

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
FMVZ – UNESP BOTUCATU**

**EFEITO DA HCG OU DESLORELINA SOBRE A
HEMODINÂMICA FOLICULAR E PERFIL ENDÓGENO DE LH
EM ÉGUAS CÍCLICAS**

YATTA LINHARES BOAKARI

BOTUCATU – SP

Outubro 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
FMVZ – UNESP BOTUCATU**

**EFEITO DA HCG OU DESLORELINA SOBRE A
HEMODINÂMICA FOLICULAR E PERFIL ENDÓGENO DE LH
EM ÉGUAS CÍCLICAS**

YATTA LINHARES BOAKARI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira

BOTUCATU- SP

2014

Nome do Autor: Yatta Linhares Boakari

Título: EFEITO DA HCG OU DESLORELINA SOBRE A HEMODINÂMICA FOLICULAR E PERFIL ENDÓGENO DE LH EM ÉGUAS CÍCLICAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof^ª. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP -Botucatu

Prof^ª. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Obstetrícia

Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO

Unidade Ourinhos-SP

Data da Defesa: 07 de Novembro de 2014.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Cezinande de Meira, por ter confiado no meu potencial e me aceito como orientada, por toda a ajuda e ensinamento desde então.

Ao Jair pela ajuda com a elaboração do projeto de pesquisa para meu ingresso no Mestrado, durante o experimento, todo o tempo que disponibilizou tirando minhas dúvidas e também companheirismo durante o trabalho no Posto de Monta.

À Heloisa que foi essencial para a realização deste projeto, me ajudando durante o experimento, se envolvendo com todas as etapas do projeto com uma dedicação admirável. Também pelas longas conversas que tanto amenizavam a distância de casa.

À minha banca Prof. Meira, Profa. Fabiana e Profa. Fernanda por aceitarem participar deste momento de aprendizado tão importante para mim e por todos os comentários que irão melhorar minha dissertação.

À toda a equipe Meira com os quais tanto aprendi sobre reprodução de éguas, primeiro como estagiária no Posto de Monta e depois como amigos: Elisa, Fernanda, Heloisa, Jair, Luiz Fernando, Rafael, Rúbia e Samuel.

Ao Prof. Pantoja que tanto me ajudou com a análise estatística.

Aos professores e pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, com os quais aprendi muito sobre reprodução.

À minha mãe, Salete, pelo amor incondicional e a eterna disposição para me ajudar. Ao meu pai, Francis, me incentivando a ser o melhor que posso ser ao mesmo tempo em que me dar todo o seu amor. Minha irmã e melhor amiga Biá por andar sempre ao meu lado e cuidar de mim desde criança.

Ao meu noivo, Leandro, pelo apoio, paciência e amor desde o início, e mais ainda durante as longas e cansativas horas de palpações e coletas de sangue durante o mestrado.

A todos meus familiares, no nome da minha Avó Margarida, Tia Gardênia, Tia Quitéria, meu tio patrão Albani, Sonalba e toda minha família africana.

À minha eterna orientadora, professora, amiga e mãe Dra. Mônica Arrivabene pela convivência de 16 anos que me faz amá-la e admirá-la cada dia mais.

Aos meus amigos da vida inteira por me acompanharem tão fielmente: Raphael, Victor, Alicia, Mariel, Marina, Isabela e Bruno Ítalo.

A todos os meus amigos do curso de Medicina Veterinária com os quais posso dividir as felicidades e dificuldades de ser veterinária: Dayse, Verbena, Aíla, Denise, Carol e Fábio.

A todos os estagiários que ajudaram nos nossos projetos com vontade e determinação apesar das longas e cansativas horas.

Aos funcionários do Posto de Monta que nos ajudam e tratam nossas éguas com tanto cuidado.

Às nossas éguas, que com sua paciência e docilidade faziam o trabalho ser tão prazeroso.

À FAPESP, pela bolsa de mestrado (processo número 2012/11117-3), auxílio para esta pesquisa (processo número 2012/12288-6) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (processo número 2013/19772-3).

A todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste grande sonho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1.** Concentração plasmática de LH (A) e perfusão vascular folicular (PVF) (B) em vacas tratadas com deslorelina durante o estro. Siddiqui et al. (2010). **14**

Capítulo 3

- Figura 1** Diagrama representativo dos momentos de coleta de dados nos Grupos hCG, GnRH (A) e controle (B). H0 indica o momento imediatamente antes da realização do tratamento. OV indica o momento da detecção da ovulação. **35**

- Figura 2** Imagem ultrassonográfica Doppler função power-flow de folículo pré-ovulatório de égua. Avaliação subjetiva da perfusão vascular folicular foi realizada levando em consideração o percentual (notas entre 0 e 100%) de extensão de parede folicular com pontos coloridos Doppler. **36**

- Figura 3** Média±E.P.M para perfusão vascular da parede folicular (%) de éguas tratadas com 1,5 mg de deslorelina, 2.5000 UI hCG ou 2 mL NaCL 0,9% na presença de folículo ≥ 35 mm associado a edema uterino. Efeito de grupo (G) é mostrado; grupos com letras minúsculas diferentes são diferentes. H0=momento imediatamente anterior ao tratamento. Seta indica momento do tratamento. Seta indica momento do tratamento. OV=momento em que ocorreu a ovulação. **38**

- Figura 4** Média±E.P.M para concentração plasmáticas de LH (ng/mL) de éguas tratadas com 1,5 mg de deslorelina, 2.5000 UI hCG ou 2 mL NaCL 0,9% na presença de folículo ≥ 35 mm associado a edema uterino. * indica diferença entre horas dentro do grupo GnRH, # indica diferença entre o grupo GnRH e hCG para cada hora, ° indica diferença entre grupo GnRH e controle para cada momento. H0=momento imediatamente anterior ao tratamento. Seta indica momento do tratamento. OV=momento em que ocorreu a ovulação. **39**

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
Capítulo 1.....	1
1.INTRODUÇÃO	2
2.REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1AÇÃO DO LH NA ÉGUA	4
2.2INDUÇÃO DE OVULAÇÃO EM ÉGUAS.....	5
2.2.3GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)	6
2.2.4DESLORELINA	7
2.3AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO TRATO REPRODUTIVO.....	8
2.4ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER	9
2.5AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO VASCULAR FOLICULAR.....	10
2.5.1VASCULARIZAÇÃO DE FOLÍCULOS DOMINANTES E SUBORDINADOS.....	11
2.5.2VASCULARIZAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-OVULATÓRIOS.....	12
2.6OUTROS FATORES	15
2.8REFERÊNCIAS.....	17
Capítulo 2.....	27
1.OBJETIVOS.....	28
1.1Objetivo geral.....	28
1.2Objetivos específicos.....	28
Capítulo 3.....	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
Animais.....	34
Grupos Experimentais.....	34
Exame Ultrassonográfico Doppler	35
Concentração plasmática de LH.....	36
Análise estatística.....	37
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	39

CONCLUSÃO	42
AGRADECIMENTOS	42
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS Normas editoriais para publicação na Journal of Equine Veterinary Sciences.....	49

BOAKARI, Y. L. Efeito da hCG ou deslorelina sobre a hemodinâmica folicular e perfil endógeno de LH em éguas cíclicas. Botucatu, 2014. 75p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A indução da ovulação após o tratamento com hCG e análogos de GnRH, como a deslorelina, ocorrem por mecanismos distintos. Por sua vez, é possível que estes tratamentos acarretem alterações na perfusão vascular folicular durante o período pré-ovulatório. Desta forma, a ultrassonografia colorida Doppler apresenta potencial para ser utilizada como ferramenta na avaliação em tempo real do potencial ovulatório de folículos em éguas. Os objetivos principais deste trabalho foram avaliar as alterações na perfusão vascular folicular (PVF) após o uso de hormônios indutores da ovulação e sua relação temporal com o perfil plasmático de LH. Além de avaliar se a PVF pode ser utilizada para indicar a proximidade da ovulação. Ciclos estrais de éguas foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais: grupo GnRH, grupo hCG e grupo controle (n=10 éguas/grupo). Tratamentos foram realizados na presença de folículo com diâmetro ≥ 35 mm associado à edema uterino. O momento imediatamente antes do tratamento foi considerado H0. Colheita de sangue e exame ultrassonográfico Doppler função *power-flow* do folículo dominante foram realizados para avaliar, respectivamente, a concentração plasmática de LH e a perfusão vascular folicular (PVF). Os parâmetros foram avaliados de hora em hora entre os intervalos H0-H12 e a cada seis horas da H12 até H30. Adicionalmente, os grupos GnRH e hCG foram acompanhados a cada hora a partir da H30 até a detecção da ovulação ou até H48. Já no grupo controle, foi realizada ultrassonografia modo-B a cada seis horas após H30 e ao se detectar características indicativas da proximidade de ovulação a US Doppler foi realizada de hora em hora até detecção da ovulação. O grupo controle apresentou um intervalo mais longo até à ovulação ($P < 0,0001$). Efeito de grupo ($P < 0,05$) foi detectado para PVF. Animais do grupo GnRH apresentaram maior PVF ($P < 0,05$) média quando comparado aos grupos hCG e controle desde H0 até o momento da ovulação. Não foi encontrado efeito de momento e interação grupo:momento entre os grupos experimentais. A concentração média de LH entre H1 e H18 foi maior ($P < 0,05$) no grupo GnRH do que nos grupos hCG e controle. Nos grupos controle e hCG, a

concentração plasmática de LH foi constante durante as primeiras 12 horas pós-tratamento. Nos grupos GnRH e hCG, a concentração de LH foi mais alta ($P < 0,001$) durante a eminência da ovulação (entre H-6 e H-1). As correlações entre a PVF e as concentrações plasmáticas de LH foram baixas nos grupos GnRH, hCG e controle.

Palavras-chave: folículo pré-ovulatório, *power-flow*, ultrassonografia Doppler, vascularização.

BOAKARI, Y. L. Effect of hCG and deslorelin on follicular hemodynamics and endogenous profile of LH in cyclic mares. Botucatu, 2014. 75p. Dissertation (Masters) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Ovulation induction after treatment with hCG and GnRH analogs, such as deslorelin, occur through distinct mechanism. Meanwhile, it is possible that these treatments entail changes in follicular vascular perfusion during the pre-ovulatory period. Thus, color Doppler ultrasound presents a potential to be used as a tool for real-time assessment of follicles ovulatory potential in mares. The main purposes of this paper were to evaluate follicular vascular perfusion (FVP) after the use of ovulation induction hormones and the relationship with the plasmatic profile of LH. Additionally, evaluate if FVP can be used to indicate proximity to ovulation. Estrous cycles of mares were randomly divided in three experimental groups: GnRH group, hCG group and control group (n=10 mares/group). Treatments were done in the presence of a follicle with ≥ 35 mm diameter associated with uterine edema. The moment immediately before treatment was considered H0. Blood collection and Doppler ultrasound exam with power-flow mode of the dominant follicle were done to evaluate, respectively, plasmatic concentration of LH and FVP. Parameters were evaluated every hour between H0-H12 and every six hours from H12 until H30. Additionally, GnRH and hCG groups were evaluated every hour from H30 until ovulation detection or until H48. In the control group, B-mode ultrasonography was completed every six hours after H30 and when detection of characteristics indicative of imminent ovulation Doppler ultrasonography was done every hour until ovulation detection. Control group presented a longer interval until ovulation ($P < 0,0001$). Group effect ($P < 0,05$) was detected for FVP. Animals from the GnRH group presented higher mean FVP ($P < 0,05$) when compared to the hCG and control groups since H0 until the moment of ovulation. No moment effect and interaction group:moment was found between experimental groups. Mean LH concentration between H1 and H18 was higher ($P < 0,05$) in the GnRH group than in the hCG and control groups. In the control and hCG, LH plasmatic concentration was constant during the first 12 hours post-treatment. In the GnRH and hCG groups, LH concentration was higher ($P < 0,001$) during ovulation eminence (between H-6 and H-

1). Correlations between FVP and plasmatic LH concentrations were low in the GnRH, hCG and control groups.

Key words: pre-ovulatory follicle, power-flow, Doppler ultrasonography, vascularization.

Capítulo 1

1.INTRODUÇÃO

A equideocultura nacional vem apresentando um crescimento significativo nas últimas décadas. O Brasil possui o terceiro maior rebanho mundial de equinos. Somados aos muares (mulas) e asininos (asnos) são oito milhões de cabeças, responsáveis pela movimentação de R\$7,3 bilhões com a produção de equídeos (MAPA). O rebanho de equinos no Brasil é de 5.496.817 animais segundo o IBGE. De acordo com a International Embryo Transfer Society o Brasil realizou aproximadamente 22.100 lavados para coleta de embriões, com 16.800 coletas e transferências de embriões em 2012, seguido da Argentina e Itália (PERRY, 2013). Fica claro que o Brasil possui um grande rebanho de equídeos no qual biotecnologias são empregadas. Assim, faz-se necessária a incorporação de novas técnicas de reprodução assistida para o melhor aproveitamento do potencial genético dos animais e aumento da eficiência reprodutiva na espécie.

A ultrassonografia (US) colorida Doppler é uma técnica atualmente disponível que permite realizar estudos *in vivo* de forma não invasiva sobre a hemodinâmica do sistema reprodutivo. Através deste método é possível reavaliar fenômenos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução de grandes animais. A US Doppler é uma importante ferramenta para estudos sobre a teriogenologia equina. Pesquisas recentes em equinos evidenciaram alterações na vascularização folicular nas seguintes situações: após a divergência folicular, durante a proximidade da ovulação, durante o estro em ciclos que deram origem a gestações e durante o estro nos quais foram obtidos oócitos viáveis. Aparentemente estes resultados evidenciam a íntima relação existente entre o status funcional e a perfusão sanguínea do folículo. Entretanto alguns destes estudos apresentaram pequeno número de animais, intervalos longos entre avaliações e diferenças de resultados entre estudos. Desta forma, pesquisas mais minuciosas são necessárias para que a tecnologia Doppler tenha aplicabilidade à campo.

O uso de hormônios indutores da ovulação facilita o manejo reprodutivo, pois antecipa a ovulação em éguas, possibilitando a sincronização da inseminação artificial (IA) ou cobertura com o momento da ovulação. Desta forma, seu uso aplicado à reprodução possibilita uma melhor eficiência reprodutiva. Os fármacos usualmente empregados para a indução de ovulação na espécie equina são o hCG e sintéticos de GnRH, como a deslorelina. Os indutores de ovulação possuem maior eficácia quando administrados na presença de um folículo com diâmetro ≥ 35 mm associado a edema uterino. A US Doppler possui potencial para ser utilizada juntamente com estes

hormônios indutores de modo que seja possível determinar de forma mais precisa o melhor momento para a monta natural ou IA do animal.

Em éguas, a concentração circulante de hormônio luteinizante (LH) aumenta progressivamente concomitante com o desenvolvimento do folículo dominante, atingindo valores máximos 24 horas após ovulação. Adicionalmente, existe a possibilidade de ocorrer um aumento na perfusão sanguínea da parede folicular com a proximidade da ovulação. Estudo recente em vacas descreveu uma íntima relação entre as concentrações endógenos de LH e a vascularidade folicular pós-tratamento com GnRH. Entretanto, a existência desta relação ainda é desconhecida na espécie equina. Levando em consideração que a indução da ovulação com hCG e GnRH ocorre através de mecanismos distintos, é possível que as variações na vascularidade folicular pós-tratamento também variem de acordo com o fármaco a ser utilizado. Não existem estudos até o momento comparando a relação temporal entre as alterações vasculares de folículos pré-ovulatórios e o perfil sérico de LH em éguas tratadas com deslorelina, hCG ou solução salina. Logo, estudos a respeito são necessários.

A literatura atual diverge quanto à hemodinâmica folicular em éguas tratadas com hCG, deslorelina e NaCl 0,9% durante as últimas horas que antecedem a ovulação. Os primeiros relatos descrevem um aumento inicial durante as primeiras 36 horas após indução de ovulação associado com uma diminuição progressiva na perfusão sanguínea do folículo durante as quatro últimas horas pré-ovulação. Contrariamente, estudos recentes afirmam que a vascularidade folicular mantém-se constante durante este período. Visto que os eventos relacionados ao monitoramento de folículos pré-ovulatórios com US Doppler ainda não estão completamente elucidados a realização de pesquisas adicionais é imprescindível.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AÇÃO DO LH NA ÉGUA

O ciclo estral na espécie equina possui em média 21 dias de duração e pode ser dividido em duas fases: estro e diestro. O estro tem duração de sete a nove dias e é caracterizado pela predominância estrogênica, receptividade ao garanhão, presença de um ou mais folículos dominantes e edema endometrial. O diestro por sua vez tem duração aproximada de 15 dias e é caracterizado pela predominância progesterônica, ausência de receptividade ao macho e presença de no mínimo um corpo lúteo funcional (GINTHER, 1995).

Os principais hormônios envolvidos com o controle reprodutivo das fêmeas são as gonadotrofinas e os esteroides. Dentre as gonadotrofinas, destacam-se o hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Sua secreção é controlada pelo hormônio regulador de gonadotrofinas (GnRH). Os hormônios esteroides gonadais são o estradiol e progesterona (EVANS; IRVINE, 1975).

A liberação de LH é estimulada pela secreção pulsátil, caracteriza por pulsos com alta amplitude, de GnRH (HALASZ et al., 1989). O lobo anterior da hipófise secreta o hormônio luteinizante (LH), uma glicoproteína composta de uma subunidade alfa e uma beta com peso molecular de 30.000 dáltons (HALASZ et al., 1989). A subunidade α possui uma sequência de aminoácidos idênticas entre espécies enquanto a subunidade β confere especificidade hormonal já que difere entre as espécies (BAENZIGER; GREEN, 1988).

O aumento da concentração plasmática de FSH ocorre no momento da emergência da onda folicular. Desta forma, o FSH é considerado o hormônio responsável pela proliferação de células foliculares e crescimento folicular. Concentrações de FSH aumentam até que a inibina suprima a liberação de FSH para que apenas um folículo continue a crescer. A partir deste momento, o LH passa a ser o principal responsável pelo crescimento final e maturação do folículo dominante (FREEDMAN et al., 1979; EVANS et al., 1997; BRIANT et al., 2003; SAMPER et al., 2007; GASTAL; GASTAL, 2011).

Concentrações adequadas de LH são de suma importância para que ocorra a produção de hormônios esteroides, os quais regulam o momento da ovulação (ADAMS et al., 1986; CHAPPEL; HOWLES, 1991). A inibição completa de LH com o uso de

antarelix, um antagonista de GnRH, acarreta na inibição da ovulação em éguas. Porém, Briant et al., (2003) demonstraram que mesmo concentrações baixas de LH são capazes de induzir a ovulação.

Em éguas a secreção ovulatória de LH é prolongada e o valor máximo na concentração plasmática é observado no dia seguinte à ovulação (FREEDMAN et al., 1979; MUMFORD et al., 1995; JOHNSON et al., 2000; GINTHER et al., 2006). Contrariamente, em vacas existe um aumento curto e evidente com um pico de LH detectado aproximadamente um dia antes da ovulação (HENRICKS et al., 1970; MUMFORD et al., 1995; SAMPER et al., 2007; GINTHER et al., 2008; GASTAL; GASTAL, 2011). O LH é ainda responsável pelo desenvolvimento inicial do CL, apresentando propriedade de luteinização (CHAPPEL; HOWLES, 1991). Já a progesterona exerce um feedback negativo sobre o LH, resultando assim em uma concentração basal de LH durante o diestro.

2.2. INDUÇÃO DE OVULAÇÃO EM ÉGUAS

A longa duração do estro e o diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da ovulação apresentam grande variabilidade entre éguas, dificultando a predição da ovulação (BURATINI et al., 1997). Para que sejam conseguidas altas taxas de fertilidade o momento da realização da monta natural ou IA é essencial. Assim, a utilização de hormônios indutores da ovulação tem por objetivo estimular a maturação final e a ruptura da parede folicular em até 48 horas após o tratamento, possibilitando uma melhor estimativa do momento da ovulação (MCCUE et al., 2007).

O uso de indutores de ovulação facilita o manejo reprodutivo de equinos, levando a um menor número de inseminações artificiais ou montas naturais a serem realizadas por ciclo, já que possibilitam a predição da ovulação com mais acurácia. (KÖLLING; ALLEN, 2005; SQUIRES, 2008). Seu uso possibilita uma melhor sincronização entre éguas doadoras e receptoras de embrião (CHAVATTE; PALMER, 1998) e diminui o número de vezes que éguas precisam ser IA com sêmen refrigerado e/ou congelado (FERRIS et al., 2011). Atualmente, os fármacos mais utilizados para induzir a ovulação em éguas são a hCG e deslorelina. A eficácia do tratamento com ambos os fármacos é maior quando realizado em fêmeas que possuem um ou mais folículos dominantes com 35 mm de diâmetro associado a edema endometrial. (KÖLLING; ALLEN, 2005; SQUIRES, 2008).

2.2.3 GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

A hCG é uma glicoproteína secretada pelas células sinciciais da placenta humana, formada por uma subunidade alfa e uma beta, com peso molecular de 40.000 dáltons. Sua estrutura molecular é semelhante à molécula de LH equina, apresentando uma grande homologia entre a sequência de amino ácidos (BOUSFIELD et al., 1987; WILSON et al., 1990). A hCG estimula a maturação e ovulação em folículos pré-ovulatórios durante o estro por ligação com receptores de LH foliculares, mimetizando a ação do LH endógeno ao produzir um aumento pré-ovulatório exógeno de LH. Desta forma, o uso de hCG é tão eficaz na indução da ovulação quanto valores endógenos de LH (WILSON et al., 1990; MCCUE et al., 2007; SAMPER, 2008).

Diferentes doses de hCG têm sido utilizadas com efeitos satisfatórios, mas a dose preconizada é a de 2500 UI pela via intravenosa (WILSON et al., 1990; MCCUE et al., 2007; ROMANO, 2013). As éguas geralmente ovulam entre $35,9 \pm 3,2$ horas e $36,0 \pm 2,1$ horas pós-tratamento com hCG (MCKINNON et al., 1997; GASTAL et al., 2006).

Alguns autores afirmam que éguas podem se tornar refratárias a ação da hCG devido ao alto peso molecular e propriedades de glicoproteínas da mesma, o que resulta em formação de anticorpos após repetidos tratamento em um curto período. Wilson et al. (1990) relataram a formação de anticorpos anti-hCG em todas as éguas estudadas quando este indutor de ovulação foi utilizado em dois ou mais ciclos estrais consecutivos, resultando em um menor incidência de ovulação dentro de 48 horas após o tratamento. Entretanto, estas éguas continuaram a ovular e parir potros saudáveis mesmo com a presença de anticorpos anti-hCG. Siddiqui et al. (2009a) também relataram produção de anticorpos anti-hCG em 42% das éguas que foram tratadas com hCG uma ou mais vezes antes do experimento. Estes animais neutralizam a hCG até 30 horas após o tratamento de tal forma que este hormônio perde sua capacidade de antecipar a ovulação.

Todavia, outros estudos mostram que indução com hCG é eficiente, levando éguas a ovularem em menos de 48 horas. Após a indução da ovulação utilizando hCG foi observada ovulação depois de $36,0 \pm 2,1$ (GASTAL et al., 2006), $38,7 \pm 1,1$ horas (ULIANI, 2012) e $41,0 \pm 1,0$ (ROMANO, 2013).

2.2.4 DESLORELINA

A deslorelina é um agonista sintético do hormônio peptídico GnRH que estimula a liberação endógena de LH pela parte anterior da hipófise. Esta secreção de LH estimula a maturação e ovulação folicular (MUMFORD et al., 1995). Quando deslorelina foi aplicada em éguas cíclicas iniciou o aumento pré-ovulatório de LH dentro de um dia após a ovulação (JOHNSON et al., 1986). A concentração plasmática de LH na circulação periférica das éguas tratadas com GnRH era de 3 a 4 vezes maior do que de éguas do grupo controle (VELEZ et al., 2012). Contrariamente, quando o antagonista de GnRH, antarelix, foi utilizado no final da fase folicular houve uma grande diminuição das concentrações de LH durante o tratamento (BRIANT et al., 2003).

Inicialmente, a deslorelina foi utilizada em éguas na forma de implantes subcutâneos para induzir a ovulação na presença de folículos com diâmetro ≥ 30 mm. Embora 80% das éguas tratadas ovulavam em até 48 horas sem alteração na taxa de gestação, este dispositivo causou um aumento indesejável no período até o próximo ciclo estral, ausência de crescimento folicular e inatividade ovariana. Estas alterações podem ser decorrentes de supressão do desenvolvimento folicular ou recrutamento tardio de folículos dominantes (JÖCHLE; TRIGG, 1994; MUMFORD et al., 1995; FARQUHAR et al., 2001; JOHNSON et al., 2002), porque quando o implante subcutâneo demorava a ser retirado ou algum fragmento deste permanecia na égua GnRH era liberado após a ovulação, resultando em dessensibilização, ou seja down-regulation da hipófise. Devido a esse maior intervalo interovulatório, implantes subcutâneos de deslorelina tornaram-se pouco utilizados (JOHNSON et al., 2000; JOHNSON et al. 2002; SQUIRES, 2008).

Por sua vez, a deslorelina injetável não induz um aumento do intervalo até o próximo ciclo estral (KÖLLING; ALLEN, 2005; MCCUE et al., 2007). A dose utilizada é de 1,5 mg, levando a ovulação dentro de $41,4 \pm 9,4$ horas após o tratamento (MCCUE et al., 2007; SAMPER, 2008; FERRIS et al., 2011).

Entretanto, o uso de deslorelina no início da estação de monta resulta em menores taxas de ovulação dentro de 48 horas, uma vez que durante a primeira ovulação da estação de monta éguas possuem concentrações plasmáticas de LH mais baixas (GASTAL et al., 2007). Devido a esse fato, preconiza-se o uso de hCG tanto no início quanto no final da estação reprodutiva (FARQUHAR et al., 2000), pois este age

diretamente nos receptores ovarianos de LH enquanto a deslorelina estimula a liberação de LH pela hipófise (SQUIRES, 2008). Na indução de ovulação em éguas idosas a aplicação de LH exógeno, como a hCG, também é mais eficaz (FARQUHAR et al., 2000). Devido à menor concentração plasmática de LH em éguas idosas (≥ 18 anos) quando comparado com fêmeas jovens (5 e 6 anos) (GINTHER et al., 2008) não é indicado o uso de deslorelina nessas éguas.

Pesquisas mais recentes mostram que embora o LH endógeno, produzido pela deslorelina, e o hCG ambos se liguem ao receptor de LH (LHR) como possuem estrutura diferente levam a interação receptor-hormônio diferente. Em humanos *in vitro* a hCG foi cinco vezes mais biopotente do que o hLH em relação à produção de cAMP, mensageiro na cascata da esterideogênese (CASARINI et al., 2012). Semelhantemente, em ovelhas cultura celular exposta à hCG originou maior quantidade de cAMP do que quando exposta à LH ovino. Quando células *in vitro* foram expostas à LH níveis de phospho-ERK1/2 eram maiores (GUPTA et al., 2012).

Uma vantagem do uso de deslorelina é que seu uso repetido para induzir ovulação não leva éguas a se tornarem refratárias ao hormônio (MUMFORD et al., 1995) como pode ocorrer com o uso de hCG em algumas éguas (WILSON et al., 1990; SIDDIQUI et al. 2009a). A deslorelina não causa refratariedade porque diferentemente do hCG não possui alto peso molecular.

2.3 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO TRATO REPRODUTIVO

A US modo-B do trato reprodutivo de éguas se tornou popular a partir dos anos 80. Esta ferramenta é utilizada para monitorar alterações ovarianas e uterinas ao longo do ciclo estral. Possibilita uma avaliação mais detalhada do sistema reprodutor quando comparada à palpação transretal na detecção de: folículos e corpos lúteos, iminência de ovulação, dupla ovulação, folículos hemorrágicos anovulatórios, cistos e tumores ovarianos ou uterinos, diagnóstico precoce de gestação, entre outros (PIERSON; GINTHER, 1985; GINTHER, 2014).

No final da década de 90 a US Doppler começou a ser utilizada em equinos, aumentando a capacidade de diagnóstico, monitoramento e predição de fenômenos na reprodução equina. Assim, foi possível reavaliar conceitos relacionados à fisiologia da reprodução, pois produz uma análise mais precisa da fisiologia de ovários e útero

através de características específicas de fluxo sanguíneo local (BOLLWEIN et al., 1998; MIYAMOTO et al., 2006; GINTHER, 2007; FERREIRA et al., 2011).

2.4 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

A US Doppler se baseia no princípio de funcionamento do efeito Doppler, um efeito de som que pode ser ilustrado pela percepção de uma buzina por um observador parado. À medida que o carro se aproxima do observador a buzina adquire um tom mais agudo, quando o carro se afasta do observador o som da buzina torna-se mais grave. No caso da US Doppler o objeto parado é o transdutor e o objeto em movimento são as hemácias (GINTHER; UTT, 2004). Esta US mostra dados em tempo real do fluxo sanguíneo, assim como informações sobre o status funcional da estrutura avaliada (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007; FERREIRA et al., 2011).

A US Doppler pode ter importante utilidade para uso a campo e para pesquisas com éguas (GINTHER; UTT, 2004). Assim, existe interesse em desenvolver métodos de avaliação utilizando a tecnologia Doppler de forma que esta se torne aplicável a campo para otimizar biotecnologias, como: seleção de éguas doadoras e receptoras de embriões, IA, aspiração folicular e injeção intracitoplasmática (ICSI) (GINTHER et al., 2007; SIDDIQUI et al., 2009a; FERREIRA; MEIRA, 2011; ALTERMATT et al., 2012). Mais pesquisas e avanços tecnológicos que permitam o uso de US Doppler de forma mais efetiva e com custos mais baixos são necessários (GINTHER; UTT, 2004; MIYAMOTO et al., 2006). Uma possível aplicação prática é o estudo da perfusão vascular (PV) durante a foliculogênese, possibilitando a obtenção de dados mais precisos sobre o momento da ovulação de folículos durante o estro, essencial quando é preciso conhecer o momento exato da ovulação de éguas (PALMER et al., 2006; GASTAL et al., 2006; GINTHER, 2007; FERREIRA; MEIRA, 2011).

Os aparelhos Doppler possuem o modo-B, modo-Doppler e modo-espectral. A função modo-B em escala de cinza serve para localizar estruturas que serão avaliadas com o modo-Doppler ou espectral (GINTHER; UTT, 2004). A função modo-B serve para localizar a estrutura de interesse que vai ser avaliada posteriormente com o modo-Doppler ou Espectral e será o plano de fundo para a representação colorida do fluxo sanguíneo (GINTHER; UTT, 2004). O modo-Doppler, constituído pelas funções *color* e *power-flow*, possibilita uma rápida avaliação qualitativa da estrutura (GINTHER, 2007). O modo *color-flow* produz imagens por superposição de sinais coloridos sobre o modo-

B (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007). A velocidade do sangue é calculada através da média da mudança de frequência (RUBIN et al., 1994; GINTHER; UTT, 2004) (Figura 1).

A função *power-flow* é um método mais novo e avançado de avaliar o fluxo sanguíneo, utiliza a intensidade da estrutura em deslocamento e não a velocidade (GINTHER, 2007). Possui maior sensibilidade para detectar fluxo sanguíneo, possibilitando uma análise mais precisa de vasos sanguíneos de menor calibre e que possuem fluxo com menor velocidade (RUBIN et al., 1994; GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007) como os vasos ovarianos. A intensidade do fluxo sanguíneo é maior quando a cor é próxima de amarelo, e menor quando próxima de vermelho. A função *power-flow*, em alguns aparelhos mais modernos, também exibe os pontos Doppler em gradações de vermelho e azul.

O modo espectral possibilita a avaliação da velocidade de fluxo sanguíneo de um vaso com o posicionamento de um “gate” sobre seu lúmen, fornecendo valores exatos de velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER; UTT, 2004; FERREIRA et al., 2011). Os resultados são expostos em um gráfico que representa o fluxo sanguíneo de uma artéria durante determinado momento do ciclo cardíaco. Os índices Doppler de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) são frequentemente utilizados. O RI consiste na relação negativa entre a resistência do tecido e perfusão vascular; e o PI é a pulsatilidade. Quanto maior o RI e PI menor a irrigação do tecido (GINTHER; UTT, 2004; GINTHER, 2007).

2.5 AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO VASCULAR FOLICULAR

A US modo-B facilita a predição do momento da ovulação através da observação de alterações morfoecogênicas do folículo dominante, como por exemplo: formato do folículo, ecogenicidade e espessura da camada da granulosa e presença de banca anecóica (PIERSON; GINTHER, 1985, GASTAL et al., 1998). Além disso, mudanças na hemodinâmica ovariana são detectadas durante todo o desenvolvimento folicular e estão relacionadas com o remodelamento do tecido ovariano e do sistema vascular responsável por sua irrigação (ACOSTA et al., 2003; GINTHER, 2007). Logo, a US Doppler pode ser eficaz na determinação do potencial ovulatório de folículos dominantes durante o período de transição de primavera (ACOSTA et al., 2004a; GASTAL et al., 2007) assim como ao longo da estação reprodutiva (ACOSTA et al.,

2004b; GASTAL et al., 2006; GINTHER et al., 2007; GINTHER et al., 2009; ALTERMATT et al., 2012; ULIANI, 2012; ROMANO, 2013). Pode também ser utilizada a campo para acompanhar folículos antes da ovulação (PALMER et al., 2006). Entretanto, a literatura diverge sobre a perfusão vascular folicular (PVF). Desta forma, são necessárias mais pesquisas para elucidar o real comportamento da vascularização nestas estruturas e também os mecanismos que determinam estas mudanças.

2.5.1 VASCULARIZAÇÃO DE FOLÍCULOS DOMINANTES E SUBORDINADOS

As alterações na rede vascular dos folículos antes da ovulação permitem maior suprimento de oxigênio, nutrientes e gonadotrofinas, essenciais para o crescimento e esteroidogênese folicular (WATSON; AL-ZI'ABI, 2002). O aumento da irrigação de folículos dominantes pode estar relacionado com a existência de fatores angiogênicos produzidos por estes folículos. Estas substâncias promovem o crescimento de novos vasos, aumentando o fluxo sanguíneo e fazendo com que o folículo possua hormônios e substâncias metabólicas necessárias para a sua maturação final (SENGER, 2003).

Um aumento da vascularização na parede folicular foi detectado através de avaliações ultrassonográficas Doppler durante os seis dias que precederam a ovulação com um ritmo mais lento durante a primeira ovulação quando comparada com ovulações subsequentes da estação de monta (GASTAL et al., 2007). A US Doppler durante a transição de primavera foi eficiente para diferenciar folículos dominantes que se tornariam ovulatórios daqueles que se tornariam anovulatórios. Com avaliações diárias, foi observado que folículos que não ovularam apresentaram uma menor irrigação da parede folicular a partir da divergência folicular (25 mm de diâmetro) comparado com folículos ovulatórios que possuíram irrigação folicular mais alta (ACOSTA et al., 2004a).

Histologicamente, também foi detectada alteração da PV entre folículos durante a transição de primavera e durante a estação reprodutiva em éguas. Visualmente, folículos (diâmetro médio de 34 mm) durante a estação reprodutiva possuíam uma maior irrigação, apresentando parede com coloração variando de laranja a vermelho enquanto os folículos com menor irrigação variavam de amarelado a rosa pálido (WATSON; AL-ZI'ABI, 2002; ACOSTA et al., 2004a). Desta forma, é sugerido que as

concentrações plasmáticas mais baixas de LH durante a transição de primavera levam à menor PVF e subsequente atresia folicular (ACOSTA et al., 2004a).

Através da PV é possível detectar precocemente diferenças vasculares entre o folículo que se tornará dominante e aqueles que se tornarão subordinados durante a estação de monta (GINTHER et al., 2007). O folículo dominante de éguas pode ser identificado um dia antes do desvio folicular, pois apresenta um aumento constante da porcentagem de irrigação da parede folicular. Contrariamente, folículos subordinados apresentam uma diminuição da irrigação folicular atingindo níveis significativamente menores do que a do folículo dominante no dia que antecede o desvio folicular (ACOSTA et al., 2004b). Folículos mostraram aumento progressivo da PVF durante os quatro dias que antecederam a ovulação quando foram analisados a campo (PALMER et al., 2006).

Em vacas também houve uma diferença na PV entre folículos dominantes que ovularam e que regrediram. Quando sofreram atresia não apresentaram aumento na vascularização de suas paredes, com ausência de sinais de irrigação sanguínea. Os folículos que ovularam tiveram aumento da PV. Isto demonstra que a vascularização do folículo pode servir como um indicador mais precoce de folículos saudáveis e também servir como mais uma forma de detectar qual folículo se tornará dominante e quais sofrerão atresia (ACOSTA et al., 2003). Nos ovários de mulheres não foi detectada diferença na densidade vascular, avaliação do número de vasos por um programa de computador, entre folículos dominantes e folículos não dominantes, tendo sido detectado uma densa rede de capilares em folículos em atresia (SUZUKI et al., 1998).

2.5.2 VASCULARIZAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-OVULATÓRIOS

Alterações estruturais e funcionais que ocorrem no folículo podem estar associadas com um aumento local de fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório que levaria à maior suprimento de gonadotrofinas e outros fatores hormonais necessários para a maturação folicular (ACOSTA et al., 2003; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Hormônios indutores da ovulação influenciam tanto as concentrações hormonais sistêmicas quanto a vascularização folicular através de mecanismos ainda não elucidados. Estes hormônios parecem induzir alterações tanto nas concentrações plasmáticas hormonais quanto na produção de fatores de crescimento e peptídeos

vasoativos relacionados à PVF (ACOSTA et al., 2003; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; BERISHA et al., 2008).

Foram detectados, através de histologia, hiperemia e aumento no número de vasos sanguíneos na parede de folículos próximos à ovulação entre 33 e 39 horas após o tratamento de éguas com hCG, indicando um aumento da irrigação sanguínea (KERBAN et al., 1999). Da mesma forma, éguas tratadas com hCG ou solução salina e avaliadas com US Doppler exibiram aumento da PVF durante as primeiras 36 horas após o tratamento, iniciando com 65 a 70% e atingindo valores máximos de 80 a 90% da parede folicular com sinais coloridos Doppler. Esta mudança na vascularização folicular foi mais rápida em éguas tratadas com hCG do que em éguas tratadas com solução salina. Houve uma diminuição brusca na irrigação sanguínea da parede folicular durante as últimas quatro horas anteriores à ovulação em todas as éguas, com uma vascularização de aproximadamente 40% na hora que antecedeu à ovulação (GASTAL et al., 2006). Contrariamente, aplicação de LH equino, utilizado para induzir maturação folicular e oocitária, o qual possui grande semelhança estrutural com hCG levando à resposta hormonal semelhante, não induziu à mudança na PVF de éguas após tratamento (ALTERMATT et al., 2012). Adicionalmente, não houve diferença na PVF durante as 36 horas após tratamento com hCG ou NaCl 0,9% (ROMANO, 2013). Uliani (2012) não detectou diminuição na PVF durante as últimas horas que antecederam à ovulação, com avaliações de quatro em quatro horas e também não observou diferença estatística entre tratamentos (hCG, GnRH e associação de hCG e GnRH). Estes estudos mostram diferentes perfis de PVF, portanto a predição do status funcional do folículo pré-ovulatório não seria possível com o uso da US Doppler.

Vacas induzidas com GnRH apresentaram um rápido aumento da PVF após 30 minutos. Animais com ovulação espontânea tiveram um aumento gradual, quando a concentração de LH ainda estava baixa (ACOSTA et al., 2003). Em outro estudo, também com vacas induzidas com GnRH, ocorreu um aumento bifásico da PVF, inicialmente concentrações de LH atingiram seu valor máximo três horas após o pico de LH. Durante a segunda fase houve aumento de PVF oito horas antes da ovulação e atingiu valor máximo duas horas antes da ovulação, sem relação com o LH (SIDDIQUI et al., 2010, Figura 1). Ovelhas tratadas com LH apresentaram um aumento da irrigação sanguínea para o ovário, mas o mecanismo que aparentemente levou o LH a estimular a irrigação sanguínea para o ovário ainda não foi elucidado (NISWENDER et al., 1976).

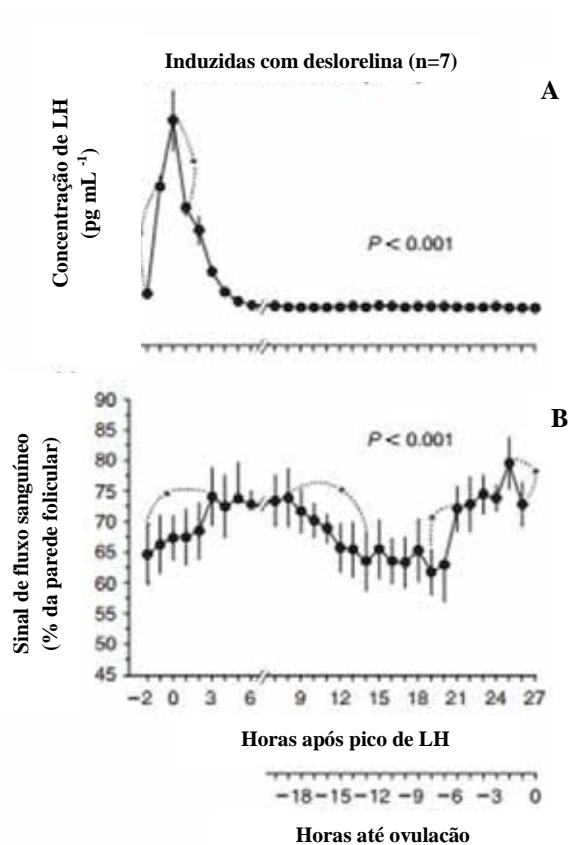


FIGURA 1. Concentração plasmática de LH (A) e perfusão vascular folicular (PVF) (B) em vacas tratadas com deslorelina durante o estro. Siddiqui et al. (2010).

Quando indução com hCG ou GnRH foi comparada em vacas a PVF aumentou seis horas e uma hora após tratamento com GnRH e hCG, respectivamente, desta forma observou-se maior PVF no grupo tratado com hCG após 1 hora. Nas vacas tratadas com hCG a PVF começou a diminuir alcançando valores mais baixos na hora 24 enquanto no grupo GnRH a PVF permaneceu igual. A média da PVF entre a hora 0 e hora 24 foi maior nas vacas tratadas com hCG do que nas tratadas com GnRH (ASLAN et al., 2011).

Em éguas tratadas com hCG o nível de LH permaneceu constante até a hora 24 após tratamento quando houve um aumento que continuou até a hora 72 (GINTHER et al., 2009). Em vacas, também foi observado um aumento de concentrações plasmáticas de LH após indução com hCG (SIDDIQUI et al., 2009b).

O uso de implante subcutâneo de deslorelina em éguas levou a um aumento de LH antes da ovulação, 12 a 24 horas após o tratamento. Éguas controle tiveram concentrações mais altas de LH um dia após a ovulação, evidenciando o estímulo da

deslorelina sobre o LH antes da ovulação (MUMFORD et al., 1995). Quando deslorelina injetável foi utilizada nove dias após a ovulação de éguas, a concentração de LH atingiu valor máximo quatro horas após e permaneceu elevada até 12 horas após o tratamento, seguido de uma diminuição (KINO et al., 2014).

Após aplicação de GnRH em vacas concentrações plasmáticas de LH aumentaram atingindo um pico em duas horas após o tratamento. Nas vacas tratadas o pico de LH foi mais alto do que do grupo controle, mas com uma duração de seis horas no grupo tratado e de 12 horas no grupo controle (ACOSTA et al., 2003). Outro experimento detectou aumento de concentrações plasmáticas de LH uma hora após tratamento com GnRH, com concentrações máximas duas horas após o tratamento. Em vacas que não receberam indutor de ovulação, concentrações de LH diminuíram seis horas após o pico de LH e permaneceram baixas até a ovulação (SIDDIQUI et al., 2010).

2.6 OUTROS FATORES

Hormônios, fatores de crescimento e substâncias vasoativas parecem estar inter-relacionados com os mecanismos que levam a alterações na PVF (ACOSTA et al., 2004a; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; WATSON; AL-ZI'ABI, 2002; GASTAL et al., 2006; SIDDIQUI et al., 2010). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) regula a angiogênese fisiológica de diversos tecidos, inclusive do aparelho reprodutivo (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) atua no desenvolvimento de folículos (ACOSTA et al., 2004a).

Havia expressão de VEGF tanto em folículos não dominantes quanto em folículos dominantes. Entretanto, VEGF não foi expressa em folículo que sofreram atresia em mulheres (SUZUKI et al., 1998). Foi possível detectar upregulation das isoformas de VEGF em folículos coletados de vacas imediatamente após o pico de LH decorrente de aplicação de GnRH. Após ovulação a VEGF continuou a sofrer upregualtion, indicando que este fator de crescimento possui um importante papel na ruptura do folículo dominante (BERISHA et al., 2008). Através de imunohistoquímica o VEGF foi corado de forma forte e difusa em folículos pré-ovulatórios quando comparados a folículos de transição (WATSON; AL-ZI'ABI, 2002).

O fluido folicular de folículos anovulatórios com 30 mm de diâmetro apresentou menores concentrações de IGF-1, e VEGF. Estes achados servem para elucidar

diferenças de PVF durante as fases da estação reprodutiva, sendo o folículo pré-ovulatório mais irrigado devido a maior número de vasos, vasos de maior tamanho ou vasos mais tortuosos (ACOSTA et al., 2004a).

Maior irrigação sanguínea possibilitaria um maior suprimento de oxigênio, nutrientes e gonadotrofinas, todos essenciais para o crescimento folicular. A ausência dessas modificações em folículos durante a transição de primavera pode explicar sua atresia Assim, existe um status funcional comprometido de uma forma geral e não de um só sistema, mostrando que a PVF é controlada por vários fatores e não apenas um (WATSON; AL-ZI'ABI, 2002; ACOSTA et al., 2004a).

Os peptídeos angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1) e peptídeo atrial natriurético (ANP) e a biossíntese de prostaglandinas podem possuir a capacidade de induzir mudanças vasculares locais, possivelmente exercendo controle sobre a PVF. Foi observado um efeito de cascata onde Ang II estimulou a liberação de ET-1, que por sua vez estimulou a liberação de ANP o qual estimulou a liberação de Ang II. Esta cascata pode ser uma das responsáveis por mediar a ação de LH relacionada à secreção de Ang II folicular responsável por acelerar a produção de prostaglandina e desta forma modular a esterideogênese no folículo bovino durante o período pré-ovulatório. (ACOSTA et al., 1999; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

2.8REFERÊNCIAS

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

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, 2004a.

ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; OZAWA, T.; SATO, K.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1419–1425, 1999.

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

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.

ADAMS, T.E.; HORTON, M.B.; WATSON, J.G.; ADAMS, B.M. Biological activity of luteinizing hormone (LH) during the estrous cycle of mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.3, n.2, p.69-77, 1986.

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

ASLAN, S.; ARSLANBAS, D.; BEINDORFF, N.; BOLLWEIN, H. Effects of induction of ovulation with GnRH or hCG on follicular and luteal blood flow in Holstein–Friesian heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.781–786, 2011.

BAENZIGER, J.U.; GREEN, E.D. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.947, n.2, p.287-306, 1988.

BERISHA, B.; STEFFL, M.; WELTER, H.; KLIEM, H.; MEYER, H.H.; SCHAMS, D.; AMSELGRUBER, W. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.258–268, 2008.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v.49, p.1483-1488, 1998.

BOUSFIELD, G.R.; LIU, W.K., SUGINO, H., WARD, D.N. Structural studies on equine glycoprotein hormones: amino acid sequence of equine lutropin β -subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.18, p.8610-8620, 1987.

BRIANT, C.; OTTOGALLI, M.; MOREL, M.; GUILLAUME, D. Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.24, p.305–322, 2003.

BURATINI, J.; ROSA E SILVA, A.A.M.; BARROS, C.M.Q.; PAPA, F.O.; CALDAS, M.C.S.; MEIRA, C. Follicular dynamics in Mangalarga mares. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.7-11, 1997.

CASARINI, L.; LISPI, M.; LONGOBARDI, S.; MILOSA, F.; LA MARCA, A.; TAGLIASACCHI, D.; PIGNATTI, E.; SIMONI, M. LH and hCG action on the same

receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signaling. Public Library of Science, v.7, p.1-15, 2012.

CHAPPEL, S.C.; HOWLES, C. Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. **Human Reproduction**, v.6, n.9, p.1206-1212, 1991.

CHAVATTE, P.; PALMER, E. Induction of ovulation in the mare. **Equine Veterinary Education**, v.10, p.26-30, 1998.

EVANS, M.J.; IRVINE, C.H. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.23, p.193-200, 1975.

EVANS, T.J., CONSTANTINESCU, C.M., GANJAM, V.K. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. In: Youngquist, R.S. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, Saunders Elsevier Company, Philadelphia, p.43–70, 1997.

FARQUHAR, V.J.; MCCUE, P.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Effect of deslorelin acetate on gonadotropin secretion and ovarian follicle development in cycling mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n.5, 2001.

FARQUHAR, V.J.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; SQUIRES, E.L. Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n.11, 2000.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v.18, n.1, p.4-25, 1997.

FERREIRA, J.C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v.41, p.1063-1069, 2011.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.105-111, 2011.

FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, R.G.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Efficacy of deslorelin acetate (Sucromate) on induction of ovulation in American Quarter horse mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, n.5, p.1-4, 2011.

FREEDMAN, L.J.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. **Biology of Reproduction**, v.20, p.567-574, 1979.

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

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.; GASTAL, M.O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.239-252, 2011.

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.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals, Book 2**. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1995.

GINTHER, O.J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v.81 p.112–125, 2014.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: ColorDoppler ultrasonography**. Ed. OJ Ginther, 1. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007. 258p.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.311–317, 2009.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. Relationships of Follicle Versus Oocyte Maturity to Ultrasound Morphology, Blood Flow, and Hormone Concentrations of the Preovulatory Follicle in Mares. **Biology of Reproduction**, v.77, p.202–208, 2007.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JABOC, J.C.; SIDDIQUI, M.A.R.; 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.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.12, 2004.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.144–150, 2006.

GUPTA, C.; CHAPEKAR, T.; CHHABRA, Y.; SINGH, P.; SINHA, S.; LUTHRA, K. Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells. **The Indian Journal of Medical Research**, v.135, p.331–340, 2012.

HALASZ, B.; KISS, J.; MOLNAR, J. Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: morphological aspects. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.33, p.663-668, 1989.

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, n.4, p.371-372, 1983.

HENRICKS, D.M.; DICKEY, J.F.; NISWENDER, G.D. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. **Biology of Reproduction**, v.2, n.3, p.346-351, 1970.

JÖCHLE, W.; TRIGG, T.E. Control of ovulation in the mare with ovuplant TM. A short-term release implant (STI) containing the GnRH analogue deslorelin acetate: Studies from 1990 to 1994. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.14, n.12, p.632-644, 1994.

JOHNSON, A.L. Pulsatile Administration of Gonadotropin- Releasing Hormone Advances Ovulation in Cycling Mares. **Biology of Reproduction**, v.35, p.1123-1130, 1986.

JOHNSON, C.A.; THOMPSON JR, D.L., KULINSKI, K.M., GUITREAU, A.M. Prolonged interovulatory interval and hormonal changes in mares following the use of Ovuplant™ to hasten ovulation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n.5, p.331-336, 2000.

JOHNSON, C.A.; THOMPSON JR., D.L.; CARTMILL, J.A. Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2681-2687, 2002.

KERBAN, M.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Characterization of cellular and vascular changes in equine follicles during hCG-induced ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.115-123, 1999.

KINO, S.; OSAWA, T.; MIZUNO, S.; WATANABE, G.; TAYA, K.; IZAIKE, Y. Effect of postbreeding intramuscular administration of deslorelin acetate on plasma LH and progesterone concentrations and conception rate in mares. **Journal of Equine Sciences**, v.25, n.1, p. 23–27, 2014.

KÖLLING, M; ALLEN W.R. Ovulation induction for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue, In: Proceedings of a Workshop, Havemeyer Foundation Monograph Series No. 18, **International Equine Gamete Group**; p.54-55, 2005.

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v.64, p.480-491, 2005.

MCCUE, P.M.; MAGEE, C.; GEE, E.K. Comparison of compounded deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.2, p.58-61, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Equídeos**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>> Acesso em: 02 de Oct. 2014.

MCKINNON, A.O.; PERRIAM, W.J.; LESCUN, T.B.; WALKER, J., VASEY, J.R. Effect of a GnRH analogue (Ovuplant), hCG and dexamethasone on time to ovulation in cycling mares. **World Equine Veterinary Review**, v.2, p.16-8, 1997.

MIYAMOTO, A; SHIRASUNA, K; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.1, p.153-160, 2006.

MUMFORD, E.L; SQUIRES, E.L.; JÖCHLEB, E.; HARRISON, L.A.; NETT, T.M.; TRIGG, T.E. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares

during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.129-140, 1995.

NISWENDER, G.D.; REIMERS, T.J.; DIEKMAN, M.A.; NETT, T.M. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of Reproduction**, v.14, p.64-81, 1976.

PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P.; VERDONCK, E. Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.182–185, 2006.

PERRY, G. **2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals**. Disponível em: <http://www.iets.org/pdf/comm_data/december2013.pdf> Acesso em: 02 out. 2014.

PIERSON, H.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v.24, n.3, p. 359-368, 1985.

RAGNI, G.; ANSELMINO, M.; NICOLOSI, A.E.; BRAMBILLA, M.E.; CALANNA, G.; SOMIGLIANA, E. Follicular vascularity is not predictive of pregnancy outcome in mild controlled ovarian stimulation and IUI cycles. **Human Reproduction**, v.22, n.1, p.210–214, 2007.

ROMANO, R. M. **Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas**. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RUBIN, J.M.; BUDE, R.O.; CARSON, P.L.; BREE, R.L.; ADLER, R.S. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. **Radiology**, v.190, p.853-856, 1994.

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

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.E.; McKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. 1 ed. Missouri: Elsevier, 2007.

SAS Institute. 2011. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2 ed. Pullman, WA, 2003. p.272.

SIDDIQUI, M.A.R.; FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; COOPER, D.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers, **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1110–1117, 2010.

SIDDIQUI, M.A.R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O.J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.287–292, 2009b.

SIDDIQUI, M.A.R.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Effect of hCG in the presence of hCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. **Reproduction of Domestic Animals**. v.44, p.474–479, 2009a.

SIDDIQUI, M.A.R.; GINTHER, O.J. Switching of largest follicle from dominant to subordinate status when follicle and CL are in same ovary in heifers. **Theriogenology**, v.82, n.2, p.259–265, 2014.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares, **Animal Reproduction**, v.3, n.3, p.339-346, 2006.

SQUIRES, E.L. Hormonal manipulation of the mare: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.627-634, 2008.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; TAKAYA, R., FUKAYA, T., YAJIMA, A., NAGURA, H: Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. **Human Reproduction**, v.13, p.953-959, 1998.

THOMPSON J.R.; D.L.; GODKE, R.A.; SQUIRES, E.L. Testosterone effects on mares during synchronization with altrenogest: FSH, LH, estrous duration and pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, v.56, n.3, p.678–686, 1983.

ULIANI, R. C. **Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-B e Doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação**, 2012. 154f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VELEZ, I.C.; PACK, J.D.; PORTER, M.B.; SHARP, D.C.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Secretion of luteinizing hormone into pituitary venous effluent of the follicular and luteal phase mare: novel acceleration of episodic release during constant infusion of gonadotropin-releasing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v.42, p.121–128, 2012.

WATSON, E.D.; AL-ZI'ABI, M.O. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. **Reproduction**, v.124, p.227–234, 2002.

WILSON, C. G.; DOWNIE, C.R.; HUGHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.10, n.4, p.301-308, 1990.

Capítulo 2

1.OBJETIVOS

1.1Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações na perfusão vascular de folículos pré-ovulatórios após o tratamento com hCG ou deslorelina, bem como sua relação temporal com o perfil plasmático de LH em éguas.

1.2Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram: a) descrever a hemodinâmica do folículo pré-ovulatório após o tratamento com hCG ou análogo do GnRH (deslorelina), b) avaliar a relação temporal entre a concentração plasmática de LH endógeno e a vascularidade folicular, c) testar a hipótese de que a administração de deslorelina induz a um aumento transitório na vascularidade do folículo pré-ovulatório nas primeiras 12 horas pós tratamento concomitante com um aumento na concentração plasmática de LH, d) testar a hipótese de que um aumento precoce e transitório na vascularidade do folículo pré-ovulatório é observado em éguas tratadas com hCG, e) testar a hipótese de que um aumento progressivo na vascularidade folicular é observado nas 30 horas subsequentes ao tratamento indutor de ovulação, independente do hormônio utilizado, f) testar a hipótese de que um decréscimo progressivo na vascularidade folicular é observado nas últimas quatro horas que antecedem a ovulação, independente do hormônio indutor da ovulação.

Capítulo 3

Trabalho científico elaborado segundo as normas da Journal of Equine Veterinary Science, ISSN 0737-0806, ranqueada como B2, pelo QUALIS – CAPES

Tratamento com hCG ou deslorelina não altera a perfusão vascular folicular em éguas cíclicas

BOAKARI, Y.L.; FERREIRA, J.C.; CANESIN, H.S.; PANTOJA, J. J.C.F.; MEIRA, C.

RESUMO

A indução da ovulação após o tratamento com hCG e análogos de GnRH, como a deslorelina, ocorrem por mecanismos distintos. É possível que estes tratamentos acarretem alterações na perfusão vascular folicular durante o período pré-ovulatório. Desta forma, a ultrassonografia (US) colorida Doppler apresenta potencial para ser utilizada como ferramenta na avaliação em tempo real do potencial ovulatório de folículos em éguas. Os objetivos principais deste trabalho foram avaliar as alterações na perfusão vascular folicular (PVF) após o uso de hormônios indutores da ovulação e sua relação temporal com o perfil plasmático de LH. Além de avaliar se a PVF pode ser utilizada para indicar a proximidade da ovulação. Ciclos estrais de éguas foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais: grupo GnRH, grupo hCG e grupo controle (n=10 éguas/grupo). Tratamentos foram realizados na presença de folículo com diâmetro ≥ 35 mm associado à edema uterino. O momento imediatamente antes do tratamento foi considerado H0. Colheita de sangue e exame ultrassonográfico Doppler função *power-flow* do folículo dominante foram realizados para avaliar, respectivamente, a concentração plasmática de LH e a perfusão vascular folicular (PVF). Os parâmetros foram avaliados de hora em hora entre os intervalos H0-H12 e a cada seis horas da H12 até H30. Adicionalmente, os grupos GnRH e hCG foram acompanhados a cada hora a partir da H30 até a detecção da ovulação ou até H48. Já no grupo controle, foi realizada US modo-B a cada seis horas após H30 e ao se detectar características indicativas da proximidade de ovulação a US Doppler foi realizada de hora em hora até a detecção da ovulação. O grupo controle apresentou um intervalo mais longo até à ovulação ($P < 0,0001$). Efeito de grupo ($P < 0,05$) foi detectado para PVF. Animais do grupo GnRH apresentaram maior PVF ($P < 0,05$) média quando

comparado aos grupos hCG e controle desde H0 até o momento da ovulação. Não foi encontrado efeito de momento e interação grupo:momento entre os grupos experimentais. A concentração média de LH entre H1 e H18 foi maior ($P < 0,05$) no grupo GnRH do que nos grupos hCG e controle. Nos grupos controle e hCG, a concentração plasmática de LH foi constante durante as primeiras 12 horas pós-tratamento. Nos grupos GnRH e hCG, a concentração de LH foi mais alta ($P < 0,001$) durante a eminência da ovulação (entre H-6 e H-1). As correlações entre a PVF e as concentrações plasmáticas de LH foram baixas nos grupos GnRH, hCG e controle.

Palavras-chave: folículo pré-ovulatório, *power-flow*, ultrassonografia Doppler, vascularização.

ABSTRACT

Ovulation induction after treatment with hCG and GnRH analogs, such as deslorelin, occur through distinct mechanism. Meanwhile, it is possible that these treatments entail changes in follicular vascular perfusion during the pre-ovulatory period. Thus, color Doppler ultrasound (US) presents a potential to be used as a tool for real-time assessment of follicles ovulatory potential in mares. The main purposes of this paper were to evaluate follicular vascular perfusion (FVP) after the use of ovulation induction hormones and the relationship with the plasmatic profile of LH. Additionally, evaluate if FVP can be used to indicate proximity to ovulation. Estrous cycles of mares were randomly divided in three experimental groups: GnRH group, hCG group and control group (n=10 mares/group). Treatments were done in the presence of a follicle with ≥ 35 mm diameter associated with uterine edema. The moment immediately before treatment was considered H0. Blood collection and Doppler US exam with power-flow mode of the dominant follicle were done to evaluate, respectively, plasmatic concentration of LH and FVP. Parameters were evaluated every hour between H0-H12 and every six hours from H12 until H30. Additionally, GnRH and hCG groups were evaluated every hour from H30 until ovulation detection or until H48. In the control group, B-mode ultrasonography was completed every six hours after H30 and when detection of characteristics indicative of imminent ovulation Doppler ultrasonography was done every hour until ovulation detection. Control group presented a longer interval until ovulation ($P < 0,0001$). Group effect ($P < 0,05$) was detected for FVP. Animals

from the GnRH group presented higher mean FVP ($P < 0.05$) when compared to the hCG and control groups since H0 until the moment of ovulation. No moment effect and interaction group:moment was found between experimental groups. Mean LH concentration between H1 and H18 was higher ($P < 0.05$) in the GnRH group than in the hCG and control groups. In the control and hCG, LH plasmatic concentration was constant during the first 12 hours post-treatment. In the GnRH and hCG groups, LH concentration was higher ($P < 0,001$) during ovulation eminence (between H-6 and H-1). Correlations between FVP and plasmatic LH concentrations were low in the GnRH, hCG and control groups.

Key words: pre-ovulatory follicle, power-flow, Doppler ultrasonography, vascularization.

INTRODUÇÃO

Hormônios indutores da ovulação estimulam a maturação final e a ruptura da parede folicular em até 48 horas após o tratamento, possibilitando uma melhor estimativa do momento da ovulação (KÖLLING; ALLEN, 2005; MCCUE et al., 2007; SQUIRES, 2008). Facilitam o manejo reprodutivo de equinos, levando a um menor número de inseminações artificiais ou montas naturais a serem realizadas por ciclo, já que possibilitam a predição da ovulação com mais acurácia. (KÖLLING; ALLEN, 2005; SQUIRES, 2008). Seu uso possibilita uma melhor sincronização entre éguas doadoras e receptoras de embrião (CHAVATTE; PALMER, 1998) e aumenta a eficiência de sêmen refrigerado e/ou congelado por possibilitar a IA mais próxima da ovulação (FERRIS et al., 2011). Atualmente, os fármacos mais utilizados para induzir a ovulação em éguas são a hCG e a deslorelina (KÖLLING; ALLEN, 2005; SQUIRES, 2008). A hCG possui estrutura molecular semelhante à molécula de LH equina, apresentando uma grande homologia entre a sequência de aminoácidos (BOUSFIELD et al., 1987; WILSON et al., 1990). Desta forma se liga a receptores de LH foliculares, mimetizando a ação do LH endógeno ao produzir um aumento pré-ovulatório exógeno de LH (ADAMS et al., 1986). A deslorelina é um agonista sintético do hormônio peptídico GnRH que estimula a liberação endógena de LH pela parte anterior da hipófise. Esta secreção súbita de LH estimula a maturação e ovulação folicular (MUMFORD et al., 1995). Quando deslorelina foi aplicada em éguas cíclicas iniciou o

aumento pré-ovulatório de LH dentro de um dia após a ovulação (JOHNSON et al., 1986).

Entretanto, pesquisas mais recentes mostram que embora o LH endógeno, produzido pela deslorelina, e o hCG ambos se liguem ao receptor de LH (LHR) como possuem estrutura diferente levem a interação receptor-hormônio diferente. Em humanos *in vitro* a hCG foi cinco vezes mais biopotente do que o hLH em relação à produção de cAMP, mensageiro na cascata da esterideogênese (CASARINI et al., 2012). Semelhantemente, em ovelhas cultura celular exposta à hCG originou maior quantidade de cAMP do que quando exposta à LH ovino. Quando células *in vitro* foram expostas à LH níveis de phospho-ERK1/2 eram maiores (GUPTA et al., 2012).

A ultrassonografia (US) Doppler possibilita uma análise mais precisa da fisiologia de ovários e útero através de características específicas de fluxo sanguíneo local (GINTHER; UTT, 2004; MIYAMOTO et al., 2006; GINTHER, 2007; FERREIRA et al., 2011). Com a US é possível acompanhar a dinâmica folicular e as características dos folículos em éguas podendo facilitar a detecção da ovulação de forma mais precisa. Contudo, a predição do momento da ovulação é de difícil execução, devido ao longo período de estro em éguas (GASTAL et al., 1998). Mudanças na hemodinâmica ovariana são detectadas durante todo o desenvolvimento folicular e estão relacionadas com o remodelamento do tecido ovariano e do sistema vascular responsável por sua irrigação (ACOSTA et al., 2003; GINTHER, 2007). Portanto, a perfusão vascular folicular (PVF) pode ser utilizada para avaliar o potencial ovulatório de folículos dominantes de éguas e vacas (ACOSTA et al., 2003; ACOSTA et al., 2004; GASTAL et al., 2007).

O LH é uma gonadotrofina responsável pelo crescimento final e maturação do folículo dominante, o qual responde a uma elevação na concentração de LH (FREEDMAN et al., 1979; BRIANT et al., 2003; GASTAL; GASTAL, 2011). Em éguas, a concentração circulante de LH aumenta progressivamente e concomitante com o desenvolvimento do folículo dominante, atingindo valores máximos 24 horas pós-ovulação (MUMFORD et al., 1995). Estudos realizados em éguas e vacas indicam uma possível correlação entre as concentrações plasmáticas de LH e PVF em fêmeas induzidas com hCG ou GnRH (MUMFORD et al., 1995; ACOSTA et al., 2003; GINTHER et al., 2009; SIDDIQUI et al., 2010; ASLAN et al., 2011).

Éguas induzidas com hCG ou NaCl 0,9% exibiram aumento da PVF durante as primeiras 36 horas após o tratamento seguido de diminuição durante as últimas quatro

horas antes da ovulação (GASTAL et al., 2006). Contrariamente, aplicação de LH equino não induziu à mudança na PVF de éguas (ALTERMATT et al., 2012).

A literatura diverge sobre a PVF, desta forma é necessário elucidar o real comportamento da vascularização em folículos e também os mecanismos que determinam estas mudanças. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações na perfusão sanguínea de folículos com diâmetro ≥ 35 mm após tratamento com hCG ou deslorelina e sua relação temporal com o perfil plasmático de LH, assim determinando a aplicabilidade da tecnologia Doppler na predição da ovulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O experimento foi conduzido de Agosto a Março de 2013 (Botucatu, SP, Brasil, Latitude 22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4") de acordo com a regulamentação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, com aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais, protocolo número 139/2012. Foram utilizados 30 ciclos estrais de 24 éguas mestiças com idade entre cinco e 15 anos, peso entre 250-500 kg. O escore corporal das éguas permaneceu alto durante todo o experimento (nota ≥ 7 , HENNEKE et al, 1983). Os animais foram alimentados com feno de Coast-Cross (*Cynodon dactylon*), ração, sal mineral e água ad libitum. As éguas foram mantidas em bom estado de saúde durante o experimento.

Éguas com ausência de anormalidades uterinas e ovarianas avaliadas utilizando US modo-B foram utilizadas. Éguas que desenvolveram folículos hemorrágicos anovulatórios, codominância seguida de ovulações duplas ou que não ovularam em até 48 horas após o tratamento com hormônio indutor de ovulação não foram utilizadas para a análise estatística.

Grupos Experimentais

Éguas foram acompanhadas a cada 24 horas com exame ultrassonográfico modo-B até ser detectado um folículo com diâmetro ≥ 35 mm (H0) associado a edema uterino de 3 a 4 (GINTHER, 1995). Os 30 ciclos estrais foram distribuídos aleatoriamente em grupo GnRH, hCG e controle (n=10 ciclos/grupo).

Foi administrada 1,5 mg de deslorelina por via intramuscular, 2.500 UI de hCG (Vetecor, Laboratório Calier, São Paulo, Brasil) por via intravenosa e 2 mL de solução

salina (NaCl 0,9%) por via intravenosa nos grupos GnRH, hCG e controle, respectivamente. Os tratamentos foram administrados imediatamente após a H0 em dose única. Os parâmetros dos grupos GnRH, hCG e controle foram avaliados de hora em hora entre os intervalos H0-H12, os mesmos parâmetros foram avaliados a cada seis horas entre H18 até H30. As éguas dos grupos GnRH e hCG foram acompanhadas de hora em hora a partir da H30 até a ovulação e os dados das últimas seis horas foram utilizados.

Éguas do grupo controle foram examinadas, após a H30, utilizando US modo-B a cada quatro horas até a detecção de características indicativas de proximidade da ovulação, como presença de pontos hiperecóticos no fluido folicular, serrilhamento da camada da granulosa, presença de ápice folicular e perda do formato esférico (Revisado por GASTAL; GASTAL, 2011). A partir do aparecimento de uma ou mais características a US Doppler foi realizada de hora em hora até a detecção da ovulação. Os dados das últimas seis horas foram utilizados.

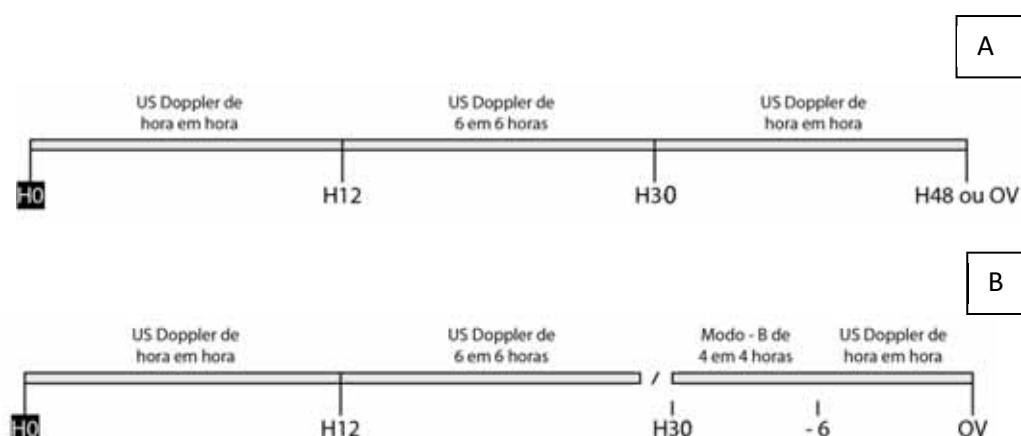


Figura 1: Diagrama representativo dos momentos de coleta de dados nos Grupos hCG, GnRH (A) e controle (B). H0 indica o momento imediatamente antes da realização do tratamento. OV indica o momento da detecção da ovulação.

Exame Ultrassonográfico Doppler

A perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório foi determinada utilizando a US Doppler função *power-flow* com um equipamento ultrassonográfico Doppler (SONOACE PICO, Medison do Brasil Ltda) equipado com transdutor multi-frequencial

(5 a 9 Mhz) linear endocavitário de banda larga (LV5-9CDn, 60mm). As configurações do aparelho foram mantidas constantes durante todo o experimento.

A avaliação subjetiva da PVF foi realizada através do somatório dos pontos coloridos Doppler detectados na parede folicular durante exame contínuo de um minuto utilizando o maior diâmetro folicular, determinando uma nota de 0 a 100% (GASTAL et al., 2006). Outras pesquisas realizadas em éguas (SILVA et al., 2006), vacas (SIDDIQUI; GINTHER, 2014) e mulheres (RAGNI et al., 2007) também utilizaram avaliação subjetiva de PV folicular.

Todos os exames ultrassonográficos foram gravados em um computador portátil equipado com placa de captura de vídeo (Pinnacle Studio 9). Posteriormente, os vídeos foram avaliados e classificados de acordo com o percentual de vascularização (Figura 2).

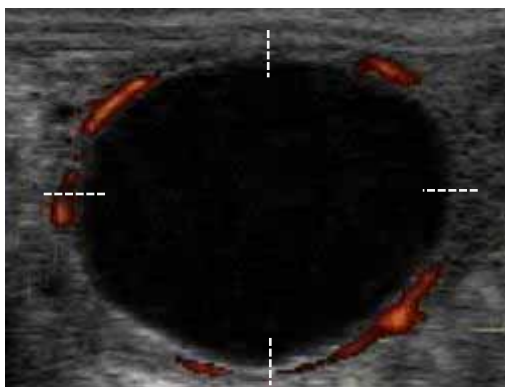


Figura 2: Imagem ultrassonográfica Doppler função *power-flow* de folículo pré-ovulatório de égua. Avaliação subjetiva da perfusão vascular folicular foi realizada levando em consideração o percentual (notas entre 0 e 100%) de extensão de parede folicular com pontos coloridos Doppler.

Concentração plasmática de LH

Para caracterização do perfil plasmático de LH, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados por punção da veia jugular juntamente com todos os exames ultrassonográficos Doppler. As amostras foram centrifugadas (1500g/10 min) para separação do plasma, e armazenadas a -20°C em criotubos até o momento do ensaio.

A concentração de LH foi analisada por meio de Radioimunoensaio (RIA) utilizando duplo anticorpo, gerado em coelhos contra gonadotrofina coriônica equina e

LH ovino radioiodo, previamente validado (THOMPSON et al., 1983). O coeficiente de variação intra- e interensaio foram 3,2% e 7,0%, respectivamente e a sensibilidade foi 0,4 ng/mL.

Análise estatística

Inicialmente, a distribuição das variáveis foi analisada e estatísticas descritivas foram produzidas para construir curvas de variação percentual. Para visualização da normalidade de distribuição dos dados, a avaliação das variáveis respostas foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Somente os valores para concentração de LH não seguiram distribuição normal e foram transformados para escala log para análise.

Análise de Variância (PROC GLM, SAS Institute, 2011) foi utilizada para comparar o tempo médio (horas) de ovulação entre os grupos. Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2011) foram usados para comparar a vascularização (%) e concentração de LH (ng/mL), entre os tratamentos e momentos.

Um termo de interação entre tratamento e momento foi incluído nos modelos para testar a hipótese de que a diferença entre tratamentos foi dependente do momento analisado. Uma estrutura de covariância auto-regressiva foi usada para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro da mesma égua. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas da PVF. O nível de significância estatística foi definido como $P \leq 0,05$ e a tendência estatística entre 0,1 e 0,05. Dados são apresentados como média±E.P.M.

Um modelo de regressão linear (PROC REG, SAS Institute, 2011) foi utilizado para avaliar a concordância das notas de vascularização folicular entre os dois observadores. Houve alta correlação ($r = 0,72$; $P < 0,0001$) entre as notas dos avaliadores entre os momentos e a média entre os dois avaliadores foi utilizada. Foi realizada uma correlação de Pearson para avaliar a correlação entre a vascularização folicular e as concentrações de LH entre os momentos e grupos.

RESULTADOS

O intervalo entre o momento em que foi realizado o tratamento (H0) e o momento da ovulação foi mais longo ($P < 0,0001$) no grupo controle (80,00±3,38 horas) quando comparado aos grupos GnRH e hCG (40,06±1,05 e 37,70±0,47, respectivamente).

Efeito de grupo ($P < 0,05$) foi detectado para perfusão vascular folicular (PVF). Animais do grupo GnRH apresentaram maior PVF média ($40,43 \pm 6,38\%$) quando comparado aos grupos hCG e controle ($35,46 \pm 3,90$ e $30,03 \pm 4,38\%$, respectivamente) desde H0 até o momento da ovulação. Não foi encontrado efeito de momento e efeito de momento dentro dos grupos ($P > 0,05$) (Figura 3).

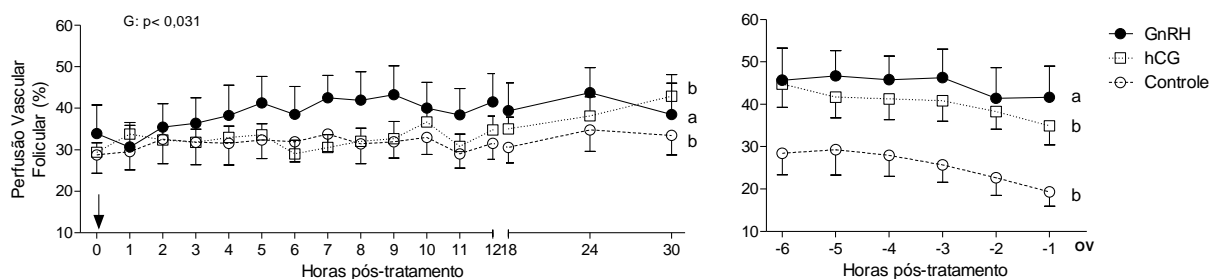


Figura 3. Média±E.P.M para perfusão vascular da parede folicular (%) de éguas tratadas com 1,5 mg de deslorelina, 2.5000 UI hCG ou 2 mL NaCl 0,9% na presença de foliculo ≥ 35 mm associado a edema uterino. Efeito de grupo (G) é mostrado; grupos com letras minúsculas diferentes são diferentes. H0=momento imediatamente anterior ao tratamento. Seta indica momento do tratamento. Seta indica momento do tratamento. OV=momento em que ocorreu a ovulação.

A concentração média de LH entre H1 e H18 foi maior ($P < 0,05$) no grupo GnRH ($11,60 \pm 2,36$ ng/mL) do que nos grupos hCG e controle ($4,09 \pm 0,83$ e $5,82 \pm 1,35$ ng/mL). Em éguas do grupo GnRH, um aumento ($P < 0,001$) na concentração plasmática de LH foi detectado entre a H0 e H1, atingindo valor máximo na H7 ($13,92 \pm 2,61$ ng/mL). Houve uma diminuição numérica ($P > 0,005$) a partir da H10, e uma diminuição ($P = 0,008$) na concentração de LH foi observada a partir da H18.

Nos grupos controle e hCG a concentração plasmática de LH foi constante durante as primeiras 12 horas pós-tratamento. Um aumento na concentração de LH ($P < 0,001$) foi detectado entre H18 e H30 no grupo hCG. Durante as últimas seis horas anteriores à ovulação (H -6 à H -1) a concentração de LH foi mais alta ($P < 0,001$) do que a encontrada na hora anterior ao tratamento (H0) no grupo GnRH e hCG.

As concentrações plasmáticas de LH foram semelhantes entre os grupos GnRH e hCG em todos os momentos, exceto entre a H5 e H12. O perfil de LH foi semelhante entre os grupos GnRH e controle exceto entre H7 e H9. O grupo controle exibiu concentrações de LH semelhantes ao grupo hCG durante todo o experimento (Figura 4).

A correlação entre a PV da parede folicular e as concentrações plasmáticas de LH foi baixa nos grupos GnRH, hCG e controle ($r = +0,29; +0,29, -0,23; P < 0,0001$).

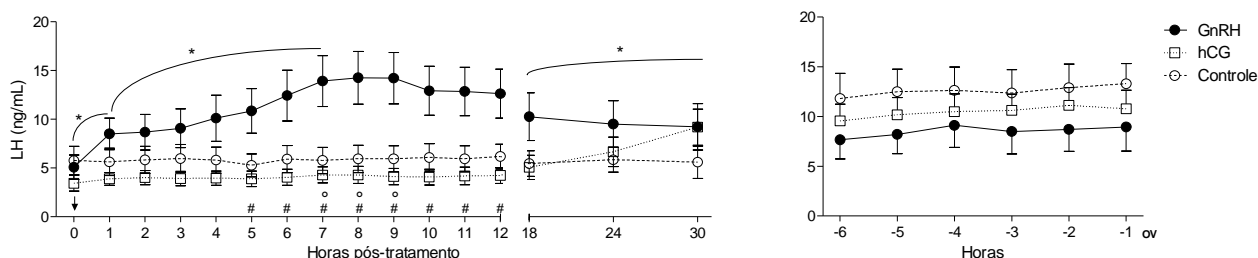


Figura 4. Média±E.P.M para concentração plasmáticas de LH (ng/mL) de éguas tratadas com 1,5 mg de deslorelina, 2.5000 UI hCG ou 2 mL NaCl 0,9% na presença de folículo ≥ 35 mm associado a edema uterino. * indica diferença entre horas dentro do grupo GnRH, # indica diferença entre o grupo GnRH e hCG para cada hora, ° indica diferença entre grupo GnRH e controle para cada momento. H0=momento imediatamente anterior ao tratamento. Seta indica momento do tratamento. OV=momento em que ocorreu a ovulação.

DISCUSSÃO

Éguas dos grupos GnRH e hCG ovularam em $40,06 \pm 1,05$ e $37,70 \pm 0,47$ horas, respectivamente. Semelhante ao que foi relatado na literatura para éguas induzidas com deslorelina $41,4 \pm 9,4$ e hCG $36,0 \pm 2,1$ horas (FERRIS et al., 2011; GASTAL et al., 2006). As éguas do grupo controle apresentaram um intervalo maior entre o início do acompanhamento ultrassonográfico até a ovulação, $80,00 \pm 3,38$ horas, como relatado: $78,4 \pm 6,3$ horas (GASTAL et al., 2006) e $81,2 \pm 6,1$ horas (GINTHER et al., 2009).

Em uma pesquisa a PVF inicial de 65% na H0 apresentou aumento progressivo de até 90% na H36 após tratamento com hCG ou NaCl 0,9%, e diminuição brusca até 40% de PVF na hora imediatamente anterior à ovulação (GASTAL et al., 2006). Ao contrário desta variação da PVF entre momentos não houve variação da PVF após tratamento com deslorelina, hCG ou NaCl 0,9% entre os momentos avaliados. Esta diferença pode ser devido aos menores valores e decorrente menor variação da PVF encontrada no presente estudo, com valor de aproximadamente 30% na H0 e de 20% a 40% na hora imediatamente anterior à ovulação.

Efeito de grupo foi detectado para PVF, sendo maior nas éguas do grupo GnRH. Quando indução com hCG ou análogo de GnRH buserelina foi comparada em vacas a média da PVF entre a hora 0 e hora 24 foi maior nas vacas tratadas com hCG do que nas

tratadas com GnRH (ASLAN et al., 2011). Esta discrepância pode ser decorrente da maior potência da deslorelina quando comparada com a buserelina (CONN; CROWLEY, 1991), o que pode ter ocasionado maior PVF nas éguas induzidas com este análogo de GnRH mais potente.

A PVF do grupo hCG não diferiu do grupo controle durante as horas após tratamento com hCG até a ovulação, assim como já tinha sido reportado na literatura (GASTAL et al., 2006). A concentração média de LH entre H1 e H18 foi maior ($P < 0,05$) no grupo GnRH do que nos grupos hCG e controle. Similarmente, a concentração plasmática de LH na circulação periférica das éguas tratadas com GnRH era de 3 a 4 vezes maior do que de éguas do grupo controle (VELEZ et al., 2012). Estas observações são decorrentes da diferente forma como esses indutores da ovulação agem. A hCG estimula maturação e ovulação em folículos pré-ovulatórios durante o estro por ligação com receptores de LH foliculares, mimetizando a ação do LH endógeno ao produzir um aumento pré-ovulatório exógeno de LH (ADAMS et al., 1986). A deslorelina estimula a liberação endógena de LH e FSH pela parte anterior da hipófise. Portanto, as concentrações plasmáticas de LH endógenas vão aumentar rapidamente quando se utiliza deslorelina, pois esta age sobre o hipotálamo. Quando se utiliza hCG as concentrações plasmáticas de LH endógeno vão permanecer constantes inicialmente, pois esta vai agir como um LH exógeno.

Como esperado, a concentração de LH em éguas controle não aumentou logo após o tratamento, já que concentrações mais altas de LH só vão ocorrer um dia após a ovulação em éguas (FREEDMAN et al., 1979; MUMFORD et al., 1995; JOHNSON et al., 2000; GINTHER et al., 2006).

Nas éguas do grupo GnRH um aumento na concentração plasmática de LH foi detectado após uma hora (H1) atingindo valor máximo na H7. Uso subcutâneo de deslorelina levou a um aumento de LH antes da ovulação entre 12 a 24 horas após tratamento (MUMFORD et al., 1995). Quando deslorelina injetável foi utilizada nove dias após a ovulação de éguas, a concentração de LH atingiu valor máximo quatro horas após tratamento e permaneceu elevada até 12 horas após tratamento, seguido de uma diminuição (KINO et al., 2014). Estes achados corroboram com a existência de um estímulo da deslorelina sobre o LH antes da ovulação, essencial para a ocorrência da ovulação em um menor intervalo de tempo (MUMFORD et al., 1995).

O RIA utilizado não possui reação cruzada com LH exógeno, desta forma as concentrações de LH detectadas permaneceram constantes durante as primeiras 12 horas

no grupo hCG. Um subsequente aumento na concentração de LH foi detectado entre a H18 e H30. Em éguas tratadas com hCG o nível de LH, avaliado com ensaio que não detecta hCG, permaneceu constante até a hora 24 após tratamento quando houve um aumento que continuou até a hora 72 (GINTHER et al., 2009). Este aumento é decorrente da produção endógena de LH no momento em que o folículo atinge maturidade, após a ação inicial do hCG como LH exógeno (EVANS et al., 2007).

Durante as últimas seis horas anteriores à ovulação (H -6 à H -1) a concentração de LH foi mais alta do que a encontrada na hora anterior ao tratamento (H0) no grupo GnRH e hCG (Figura 1). No grupo controle, a concentração de LH foi mais alta ($P < 0,001$) na H -1 quando comparada com a H0. Éguas que não foram tratadas com indutores de ovulação não tiveram a maturação de seus folículos adiantada, portanto logo antes da ovulação as concentrações endógenas de LH estão mais altas já que é esperado um aumento de LH próximo à ovulação (FREEDMAN et al., 1979; MUMFORD et al., 1995; JOHNSON et al., 2000; GINTHER et al., 2006).

Não foi observada uma correlação entre a variação da PVF e as concentrações plasmáticas de LH. Outros estudos apontam para ausência de correlação entre hormônios e PVF. Como o fato de folículos de éguas velhas (>20 anos) tratadas com eLH apresentarem PVF maior do que éguas jovens (entre 4 e 9 anos). Evidência de que não existe uma relação direta entre concentrações de LH e PVF (ALTERMATT et al., 2012), já que éguas velhas possuem menores concentrações de LH quando comparadas com éguas jovens (GINTHER et al., 2008). Similarmente, em vacas tratadas com GnRH, houve um aumento da PVF oito horas antes da ovulação o não foi acompanhado de variação nas concentrações plasmáticas de LH (SIDDIQUI et al., 2010).

Embora alguns estudos apontem para relações entre gonadotrofinas e PVF estas não são suficientes para esclarecer alterações na PVF de folículos pré-ovulatórios. Hormônios, fatores de crescimento e substâncias vasoativas parecem estar inter-relacionados com os mecanismos que levam a alterações na PVF (ACOSTA et al., 2004; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; WATSON; AL-ZI'ABI, 2002; GASTAL et al., 2006; SIDDIQUI et al., 2010). VEGF, fator de crescimento que regula a angiogênese fisiológica do aparelho reprodutivo, não foi expressa em folículo que sofreram atresia em mulheres (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; SUZUKI et al., 1998). Em contrapartida, houve upregulation das isoformas de VEGF em folículos coletados de vacas imediatamente após o pico de LH decorrente de aplicação de GnRH. Após ovulação a VEGF continuou a sofrer upregualtion, indicando que este fator de

crescimento possui um importante papel na ruptura do folículo dominante (BERISHA et al., 2008). Fluido folicular de folículos anovulatórios com 30 mm de diâmetro apresentou menores concentrações de IGF-1, o qual atua no desenvolvimento folicular e VEGF. Estes achados servem para elucidar diferenças de PVF durante as fases da estação reprodutiva, sendo o folículo pré-ovulatório mais irrigado devido a maior número de vasos, vasos de maior tamanho ou vasos mais tortuosos (ACOSTA et al., 2004a). São necessárias mais pesquisas para elucidar o mecanismo de variação de PVF e concentrações plasmática de LH em éguas tratadas com deslorelina, hCG ou NaCl 0,9%.

CONCLUSÃO

A US Doppler não parece ser uma ferramenta capaz de prever com acurácia a capacidade ovulatória de um folículo e o momento da ovulação. Concentrações plasmáticas de LH não são responsáveis pela variação de PVF em éguas sendo necessárias mais pesquisas que apontem quais mecanismos estão envolvidos com alterações da PVF.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o auxílio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Dr. Thompson e a School of Animal Sciences - Louisiana State University Agricultural Center pelo RIA de LH.

REFERÊNCIAS

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

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.

ADAMS, T.E.; HORTON, M.B.; WATSON, J.G.; ADAMS, B.M. Biological activity of luteinizing hormone (LH) during the estrous cycle of mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.3, n.2, p.69-77, 1986.

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

ASLAN, S.; ARSLANBAS, D.; BEINDORFF, N.; BOLLWEIN, H. Effects of induction of ovulation with GnRH or hCG on follicular and luteal blood flow in Holstein–Friesian heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.781–786, 2011.

BOUSFIELD, G.R.; LIU, W.K., SUGINO, H., WARD, D.N. Structural studies on equine glycoprotein hormones: amino acid sequence of equine lutropin β -subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.18, p.8610-8620, 1987.

BRIANT, C.; OTTOGALLI, M.; MOREL, M.; GUILLAUME, D. Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.24, p.305–322, 2003.

CASARINI, L.; LISPI, M.; LONGOBARDI, S.; MILOSA, F.; LA MARCA, A.; TAGLIASACCHI, D.; PIGNATTI, E.; SIMONI, M. LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signaling. **Public Library of Science**, v.7, p.1-15, 2012.

CHAVATTE, P.; PALMER, E. Induction of ovulation in the mare. **Equine Veterinary Education**, v.10, p.26-30, 1998.

CONN, P.M.; CROWLEY, W.F. Review Article: Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. **New England Journal of Medicine**, v.324, p.93-103, 1991.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.105-111, 2011.

FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, R.G.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Efficacy of deslorelin acetate (Sucromate) on induction of ovulation in American Quarter horse mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, n.5, p.1-4, 2011.

FREEDMAN, L.J.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. **Biology of Reproduction**, v.20, p.567-574, 1979.

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

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.; GASTAL, M.O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.239-252, 2011.

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, M.O.; Gastal; E.L.; Spinelli, V; Ginther, O.J. Relationships between body condition and follicle development in mares. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.115-121, 2004.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals, Book 2**. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1995.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: ColorDoppler ultrasonography**. Ed. OJ Ginther, 1. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007. 258p.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.311–317, 2009.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JABOC, J.C.; SIDDIQUI, M.A.R.; 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.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.12, 2004.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.144–150, 2006.

GUPTA, C.; CHAPEKAR, T.; CHHABRA, Y.; SINGH, P.; SINHA, S.; LUTHRA, K. Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells. **The Indian Journal of Medical Research**, v.135, p.331–340, 2012.

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, n.4, p.371-372, 1983.

JOHNSON, A.L. Pulsatile Administration of Gonadotropin- Releasing Hormone Advances Ovulation in Cycling Mares. **Biology of Reproduction**, v.35, p.1123-1130, 1986.

JOHNSON, C.A.; THOMPSON JR, D.L., KULINSKI, K.M., GUITREAU, A.M. Prolonged interovulatory interval and hormonal changes in mares following the use of Ovuplant™ to hasten ovulation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n.5, p.331-336, 2000.

KINO, S.; OSAWA, T.; MIZUNO, S.; WATANABE, G.; TAYA, K.; IZAIKE, Y. Effect of postbreeding intramuscular administration of deslorelin acetate on plasma LH and progesterone concentrations and conception rate in mares. **Journal of Equine Sciences**, v.25, n.1, p. 23–27, 2014.

KÖLLING, M; ALLEN W.R. Ovulation induction for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue, In: Proceedings of a Workshop, Havemeyer Foundation Monograph Series No. 18, **International Equine Gamete Group**; p.54-55, 2005.

MCCUE, P.M.; MAGEE, C.; GEE, E.K. Comparison of compounded deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.2, p.58-61, 2007.

MIYAMOTO, A; SHIRASUNA, K; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.1, p.153-160, 2006.

MUMFORD, E.L; SQUIRES, E.L.; JÖCHLEB, E.; HARRISON, L.A.; NETT, T.M.; TRIGG, T.E. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.129-140, 1995.

PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P.; VERDONCK, E. Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.182–185, 2006.

PIERSON, H.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v.24, n.3, p. 359-368, 1985.

RAGNI, G.; ANSELMINO, M.; NICOLOSI, A.E.; BRAMBILLA, M.E.; CALANNA, G.; SOMIGLIANA, E. Follicular vascularity is not predictive of pregnancy outcome in mild controlled ovarian stimulation and IUI cycles. **Human Reproduction**, v.22, n.1, p.210–214, 2007.

SAS Institute. 2011. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SIDDIQUI, M.A.R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O.J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.287–292, 2009.

SIDDIQUI, M.A.R.; FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; COOPER, D.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers, **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1110–1117, 2010.

SIDDIQUI, M.A.R.; GINTHER, O.J. Switching of largest follicle from dominant to subordinate status when follicle and CL are in same ovary in heifers. **Theriogenology**, v.82, n.2, p.259–265, 2014.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares, **Animal Reproduction**, v.3, n.3, p.339-346, 2006.

SQUIRES, E.L. Hormonal manipulation of the mare: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.627-634, 2008.

THOMPSON J.R.; D.L.; GODKE, R.A.; SQUIRES, E.L. Testosterone effects on mares during synchronization with altrenogest: FSH, LH, estrous duration and pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, v.56, n.3, p.678–686, 1983.

VELEZ, I.C.; PACK, J.D.; PORTER, M.B.; SHARP, D.C.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Secretion of luteinizing hormone into pituitary venous effluent of the follicular and luteal phase mare: novel acceleration of episodic release during constant infusion of gonadotropin-releasing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v.42, p.121–128, 2012.

WATSON, E.D.; AL-ZI'ABI, M.O. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. **Reproduction**, v.124, p.227–234, 2002.

WILSON, C. G.; DOWNIE, C.R.; HUGHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.10, n.4, p.301-308, 1990.

ANEXOS Normas editoriais para publicação na Journal of Equine Veterinary Sciences

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Journal of Equine Veterinary Science.

Conflict of Interest

Any conflicts of interest must be disclosed at the end of the submitted manuscript under the subheading 'Conflict of interest statement'. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also External link <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: External link http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see External link <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see External link <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult External link <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult External link <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see External link <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is

determined by the author's choice of user license (see External link <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see External link <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see External link <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit External link <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (External link <http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, External link <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is \$2,500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: External link <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via External link <http://ees.elsevier.com/jevs>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of up to 5 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so. The Editors retain the right to choose reviewers as deemed appropriate. All submissions will be reviewed by at least two anonymous reviewers to evaluate them for originality, clear statement of a hypothesis, appropriate experimental design, completeness of methods, a logical and comprehensive discussion, and conclusions that are supported by data.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: External link <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See External link <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Formulae

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.

Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the

resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (External link <http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Papa FO, Melo CM, Monteiro GA, Papa PM, Guasti PN, Maziero RRD, et al. Equine perineal and vulvar conformation correction using a modification of Pouret's technique. *J Equine Vet Sci* 2014;34:459–64.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also External link http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: External link <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their

own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at External link <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: External link <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at External link
<http://support.elsevier.com>.