration was assessed using a Neubauer chamber, and motility was subjectively evaluated under a microscope by a single professional. Semen was diluted in a 1:1 proportion using a milk-based extender (BotuSêmen Gold, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil). For each fresh semen insemination, 1 billion motile sperm were deposited into the uterine body, using a 60 mL syringe coupled with an insemination pipette for mares (Provar, São Paulo, SP, Brazil).

All frozen semen were from non-resident stallions with proven fertility. Inseminations were performed immediately after ovulation detection using a flexible pipette (Vitrocell, Campinas, SP, Brazil) coupled to a 10 mL syringe, which was guided via rectal palpation to the tip of the uterine horn, in which 400 to 500 million sperm were deposited per insemination.

2.6 Pregnancy Diagnosis and Embryo Recovery

Pregnancy diagnosis in breeding mares was conducted via transrectal ultrasonography to identify the embryonic vesicle. Uterine lavage for embryo recovery was performed in donor mares transcervically, using a 28-size silicone catheter (IMV Technologies, Campinas, SP, Brazil) coupled to a “Y” tubing system (Reprodux, Campinas, SP, Brazil) and an embryo collection filter (Vitrocell, Campinas, SP, Brazil), in which 2 to 4 liters of Lactated Ringer’s solution was used per procedure. An embryo

was confirmed by visualization on the filter or on a Petri dish under a stereomicroscope at 3x magnification.

2.7 Statistical Analysis

Data analysis was initially conducted descriptively to characterize the variables and present the mean and median values. The Pearson's correlation coefficient was applied for the variables - days of edema (DEdema), maximum edema (MEdema), largest pre-ovulatory follicle (LPF), CL diameter (CLD5), and uterine tone on day 5 (TD5), as well as for P4 concentration (P4) - where the results are represented by the letter "r". Correlations among the variables were classified as weak ($r \leq 0.35$), moderate ($r = 0.36-0.67$), or strong ($r = 0.68-1.00$; Taylor, 1990).

The T-test for parametric data and the Wilcoxon test for non-parametric data were used to compare estrus and diestrus variables, as well as P4 concentration, in relation to fertility (P and N groups) and estrus duration (SE and LE groups). Two-sample test for equality of proportions with continuity correction was used to evaluate pregnancy rates differences between SE and LE groups.

A Binary Logistic regression model was used to verify the effects of the variables Days of Edema, Type of Semen and ET vs Broodmare on fertility, considering both univariate and multivariate analysis. Additionally, the odds ratio test was performed to assess the strength of association between the variables and fertility. Statistical difference was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

The overall percentage of short estrous cycles (SE) was 30.7% (27/88) and of long estrous (LE) 69.3% (61/88). Inseminations were performed in 55.7% (AI group; 49/88), while in 44.3% of the cycles (39/88) no inseminations were carried out (N-AI group). In the AI group, there were 55% confirmed pregnancies, and 45% (22/49) of negative outcomes, regardless of whether the diagnosis was based on embryo recovery or pregnancy confirmation at 14 days.

Among the positive pregnancy outcomes, 48.5% (16/33) were diagnosed through embryo recovery, and 68.8% (11/16) were confirmed at 14 days in broodmares.

3.1 Overall correlations between reproductive parameters of estrus and diestrus

Considering all of the 88 cycles, regardless of group, a positive although weak correlation was observed between DEdema and LPF ($p=0.002$; $r=0.32$), DEdema and MEdema ($p=0.001$; $r=0.31$), and DEdema and TD5 ($p=0.01$; $r=0.28$; Table 1). Regarding the other parameters, a weak correlation was found between LPF and CLD5 ($p=0.002$; $r=0.33$; Table 1).

4.2 Correlations within groups

4.2.1 Groups SE and LE

Considering the SE group, a moderate correlation was observed between DEdema and MEdema ($p=0.01$; $r=0.5$; Table 1). As for the LE group, weak correlations were found between DEdema and TD5 ($p=0.04$; $r=0.27$) and LPF and CLD5 ($p=0.005$; $r=0.34$), and moderate correlation between DEdema and LPF ($p<0.001$; $r=0.47$; Table 1).

4.2.2 Groups P and N

In positive and negative groups, no significant correlation was observed between DEdema and the other parameters ($p>0.05$). A significant but moderate correlation was found only between LPF and CLD5 in groups P ($p=0.03$; $r=0.41$) and N ($p=0.04$; $r=0.43$; Table 1), along with a tendency for correlation between DEdema and TD5 ($p=0.07$; $r=0.34$ P group and $r=0.38$ N group).

4.2.3 Groups AI and N-AI

Within the inseminated group ($n=49$), a moderate correlation was observed between LPF and CLD5 ($p=0.004$; $r=0.4$), as well as between DEdema and TD5 ($p=0.002$; $r=0.41$; Table 1).

In the non-inseminated group ($n=39$), a weak correlation was detected between LPF and CLD5 ($p=0.04$; $r=0.31$), and moderate correlations were observed between DEdema and LPF ($p=0.001$; $r=0.48$) and DEdema and MEdema ($p=0.012$; $r=0.39$;

Table 1). Additionally, there was a tendency for correlation between DEdema and CLD5 ($p=0.06$; $r=0.29$).

4.3 Correlations between reproductive parameters and P4 concentration

No significant correlations were observed between P4 concentrations and other variables within groups P, N and LE. However, in SE group, a strong correlation was found between LPF and P4 ($p=0.05$). When combining SE and LE groups ($n=14$), the same correlation, but moderate, was observed ($p=0.008$; Table 1).

Table 1. Correlation coefficients between estrus and diestrus parameters of the following groups: short estrus (SE, $n=27$), long estrus (LE, $n=61$), inseminated (AI, $n=49$), non-inseminated (N-AI, $n=39$), pregnant (P, $n=27$) and non-pregnant (N, $n=22$). And the correlation coefficients between estrus and diestrus parameters and P4 concentration in short estrus group (SE, $n=7$) and combined long estrus and short estrus group (LE+SE, $n=14$).

	LPF	DEdema	MEdema	CLD5	TD5	P4
LPF	-	-	-	-	-	-
DEdema	0.32 ** (overall) 0.47 *** (LE) 0.48 *** (N-AI)	-	-	-	-	-
MEdema	ns	0.31 *** (overall) 0.50 * (SE) 0.39 * (N-AI)	-	-	-	-
CLD5	0.33 ** (overall) 0.41 * (P) 0.43 * (N) 0.34 ** (LE) 0.40 ** (AI)	ns	ns	-	-	-
TD5	ns	0.28 ** (overall) 0.27 * (LE)	ns	ns	-	-
P4	0.74 * (SE) 0.67 * (SE + LE)	ns	ns	ns	ns	-

* $p \leq .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$;

ns - not significant; LPF - Largest Pre-ovulatory Follicle; DEdema - Days of endometrial edema; MEdema - Maximum Edema Score; CLD5 - CL size on day 5; TD5 - uterine tone on day 5; P4 - P4 concentration on day 5; SE - Short Estrus; LE - Long Estrus; AI - Inseminated; N-AI - Non-inseminated; P - Pregnant; N - Non-pregnant

4.4 Comparisons between groups

Regarding SE and LE groups, greater uterine edema score was observed in the LE (median: 3.0, IQR: 2.5-3.0) group compared to the SE (median: 2.5, IQR: 2.5-3.0; $p = 0.0005$; Figure 3A). Additionally, a tendency to higher TD5 was observed in the LE group (median: 2, IQR:1.5-2.0) when compared to SE (median: 1.5, IQR:1.0-2.0; $p =$

0.089; Figure 3B). Pregnancy rates were higher in the LE group (67.5%) when compared to SE (16.6%; $p=0.006$, Figure 3C). As for P4 concentration, there was no difference between SE and LE groups ($p=0.19$).

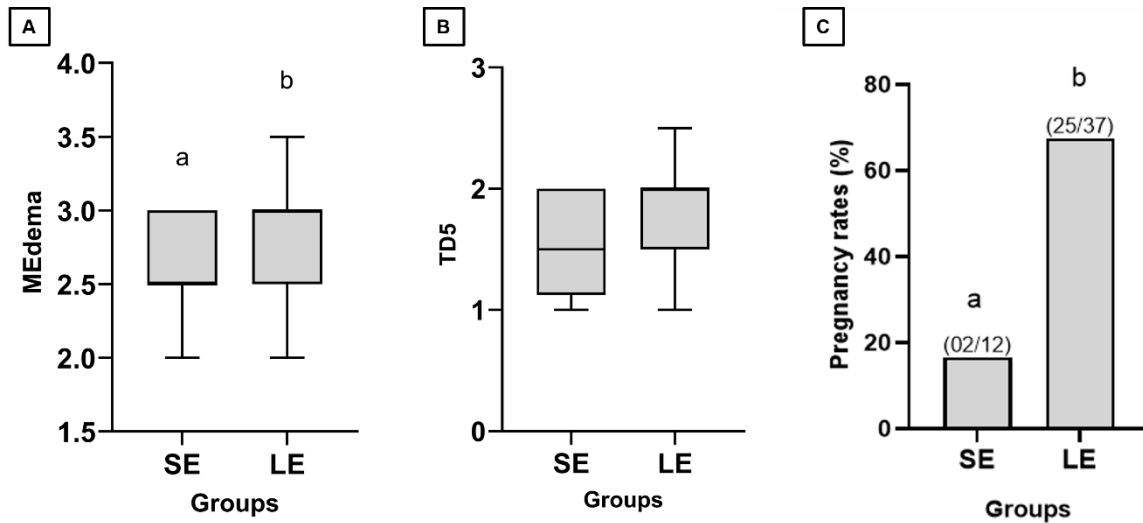


Figure 3. Median values with lower and upper quartiles of maximum edema (MEdema; A; $p < 0.001$), uterine tone on D5 (TD5; B; $p = 0.089$) and pregnancy rates (C; $p < 0.01$) between short estrus and long estrus groups (SE and LE). Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$)

Considering fertility, mean DEdema was greater in group P (5.55 ± 1.40 days) compared to group N (4.31 ± 2.03 days; $p = 0.015$; Figure 4A), and there was a tendency toward higher TD5 in the P group (median: 1.5, IQR: 1.5-2.0) than in the N group (median: 1.5, IQR: 1.0-2.0; $p = 0.08$; Figure 4B).

Additionally, the multivariate analysis using Binary Logistic Model showed that there was an effect of the type of semen (fresh x frozen) on fertility ($p=0.018$), as well as of DEdema, being higher in the P group ($p = 0.049$). In the odds ratio analysis, the use of fresh semen and an increase in DEdema was associated with a higher probability of a positive pregnancy outcome (OR type of semen = 5.5; $p= 0.018$; OR DEdema = 1.45; $p= 0.049$).

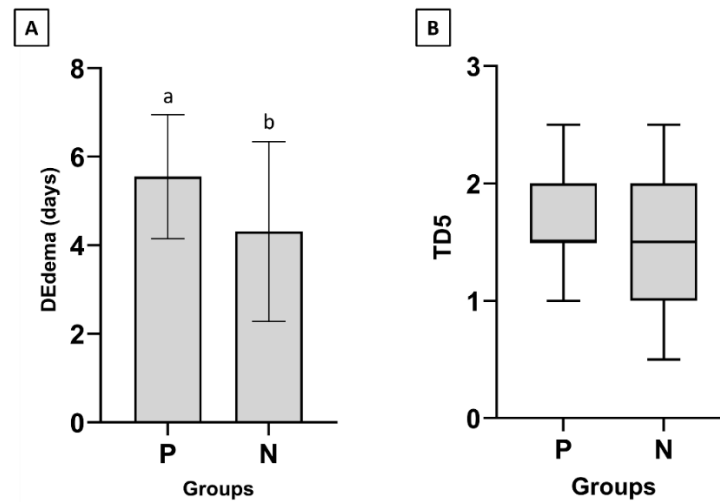


Figure 4. (A) Mean values ($\pm$ SD) of Days of Endometrial Edema (DEdema) in groups Pregnant (P) and Non-pregnant (N); and day 5 uterine tone (TD5) median values, with lower and upper quartiles between Pregnant (P) and Non-pregnant (N; $p=0.08$) groups. Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$).

No significant difference in P4 concentration was found between groups P and N ($p>0.05$). However, when comparing inseminated (AI, $n = 14$) and non-inseminated cycles (N-AI, $n = 14$), a tendency was observed toward higher P4 in AI group (10.5 ± 3.76 ng/mL) compared to the N-AI group (7.8 ± 3.26 ng/mL; $p = 0.058$; Figure 5).

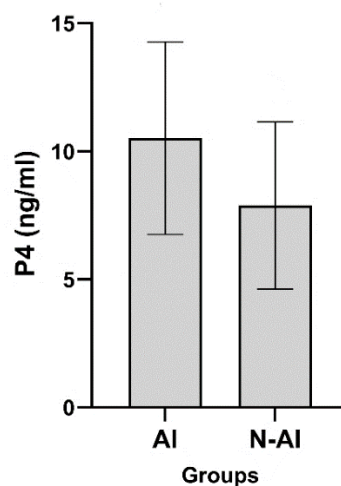


Figure 5. Mean values ($\pm$ SD) of progesterone concentration (P4) between inseminated (AI) and non-inseminated (N-AI) groups ($p=0.058$).

4. Discussion

The hypothesis that the duration of endometrial edema is associated with important parameters observed in estrus and diestrus, as well as fertility, was supported in this study by the observed correlations of **Days of Endometrial Edema (DEdema) with Largest Pre-ovulatory Follicle (LPF), Maximum Edema (MEdema) and Uterine Tone on Day 5 (TD5)**, as well as by the higher duration of edema in the Pregnant group compared to the Non-pregnant group. Moreover, increased pregnancy rates were observed in the Long Estrus group when compared to the Short Estrus group.

The associations between **DEdema and LPF, MEdema, and TD5 parameters** were reported for the first time in this study. The weak to moderate correlations between DEdema and LPF, as well as DEdema and MEdema, might be due to the fact that the more the pre-ovulatory follicle grows, there is potentially more days of estradiol production, reflecting on increased edema score and days of endometrial edema. Although there were correlations between **DEdema and TD5**, observed both in the overall analysis and within **LE group**, they were mostly weak, which suggests that other variables could interfere with the findings. However, earlier studies have suggested that the **intensity and persistence of the estrogenic phase may modulate the uterine response to P4 during diestrus**, leading to **increased uterine tone** (Hayes and Ginther, 1986). In addition, uterine tone is commonly used to select mares as embryo recipient, therefore, if increased DEdema could increase TD5, it could be a suitable selection criteria as well.

Additional associations were also observed. The **positive - weak to moderate - correlations between LPF and CLD5** was consistent across all evaluated groups, except in the **SE group**. This finding agrees with previous studies by **Ishak et al. (2017)** and **Colombo et al. (2022)**, that also reported a relationship between **pre-ovulatory follicular size and subsequent CL size**. Interestingly, a previous study tested the hypothesis that the administration of oral letrozole, an aromatase inhibitor, during the pre-ovulatory period would result in larger follicles, larger CLs, and higher P4 concentrations, as observed in cattle (Akbarinejad et al., 2017). However, the authors concluded that, in mares, letrozole resulted in smaller pre-ovulatory follicles, premature ovulation, and reduced CL size and P4 concentrations. These findings suggest that smaller pre-ovulatory follicles, as well as smaller and less functional CLs,

negatively impact uterine quality and fertility, corroborating with the present study's findings of correlations between LPF and CLD5.

In addition, the diameter of the preovulatory follicle has been correlated with the diameter of three different subgroups of CL (solid CL, CL with a small central cavity < 25 mm and CL with a large central cavity; Cuervo-Arango et al., 2012). A positive correlation was found in all groups, however, the CL with a large cavity group was the only one with a strong correlation. According to the authors, it seems that a larger pre-ovulatory follicle has more room to be filled by hemorrhage and produces a larger blood clot (cavity). In the present study the CLs morphology and cavity size were not considered, so we were unable to make such correlations with respect to the CL characteristics.

Although we did not detect a correlation between CLD5 and P4 concentrations, **a positive strong correlation was observed between LPF and P4 only in the SE group (n=7) and a moderate correlation in the combined SE and LE group analysis (n=14).** An **increased P4 secretion was observed in mares with larger pre-ovulatory follicles during the spring and fall in a previous study** (Ishak et al. 2017), suggesting a **relationship between dominant follicular development and luteal function**. Moreover, Colombo et al., 2022 found a moderate to low association between the follicle size and progesterone concentration post-ovulation. Herein, the correlation between LPF and P4 variables were only detected in the SE and combined LE and SE groups, not in P, N and LE groups. Therefore, we believe that the reduced P4 sample size per group (n=7) could have affected the results.

The comparative tests revealed that LE group exhibited significantly higher MEdema compared to the SE group. These findings suggest that in longer estrus, endometrial edema tends to develop to higher levels. Additionally, there was a trend toward greater TD5 in LE group when compared to SE, which is in line to the positive correlations observed between DEdema and TD5. As previously discussed, it seems that prolonged exposure of the uterus to estrogen may improve the uterine response to progesterone during the subsequent diestrus.

More importantly, greater pregnancy rates were detected in the LE group (67.5%) than in SE group (16.6%), which was corroborated by greater DEdema in the P group (mean 5.5 days) when compared to the N group (mean 4.3 days), emphasizing the importance of estradiol exposure during estrus. Mateu-Sanchez et al. (2016) observed that estrus durations shorter than 4 days (similar to the threshold identified in the

present study) were associated with lower pregnancy rates in inseminated mares, which is consistent with our results. Other authors have also highlighted the importance of estrus duration on fertility, including its positive correlation with pregnancy rates in cyclic recipient mares (Cuervo-Arango et al., 2018) and on the expression of uterocalin in anestrus mares, a glycoprotein involved in early embryo nutrition (Silva et al. 2019; 2021).

Finally, when comparing AI and N-AI groups, a trend toward higher P4 concentrations was observed in the inseminated group. The primary differences between these groups, aside from insemination, was ovulation induction in 100% of mares in the AI group versus only 41% in the N-AI. However, previous research has shown that ovulation induction with hCG or GnRH analogs does not influence CL size, vascularization, or P4 concentrations (Segabinazzi et al., 2021). Colombo et al. (2022) also found no effect of artificial insemination on P4 production. Therefore, the difference observed in this study between AI and N-AI groups may involve mechanisms not yet fully elucidated, and further studies with a higher number of cycles may be necessary to confirm these findings.

It is known that the success of pregnancy diagnosis and embryo recovery is influenced by several factors, such as semen type and quality, and uterine health. This study was conducted in privately owned mares already enrolled in a breeding program, which was a limitation due to the inability to standardize the type of semen, source or insemination method. Another drawback was the reduced sample size used for P4 quantification, due to cost limitations. Additionally, the small number of cycles in the SE group limited broader comparisons, as short estrus cycles (<4 days) were relatively infrequent, even with ovulation induction. Nevertheless, this study emphasizes the importance of a comprehensive assessment of the estrous cycle in mares, particularly with regards to the duration and intensity of the estrogenic phase, as predictors of diestrous functionality and pregnancy likelihood.

In conclusion, the edema duration was associated with follicular size, maximum edema score, and uterine tone on D5. Longer estrus cycles were associated with higher fertility in donors and broodmares. Future studies with larger sample sizes and better control of external variables may be needed to strengthen and expand upon these observations.

References

- Akbarinejad, V., Gharagozlou, F., Mansourizadeh, A. (2017). The effects of preovulatory administration of oral letrozole on ovulatory follicle and the subsequent corpus luteum in mares. *Comparative Clinical Pathology*, 26, 359-362. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2381-3>
- Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, 124, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005>
- Colombo, I., Podico, G., Rudolf-Vegas, A., Bauersachs, S., Canisso, I. F. (2022). Luteal Tissue Area and Immunoreactive Concentration of Progesterone in Plasma of Bred and Non-bred Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 118, 104075. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104075>
- Cuervo-Arango, J., Newcombe, J. R. (2012). Ultrasound Confirmation of Ovulation in Mares: A Normal Corpus Luteum or a Haemorrhagic Anovulatory Follicle? *Reproduction in Domestic Animals*, 48: 105-111. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02039.x>
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., Ruijter-Villani, M., Stout, T. A. (2018). Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. *Equine Veterinary Journal*, 50 (3), 386-390. <https://doi.org/10.1111/evj.12739>
- Ginther, O.J. (1992). *Reproductive biology of the mare: Basic and Applied Aspects*, 2nd ed. Equiservices Publishing.
- Hayes, K.E.N., Ginther, O.J. (1986). Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90142-1)
- Hollinshead, F.K., Mehegan, M.K., Gunn, A., Nett, T., Bruemmer, J.E., Hanlon, D.W. (2022). The Correlation of Endogenous Progesterone Concentration in Diestrus on Early Pregnancy Rate in Thoroughbred Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 118, 104127. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104127>
- Ishak, G.M., Bashir, S.T., Gastal, M.O., Gastal, E.L. (2017). Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, 187, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.09.003>
- Mateu-Sánchez, S., Newcombe, J.R., Garcés-Narro, C., Cuervo-Arango, J. (2016). The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. *Theriogenology*, 86, 1506-1515. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.009>
- McCue, P.M., Scoggin, C.F., Lindholm, A.R.G. (2011). Estrus. In: McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D. *Equine Reproduction* 2nd Ed, p. 1724, Wiley-Blackwell.

Segabinazzi, L.G.T.M., Oba, E., Alvarenga, M.A. (2021). The Combination of hCG and GnRH Analog to Hasten Ovulation in Mares Does not Change Luteal Function and Pregnancy Outcome in Embryo Recipient Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 105, 103691. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103691>

Silva, E.S.M., Cuervo-Arango, J., Ruijter-Villani, M., Klose, K., Oquendo, P.S., Stout, T.A.E. (2019). Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrus mares. *Theriogenology*, 131, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.025>

Silva, E.S.M., Vaz, I.S., Rodrigues, T.S., Brandão, F.Z., Oquendo, P.S., Oquendo, F.M.G., Beletti, M.E., Cuervo-Arango, J. (2021). Artificial Long Estrus Protocols Administered Prior to Progesterone Increase Endometrial Uterocalin Expression in Anestrus Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 103, 103669. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103669>

Taylor, R. (1990). Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 6 (1), 35-39. <https://doi.org/10.1177/875647939000600106>