

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

**INFLUÊNCIA DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA
SOBRE A HEMODINÂMICA DE FOLÍCULOS PRÉ-
OVULATÓRIOS E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM ÉGUAS**

RAFAEL MIDE ROMANO

**BOTUCATU – SP
Agosto 2013**

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

**INFLUÊNCIA DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA
SOBRE A HEMODINÂMICA DE FOLÍCULOS PRÉ-
OVULATÓRIOS E DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM ÉGUAS**

RAFAEL MIDE ROMANO

**Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira

**BOTUCATU – SP
Agosto 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Romano, Rafael Mide.

Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas / Rafael Mide Romano. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira

Capes: 50504002

1. Égua - Reprodução. 2. Ovulação. 3. Corpo lúteo. 4. Doppler, Ultra-sonografia.

Palavras-chave: Corpo lúteo; Éguas; Perfusão vascular; Ultrassonografia Doppler; hCG.

Nome do Autor: Rafael Mide Romano

**Título: INFLUÊNCIA DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA SOBRE
A HEMODINÂMICA DE FOLÍCULOS PRÉ-OVULATÓRIOS E
DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM ÉGUAS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros

Membro

Departamento de Reprodução Animal

UENP - Campus Luiz Meneghel

Data da Defesa: 14 de Agosto de 2013.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Meira, que abriu as portas e me aceitou nessa jornada. Confiou em mim, e me proporcionou a oportunidade de evoluir pessoal e profissionalmente, com seus ensinamentos.

Aos meus pais, pela dedicação, amor, paciência e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, apesar da distância.

À minha irmã, Aline Mide Romano de Barros, que compartilhou as dificuldades, me orientou e apoiou.

Aos meus sobrinhos Júlia e Lucas, que sempre me fazem sorrir!

À minha noiva, Thais Lisboa Machado, que esteve comigo e compartilhou incansavelmente cada momento desta jornada. Com muito amor, compreendeu a minha ausência e me apoiou em todas as decisões.

À Liliane, Tatiana e Leila que me motivaram a seguir em frente.

Ao Jair, que desde o estágio curricular me encorajou a realizar esse sonho. Por contribuir com o desenvolvimento do projeto de mestrado, e sempre me ajudar nas redações.

À Heloisa, pelo companheirismo, por dividir comigo as dificuldades e ter se dedicado ao meu projeto como se fosse o seu. Acima de tudo, por ter se tornado uma grande amiga, que espero levar por toda vida.

À Fernanda e Luiz Fernando, por estarem presentes durante esse tempo, nas longas horas e horas de trabalho e boas conversas no posto de monta.

À Yatta, Elisa e Alexandre, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e colegas pós-graduandos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Sony Dimas Bicudo por contribuir na minha formação e pelas boas conversas que tivemos. À Prof. Eunice Oba pela imensa ajuda nas dosagens hormonais. Ao Prof. José Pantoja pelo importante conhecimento e ajuda nas análises estatísticas.

Ao Prof. João, ao Prof. Francisco e ao Prof. Thales por aceitarem o convite como membros da Banca, pela disposição e, acima de tudo, por fazerem parte deste momento tão importante para mim.

Aos estagiários e aos funcionários da FMVZ, pela imensa ajuda durante o experimento e boas horas que passamos juntos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro neste projeto e na bolsa de estudo, processo número 2011/04744-9.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram e contribuíram, para realização deste grande sonho, o meu sincero muito obrigado!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagem ultrassonográfica Doppler - modo espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O cursor Doppler (amarelo) está posicionado sobre o lúmen do vaso sanguíneo para obtenção de um gráfico espectral. A velocidade do pico sistólico (PSV) e velocidade diastólica final (EDV) representam a velocidade máxima e velocidade final de um ciclo cardíaco, respectivamente. Fonte: Ferreira et al. (2011)..... 4
- Figura 2.** Imagens ultrassonográficas Doppler, função *Power-flow* (A) e *Color-flow* (B), de um corpo lúteo equino maduro. Os pontos coloridos em ambas às imagens representam a área de fluxo sanguíneo luteal. Fonte: arquivo pessoal..... 6
- Figura 3.** Média ($\pm$ e.p.m), para o PI das artérias ovarianas ipsi (●) e contralateral (○) ao folículo dominante ou CL, durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas (D0 = dia da ovulação) Fonte: Bollwein et al. (2002a)..... 8
- Figura 4.** Média ($\pm$ e.p.m) para o diâmetro (a) e área de fluxo sanguíneo (b) da parede dos três maiores folículos (F1, F2, F3) em casos de simples dominância folicular. O asterisco, na imagem “a”, indica o início do desvio entre F1 e F2, baseado na diferença entre as taxas de crescimento folicular ($P < 0,05$). E na imagem “b” indica aumento significativo da área de fluxo sanguíneo folicular. Fonte: Acosta et al (2004a)..... 10
- Figura 5.** Média ($\pm$ e.p.m) para o diâmetro folicular (mm) e área de fluxo sanguíneo da parede de folículos dominantes ovulatórios (>30 mm) e anovulatório. Asterisco indica diferença estatística entre grupos dentro de cada momento ($P < 0,05$). Fonte: Acosta et al. (2004b)..... 10
- Figura 6.** Sequência de imagens ultrassonográficas modo *color-Doppler*, função *Color-flow*, de folículos pré-ovulatórios de éguas com ovulação espontânea, ilustrando a PV da parede folicular 36, 38, 44 e 60 horas (A, B, C, e D, respectivamente), após o folículo atingir 35 mm de diâmetro (H0), e 3 horas antes da ovulação (E). A ovulação foi detectada 84 horas após H0. A seta na imagem (E) indica a banda anecóica. Fonte: Gastal et al. (2006)..... 11
- Figura 7.** Média ($\pm$ e.p.m) para área luteal, área de fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas. Asteriscos indicam aumento ou decréscimo significativo ($P < 0,05$) dentro de cada momento. Dia 0 = dia da ovulação. Fonte: Ginther et al. (2007)..... 15

- Figura 8.** Imagens ultrassonográficas Doppler, função *Power-flow*, de folículos pré-ovulatórios e os respectivos corpos lúteos oito dias pós-ovulação, em éguas. A perfusão vascular folicular e luteal foram estimadas de acordo com a extensão de tecido (parede folicular ou tecido luteal) com sinais Doppler, durante exame contínuo e em tempo real. Folículos com alta (A) e baixa (C) vascularidade, deram origem a CLs funcionais e com elevada perfusão sanguínea e adequada produção de P4 (B e D)..... 17
- Figura 9.** Imagens ultrassonográficas modo Doppler colorido, função *Power-flow*, de um folículo pré-ovulatório equino. A sequência de imagens representa o método de avaliação subjetivo da PV, pela soma da distribuição dos pontos coloridos Doppler, ao longo da parede folicular. Esta avaliação foi realizada em um exame contínuo de no mínimo um minuto..... 24
- Figura 10.** Imagem ultrassonográfica modo-B de um CL equino com cavidade. A linha vermelha representa a delimitação externa da área luteinizada e a linha verde representa o limite externo da cavidade luteal. O espaço entre as duas linhas foi considerado a área luteinizada. Fonte: arquivo pessoal..... 25
- Figura 11.** Imagem ultrassonográfica de um CL equino, em modo-B e modo-Doppler colorido, função *power-flow* (B). A linha vermelha continua, na figura A, delimita a área luteal, e as linhas tracejadas são utilizadas para mensuração do volume. Na imagem B os pontos coloridos Doppler representam a perfusão vascular luteal. Fonte: Arquivo pessoal..... 25
- Figura 12.** Imagens ultrassonográficas Doppler, função *Power-flow*, de um corpo lúteo equino (A) e sua respectiva imagem extraída, em formato TIFF, que representa a área de pontos coloridos (B). O histograma com valores da contagem de pixels coloridos e intensidade foi gerado pelo programa Image J 1.31v (C). A análise do número total de pixels e intensidade total dos pixels, para obtenção da área luteal vascularizada (mm^2), foi realizada utilizando-se o programa Microsoft Excel 2010 (D). Fonte: arquivo pessoal..... 27
- Figura 13.** Distribuição das ovulações (%) ao longo do tempo (horas) de éguas tratadas com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCl 0,9% (grupo controle), na presença de um folículo $\geq 35\text{mm}$ de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo; H0=momento imediatamente antes do tratamento)..... 30

- Figura 14.** Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular folicular (%) durante 12 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCL 0,9% (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro (n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$)..... 31
- Figura 15.** Média ($\pm$ e.p.m) para variação relativa (%) da perfusão vascular folicular durante 12 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCL 0,9% (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro (n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$)..... 32
- Figura 16.** Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular folicular (%) durante 36 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCL 0,9% (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro (n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$)..... 33
- Figura 17.** Média ($\pm$ e.p.m) para variação relativa (%) da perfusão vascular folicular durante 36 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCL 0,9%, (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro (n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$)..... 34
- Figura 18.** Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular folicular (%) durante 24 horas prévias a ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG, na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro (n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$)..... 34
- Figura 19.** Média ($\pm$ e.p.m) para área (mm^2) e volume luteal (mm^3), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, éguas sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e momento ($P>0,1$)..... 35
- Figura 20.** Média ($\pm$ e.p.m) para área (mm^2) e volume luteal (mm^3), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com hCG (n=18 éguas/grupo) em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle, n=6). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$)..... 36

- Figura 21.** Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular luteal subjetiva (%), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, éguas sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$).. 37
- Figura 22.** Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular luteal subjetiva (%), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas hCG (n=18 éguas/grupo), em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle). Valores P para efeito de grupo (G), momento (M) e a interação grupo-momento (GM) estão expressos no gráfico. Símbolos (*, #) indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao momento anterior.... 38
- Figura 23.** Imagens da perfusão vascular luteal durante oito dias pós-ovulação (D0 a D8), obtidas por meio da ultrassonografia Doppler, função *Power-flow*. A classificação subjetiva da perfusão vascular (%) foi determinada de acordo com a extensão (0-100%) de tecido luteal com pontos coloridos em relação à área luteinizada. Fonte: arquivo pessoal..... 39
- Figura 24.** Média ($\pm$ e.p.m) para número de pixels coloridos, durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$)..... 40
- Figura 25.** Média ($\pm$ e.p.m) para área luteal vascularizada (mm^2), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$)..... 41
- Figura 26.** Média ($\pm$ e.p.m) para intensidade total dos pixels, durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$)..... 42

- Figura 27.** Média ($\pm$ e.p.m) para número de pixels coloridos, área luteal vascularizada (mm^2) e intensidade, durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas hCG (n=18 éguas/grupo) em distintos momentos do ciclo estral, e sem tratamento (Grupo controle). Valores P para efeito de grupo (G), momento (M) e a interação grupo-momento (GM) estão expressos no gráfico. Símbolos (* e #) indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao momento anterior..... 43
- Figura 28.** Média ($\pm$ e.p.m) para concentração plasmática de progesterona (ng/mL), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, éguas sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$)..... 44
- Figura 29.** Média ($\pm$ e.p.m) para concentração plasmática de progesterona (ng/mL), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com hCG (n=18 éguas/grupo), ou NaCL 0,9%, (Grupo controle), em distintos momentos do ciclo estral. Valores P para efeito de grupo (G), momento (D) e a interação grupo-momento (GM) estão expressos no gráfico. Símbolos (* e #) indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao momento anterior..... 45
- Figura 30.** Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular luteal (%) e concentração plasmática de progesterona (ng/mL) de éguas durante oito dias após ovulação (n=60 ciclos)..... 46

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. PRINCÍPIOS E A TÉCNICA DA ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER.....	3
2.2. ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER APLICADA À FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DA ÉGUA	6
2.2.1. PERFUSÃO VASCULAR DO FOLÍCULO DOMINANTE	9
2.2.2. LUTEOGÊNESE: RELAÇÕES COM A PERFUSÃO VASCULAR	14
2.2.3. INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS E A PERFUSÃO VASCULAR DO TRATO REPRODUTIVO	18
2. HIPÓTESES.....	20
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. ANIMAIS	21
4.2. DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	21
4.2. ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E DOPPLER.....	23
4.3. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA	27
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	63
9.1 Trabalho enviado para a revista “Livestock Science”.	63
9.2. Normas da Revista “Livestock Science”.	81

ROMANO, R. M. **Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas**. Botucatu, 2013. 101p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Nos últimos anos a gonadotrofina coriônica humana (hCG), por sua ação biológica semelhante ao hormônio luteinizante (LH), tem sido estudada não apenas como indutor da ovulação, mas também como agente luteotrófico. A ultrassonografia (US) Doppler, quando utilizada para análise ovariana, permite a avaliação hemodinâmica folicular e luteal, fornecendo importantes informações funcionais destas estruturas. Os objetivos deste estudo foram descrever as alterações hemodinâmicas de folículos pré-ovulatórios e, caracterizar o desenvolvimento estrutural e funcional do corpo lúteo (CL) de éguas tratadas com distintas doses de hCG, em diferentes momentos do ciclo estral. No experimento 1, éguas receberam 750, 1500, 2500 UI hCG ou NaCl 0,9%, por via intravenosa, na detecção de folículo pré-ovulatório ≥ 35 mm. A perfusão vascular (PV) folicular foi avaliada, por meio da US Doppler, a cada hora durante 12 primeiras horas pós-tratamento, e posteriormente, a cada 6 horas até ovulação. No experimento 2, foram utilizadas 750, 1500, 2500 UI hCG, para induzir ovulação, no dia da ovulação (D0) ou dois dias pós-ovulação (D2). A área, volume, PV luteal e concentração plasmática de progesterona (P4), foram avaliadas diariamente entre D0 e D8. Não foi detectado efeito da dose, do tratamento e tempo para PV folicular. No experimento 2, para todas as variáveis, não observou-se efeito da dose e tratamento, no entanto, ao longo dos dias, houve diferença significativa, exceto para área e volume luteal. A hCG, para induzir ovulação, não alterou a PV folicular pós-tratamento. Quando utilizada para induzir a ovulação, no D0, ou D2, não influenciou o desenvolvimento estrutural e funcional luteal, independente da dose.

Palavras-chave: Ultrassonografia Doppler; hCG; perfusão vascular, corpo lúteo, éguas.

ROMANO, R. M. **Influence of hCG on the pre-ovulatory follicle hemodynamic and luteal development in mares.** Botucatu, 2013. 101p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In recent years the hCG, because of its biological LH-like action, has been studied not only to induce ovulation, but also as luteotrophic agent. Doppler ultrasonography is a technique that allows the hemodynamic evaluation of follicular and luteal tissue, in real time, providing important functional information about these structures. This study aimed to describe the hemodynamics changes of pre-ovulatory follicles and characterize the structural and functional development of the corpus luteum of mares treated with different doses of hCG, at different times of estrous cycle. In experiment 1, mares were treated with 750, 1500, 2500 IU of hCG or NaCl 0.9%, intravenously, on presence of pre-ovulatory follicle ≥ 35 mm. Doppler US exams, to evaluate the follicle vascular perfusion, were done every hour during first 12 hours post-treatment. Thereafter, it was done every 6 hours until ovulation. In experiment 2, treatment was performed with 750, 1500 or 2500 IU of hCG to induce ovulation, on the day of ovulation or two days post-ovulation. The luteal area, volume and vascular perfusion, and plasma progesterone concentration were evaluated daily from D0 to D8. No effect of dose and time was detected for follicle vascular perfusion. In experiment 2, there was no effect of dose and moment of treatment for all end points. Throughout the day, all end points presented significant difference, except the luteal area and volume. The hCG-treatment, to induce ovulation, did not increase follicle vascular perfusion post-treatment. hCG administered on the presence of follicle ≥ 35 mm, on D0 or on D2, had no positive influence on structural and functional development of corpus luteum, independent of dose.

Keywords: Doppler ultrasonography, blood flow, follicle, corpus luteum, mare.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país referência na pesquisa e utilização de biotecnologias aplicadas à reprodução equina, e possui uma posição de destaque em técnicas como transferência de embriões. Em 2010, foram realizadas 27.497 transferências no mundo. Destas, o Brasil foi responsável por 43%, ocupando o primeiro lugar em número de embriões transferidos (STROUD & CALLESEN, 2012). Atualmente, a prática a campo da reprodução equina abrange o uso de inúmeras biotecnologias que possibilitam melhores índices reprodutivos e, conseqüentemente, melhor eficiência reprodutiva. Contudo, para manter-se competitivo no mercado, a incorporação de novas biotecnologias se faz necessária, a fim de fornecer novas informações que possibilitem melhorar o desempenho reprodutivo frente a diferentes situações e adversidades encontradas a campo.

A partir dos anos 80, a utilização da ultrassonografia (US) modo-B para avaliação do trato reprodutivo resultou em grande avanço na prática da reprodução equina, gerando informações extremamente importantes, tanto do ponto de vista fisiológico quanto aplicado. Atualmente, a US Doppler tem sido estudada em diversas pesquisas relacionadas à fisiologia e biotecnologia da reprodução animal. Esta técnica possibilita avaliações morfológicas e funcionais das estruturas avaliadas e tem sido utilizada na medicina humana e ciências biomédicas há mais de quatro décadas. Entretanto, embora seja considerada uma das melhores técnicas para o estudo *in vivo* da hemodinâmica do trato reprodutivo de éguas (GINTHER et al., 2007), sua utilização na reprodução de grandes animais ainda encontra-se em fase inicial (SILVA, 2010).

O estudo da perfusão vascular (PV) dos órgãos e estruturas do trato reprodutivo de éguas pode ser realizada por meio da US Doppler por via transretal. A hemodinâmica ovariana e de suas estruturas pode ser avaliada por meio da análise das artérias ovarianas e pedículo ovariano, assim como vasos sanguíneos localizados na parede folicular e tecido luteal (BOLLWEIN et al., 2002a; BOLLWEIN et al., 2002b; GINTHER et al., 2007). Já a análise uterina pode ser realizada por meio das artérias uterinas (BOLLWEIN et al.,

1998; BOLLWEIN et al., 2003) ou vasos de pequeno calibre presentes no miométrio, mesométrio e endométrio (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2010).

Diversos estudos descreveram relações entre alterações hemodinâmicas das estruturas ovarianas, proporcionando uma nova percepção dos fenômenos fisiológicos que ocorrem durante o ciclo estral de éguas, e fornecendo informações extremamente relevantes do ponto de vista aplicado à reprodução animal (BOLLWEIN et al., 2002; SILVA et al., 2006; GASTAL et al., 2006; GINTHER et al., 2007).

Além de descreverem o padrão fisiológico da PV do trato reprodutivo ao longo do ciclo estral em éguas, as pesquisas atuais objetivam estudar novas alternativas para intervir na perfusão sanguínea uterina e ovariana na tentativa de alcançar melhores índices reprodutivos.

Na espécie bovina, a utilização de fármacos como a hCG ou análogos do GnRH, no estro ou diestro, apresentaram efeito positivo sobre a luteogênese, produção de progesterona (P4) e fertilidade (RAJAMAHENDRAN & SIANANGAMA, 1992; SANTOS et al., 2001; RENSIS et al., 2008; BENDORFF et al., 2009; RIZOS et al., 2012). Na espécie equina, diversas pesquisas foram realizadas utilizando-se fármacos como captopril, ácido acetilsalicílico, estrógeno (E2), P4, hCG e deslorelina (análogo sintético do GnRH), para intervir na hemodinâmica das estruturas do trato reprodutivo. Contudo, os resultados descritos na literatura, especialmente relacionados à hCG, ainda são conflitantes (KELLY et al., 1988; FLEURY et al., 2007; URQUIETA et al., 2009; MCCUE et al., 2011). Tal fato abre portas para novas pesquisas em busca de informações sobre os eventos ainda não completamente elucidados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRINCÍPIOS E A TÉCNICA DA ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

A US Doppler possibilita a coleta de informações sobre o fluxo sanguíneo de órgãos, tecidos ou diretamente de vasos sanguíneos específicos, adicionando informações morfofuncionais importantes sobre a estrutura avaliada (GINTHER, 2007; SILVA, 2010). Desta maneira, esta tecnologia tem sido aplicada para avaliação do trato reprodutivo de grandes animais, pois permite a realização de um exame em tempo real e de maneira não invasiva da perfusão sanguínea uterina e ovariana (BOLWEIN et al., 2003; GINTHER et al., 2007).

A US Doppler é fundamentada no efeito Doppler, que é baseado nas alterações da frequência de ondas emitidas por um objeto em relação a um referencial estático. Quando se trata de um som audível, o efeito Doppler é um fenômeno natural observado em nosso cotidiano, como por exemplo, o som da buzina de um carro movimentando-se em relação a uma pessoa parada. O efeito Doppler é baseado na frequência Doppler, que na US é representada pela diferença entre a frequência de ecos recebidos e ecos emitidos pelo transdutor. Quando se utiliza a US Doppler para avaliação dos vasos sanguíneos, o referencial estático é o transdutor, e o objeto em movimento, que irá gerar a diferença entre a frequência de ecos emitidos e recebidos, são as hemácias (GINTHER & UTT, 2004).

Esta técnica apresenta dois diferentes modos de ação, que podem ser escolhidos de acordo com a área alvo de interesse: o modo Doppler-espectral e o modo Doppler-colorido. O modo Doppler-espectral é utilizado para avaliação das velocidades, da pulsatilidade e resistência do fluxo sanguíneo, de uma artéria específica. Nesta análise é necessário posicionar o cursor inteiramente sobre o lúmen do vaso sanguíneo, para a mensuração das velocidades e produção de um gráfico espectral. As alterações de frequência e amplitude do fluxo sanguíneo são exibidas em forma de ondas, e cada onda representa um ciclo cardíaco (Figura 1; GINTHER & UTT, 2004).

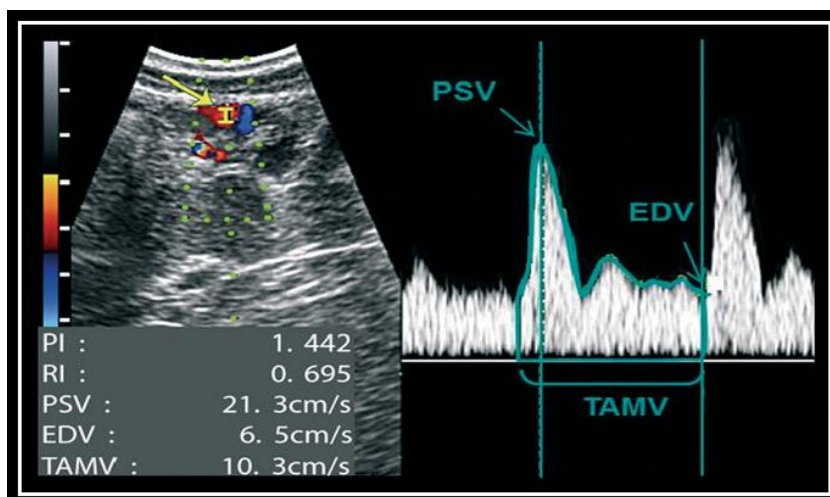


Figura 1. Imagem ultrassonográfica Doppler - modo espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O cursor Doppler (amarelo) está posicionado sobre o lúmen do vaso sanguíneo para obtenção de um gráfico espectral. A velocidade do pico sistólico (PSV) e velocidade diastólica final (EDV) representam a velocidade máxima e velocidade final de um ciclo cardíaco, respectivamente. Fonte: Ferreira et al. (2011).

O ponto mais elevado no traçado do gráfico gerado no modo espectral-Doppler representa a velocidade máxima do fluxo sanguíneo no pico sistólico (PSV), enquanto o ponto mais baixo, anterior ao início do próximo ciclo cardíaco, representa a velocidade do fluxo sanguíneo no pico diastólico final (EDV). A velocidade máxima média (TAMV) é gerada pelo cálculo da média de todas as velocidades máximas dividida pelo tempo de duração do ciclo (GINTHER, 2007).

A angulação entre a intersecção dos ecos emitidos pelo transdutor com o movimento das células sanguíneas é denominada ângulo Doppler ou ângulo de insonação. Este ângulo deve estar entre 30° e 60° graus para produzir um gráfico espectral com valores das velocidades do fluxo sanguíneo confiáveis, durante o exame Doppler-espectral (GINTHER & UTT, 2004). Entretanto, a determinação do ângulo Doppler em vasos uterinos e ovarianos de pequeno calibre é difícil por apresentarem grande tortuosidade (SILVA et al., 2006; FERREIRA et al., 2011).

Os índices Doppler são uma alternativa para minimizar os erros de mensuração das velocidades do fluxo sanguíneo, por não dependerem do ângulo de insonação (GINTHER & UTT, 2004). Os índices de resistência (RI) e

pulsatilidade (PI) são gerados pelas equações $[(PSV-EDV)/PSV]$ e $[(PSV-EDV)/TAMV]$, respectivamente, e são especialmente úteis em mensurações de fluxo sanguíneo de vasos de pequeno calibre e tortuosos, que não permitem a estimação dos valores reais do fluxo sanguíneo (SILVA, 2010). Estes índices expressam a relação entre a extensão da resistência (RI) e extensão da PV (PI), e apresentam uma relação inversamente proporcional com a PV (ACOSTA et al., 2004a; GINTHER & UTT, 2004).

O modo Doppler-colorido é utilizado para análise de estruturas ou órgão como um todo, permitindo uma avaliação geral da perfusão sanguínea (SILVA, 2010). A área de fluxo sanguíneo é exibida em pontos coloridos sobrepostos em uma imagem ultrassonográfica em modo-B, em campo total de visão ou em uma área delimitada pelo operador (box). Este modo apresenta duas funções: a *Color-flow* e *Power-flow* (GINTHER, 2007).

A função *Color-flow* representa a PV da estrutura em duas cores: azul e vermelha, baseada no sentido do movimento em relação ao transdutor. As hemácias que se afastam ou se aproximam do transdutor são expressas nas cores azul e vermelha, respectivamente. A tonalidade da cor indica a velocidade do fluxo, sendo que tons claros representam maior velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER & UTT, 2004).

A função *Power-flow*, que devido à maior sensibilidade, permite uma avaliação mais precisa de vasos sanguíneos com menor diâmetro ou baixo fluxo de sangue, que muitas vezes não são perceptíveis na função *Color-flow*. As imagens do fluxo sanguíneo são exibidas em escala de uma cor ou mais cores e, a intensidade da cor varia de acordo com a velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007; Figura 2).

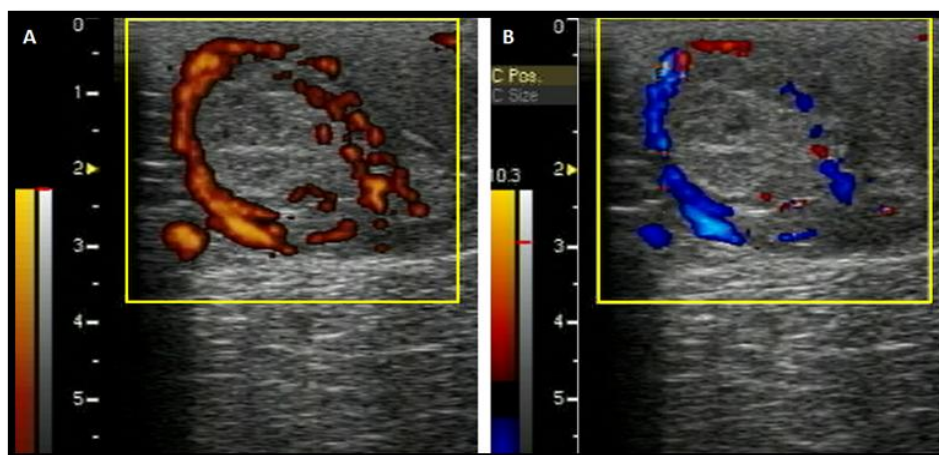


Figura 2. Imagens ultrassonográficas Doppler, função *Power-flow* (A) e *Color-flow* (B), de um corpo lúteo equino maduro. Os pontos coloridos em ambas às imagens representam a área de fluxo sanguíneo luteal. Fonte: arquivo pessoal

2.2. ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER APLICADA À FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DA ÉGUA

As éguas são poliéstricas sazonais e apresentam ciclos estrais e ovulações normalmente em períodos do ano correspondentes à maior incidência de luminosidade ambiental (GINTHER, 1992).

O ciclo estral da égua é definido como intervalo interovulatório, com duração de aproximadamente 21 a 22 dias, e pode ser dividido em duas fases: estro e diestro. A fase de estro, que dura entre 4 a 8 dias, é caracterizada pela predominância de estrógeno e pelo crescimento de um ou mais folículos dominantes, em éguas com uma onda de crescimento folicular, resultando no comportamento de receptividade ao macho. Já o diestro, com duração média de 14 dias, se inicia após a ovulação com a formação do CL, responsável pela secreção de P4, resultando no fim dos sinais comportamentais do estro. O comprimento do diestro é regulado pela vida útil do CL e, indiretamente, pela ação da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Este hormônio é sintetizado pelo endométrio entre o 13º e 16º dia pós-ovulação, sob estímulo da ocitocina, quando não há o reconhecimento materno-fetal da gestação. Em decorrência à secreção de $PGF_{2\alpha}$, inicia-se um processo denominado luteólise, caracterizado pela regressão funcional do CL, demonstrado por uma queda brusca da concentração plasmática de P4, dando início a um novo ciclo estral (MCKINNON et al., 2011).

Uma relação harmônica entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é imprescindível para o funcionamento fisiológico do sistema reprodutivo. O hipotálamo é responsável pela síntese e secreção de hormônios peptídicos, sendo o GnRH, o principal hormônio relacionado ao sistema reprodutivo. Este hormônio, por meio do sistema porta-hipotálamo-hipofisário, apresenta ação direta sobre a hipófise, glândula esta responsável pela síntese e liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). A síntese e ação destas gonadotrofinas estão diretamente relacionadas com a dinâmica folicular (GINTHER, 1992).

Os ovários exercem função primordial nos processos reprodutivos e apresentam eventos dinâmicos e fenômenos cíclicos como emergência de ondas foliculares, crescimento folicular comum, divergência e dominância folicular, ovulação, luteogênese e luteólise. Desta maneira, pesquisas têm sido realizadas com objetivo de estudar as alterações que ocorrem durante o ciclo estral, dentre elas as hemodinâmicas, e correlacioná-las com as alterações morfofuncionais das estruturas ovarianas (SILVA, 2010).

O crescimento folicular ocorre em forma de ondas, as quais são definidas como vários folículos que emergem e iniciam o crescimento em sincronia, sob ação da liberação de FSH (GINTHER, 1992). Após a emergência de uma onda folicular inicia-se a fase de crescimento folicular comum, na qual todos os folículos apresentam taxa de crescimento semelhante, de aproximadamente três mm por dia, sendo o FSH o principal hormônio responsável. Esta fase termina após seis dias, em média, quando o maior folículo atinge cerca de 22,5 mm de diâmetro, e ocorre a divergência folicular, culminando com a determinação da dominância folicular (GINTHER et al., 2004).

A fase de divergência folicular é caracterizada pelo desenvolvimento do futuro folículo dominante e regressão dos folículos subordinados, com base no diâmetro folicular (GINTHER et al., 2004). A partir desta fase, o principal hormônio responsável pelo crescimento e maturação folicular passa a ser o LH (GASTAL et al., 1999). Esta gonadotrofina não está envolvida no início do processo de desvio folicular, mas é necessária para o contínuo crescimento do folículo dominante até a ovulação (FORTUNE et al., 2001; GINTHER et al., 2000). Adicionalmente, Evans et al. (1997) relataram que o LH está mais

relacionado com o processo de maturação folicular e oocitária do que com o crescimento folicular. A maturação do folículo pré-ovulatório ocorre, inicialmente, pela combinação das ações do FSH, E2, IGF-1 e, posteriormente, sob a ação do LH, que também é essencial para o processo de ovulação e luteinização (RICHARDS et al., 2002).

A caracterização da PV ovariana durante ciclo estral de éguas foi realizada por Bollwein et al. (2002b), baseado nos valores de PI, obtidos por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler modo-espectral da artéria ovariana. Neste estudo observou-se que durante a fase de diestro, os ovários que possuíam o CL, apresentaram maior fluxo sanguíneo, enquanto no estro não foi observada diferença entre o fluxo sanguíneo ovariano os ovários.

Entre D0 e D2 os valores de PI da artéria ovariana ipsilateral ao CL apresentam-se altos (BOLLWEIN et al., 2002a). Período este correspondente à formação do corpo hemorrágico e a um processo de vascularização ainda incompleto, por meio da análise histopatológica (ALZIABI et al., 2003). Após este período, ocorre um decréscimo dos valores do PI até D6, representando o aumento na perfusão sanguínea ovariana. A partir de então, os valores de PI aumentam lentamente durante a fase progesterônica intermediária, apresentando valores máximos no D15 (Figura 3; BOLLWEIN et al., 2002a).

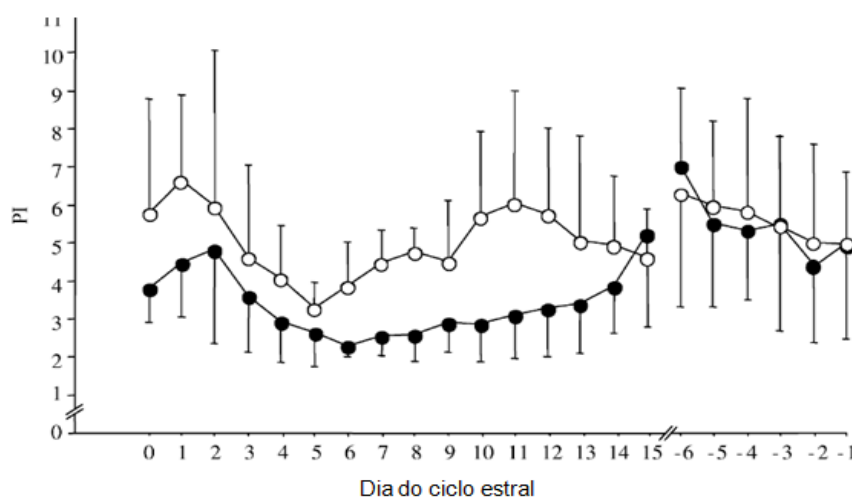


Figura 3. Média ($\pm$ e.p.m), para o PI das artérias ovarianas ipsi (●) e contralateral (○) ao folículo dominante ou CL, durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas (D0=dia da ovulação) Fonte: Bollwein et al, (2002a).

Inicialmente, as avaliações da hemodinâmica do trato reprodutivo eram realizadas por meio de mensurações da artéria uterina e ovariana (BOLLWEIN et al., 2002a; BOLLWEIN et al., 2002b; BOLLWEIN et al., 2003). As artérias de grande calibre como a artéria uterina e ovariana permitem um exame mais rápido e fácil, porém, se ramificam e irrigam outros tecidos além do útero e ovário. Além disso, podem ficar relativamente distantes da área de interesse, como por exemplo, de estruturas ovarianas como folículos e CL. Desta maneira, é possível que haja influência de outros fatores nos valores das velocidades do fluxo sanguíneo das artérias de grande calibre, e não apenas alterações relacionadas aos eventos que ocorrem no ovário e útero.

Neste contexto, novas pesquisas tem mostrado um novo método de avaliação do trato reprodutivo. O estudo da PV uterina tem sido realizado diretamente na área alvo de interesse, por meio da avaliação de vasos presentes no miométrio, endométrio e mesométrio (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2010). A mesma metodologia tem sido utilizada para estudo de estruturas ovarianas, como folículos e CL, por meio da avaliação de vasos presentes na parede folicular (GASTAL et al., 2006; SILVA et al., 2006) ou no tecido luteal (GINTHER et al., 2007, SILVA & GINTHER, 2009).

2.2.1. PERFUSÃO VASCULAR DO FOLÍCULO DOMINANTE

A PV folicular de éguas está relacionada com diversos fenômenos que ocorrem durante o ciclo estral (ACOSTA et al., 2004; GASTAL et al., 2006). Até o presente momento, alterações na hemodinâmica folicular foram observadas durante o processo de divergência e determinação da dominância. A partir da emergência folicular, a área de fluxo sanguíneo da parede folicular aumenta progressivamente no futuro folículo dominante, ao passo que nos futuros folículos subordinados, começa diminuir 24 horas antes da divergência folicular, caracterizada pelo diâmetro (Figura 4). Portanto, as mudanças fisiológicas na PV do folículo dominante e dos subordinados precedem as alterações na taxa de crescimento (ACOSTA et al., 2004a).

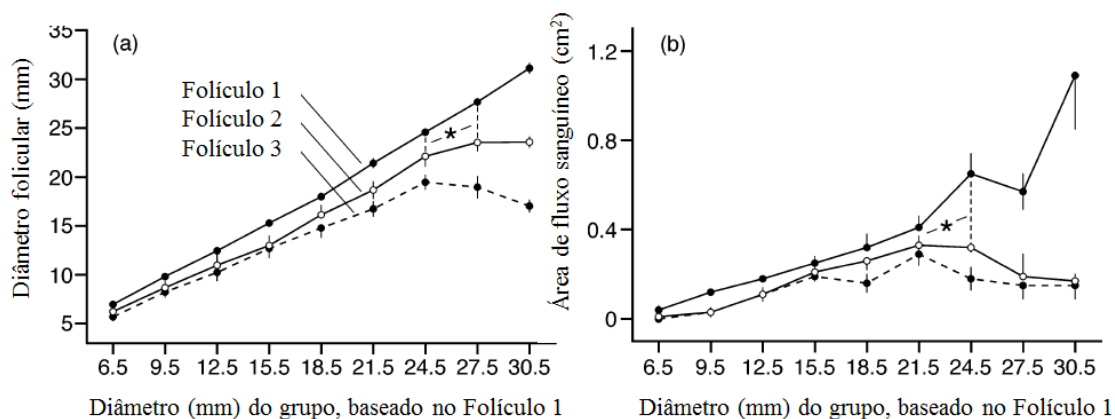


Figura 4. Média ($\pm$ e.p.m) para o diâmetro (a) e área de fluxo sanguíneo (b) da parede dos três maiores folículos (F1, F2, F3) em casos de simples dominância folicular. O asterisco, na imagem “a”, indica o início do desvio entre F1 e F2, baseado na diferença entre as taxas de crescimento folicular ($P < 0,05$). E na imagem “b” indica aumento significativo da área de fluxo sanguíneo folicular. Fonte: Acosta et al. (2004a).

Durante a fase de transição entre o anestro sazonal e a estação reprodutiva, a emergência de ondas foliculares maiores resulta muitas vezes em folículos que atingem diâmetro pré-ovulatório, entretanto, não ovulam (GINTHER, 1992). A PV do futuro folículo ovulatório aumenta progressivamente a partir de 25 mm de diâmetro, enquanto a dos futuros folículos anovulatórios se mantém constante até 35 mm de diâmetro, e a partir de então decresce. Desta forma, de acordo com as características hemodinâmicas, pode-se prever com acurácia o potencial ovulatório de um folículo, durante a fase de transição entre o anestro sazonal e a estação reprodutiva (Figura 5; ACOSTA et al., 2004b).

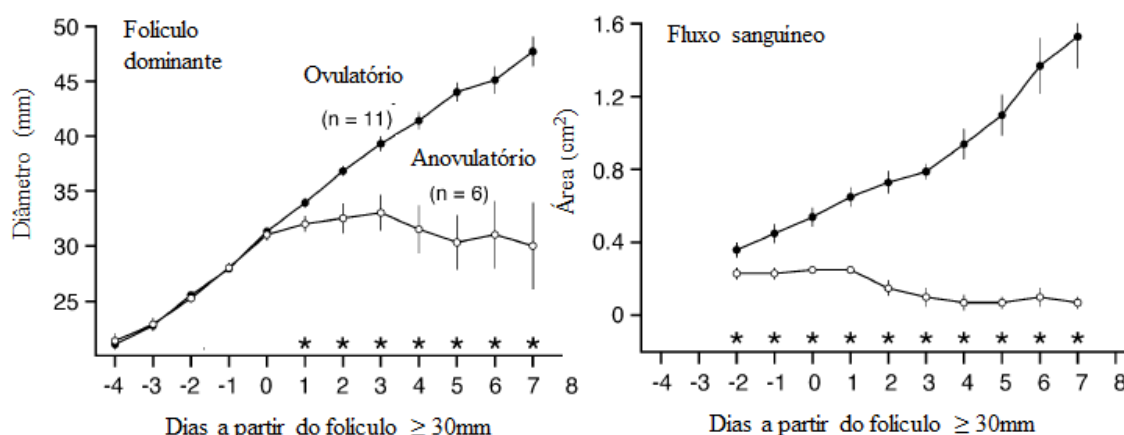


Figura 5. Média ($\pm$ e.p.m) para o diâmetro folicular (mm) e área de fluxo sanguíneo da parede de folículos dominantes ovulatórios (>30 mm) e anovulatório. Asterisco indica diferença estatística entre grupos dentro de cada momento ($P < 0,05$). Fonte: Acosta et al., (2004b).

O FSH e LH, associados a outros fatores, estão envolvidos com a proliferação de células foliculares e com a maturação folicular, respectivamente (EVANS et al., 1997). Adicionalmente, Gastal et al. (2006) observaram que a perfusão sanguínea folicular aumenta de acordo com a maturação folicular. Contudo, a administração exógena de FSH equino e de LH equino recombinante, não resultou em aumento da perfusão sanguínea ovariana e folicular, por meio da avaliação do fluxo sanguíneo da artéria ovariana e de vasos presentes na parede folicular, respectivamente (ALTERMATT et al., 2012).

Em casos de ovulação espontânea, a PV do folículo pré ovulatório aumentou progressivamente, atingindo valores máximos, entre 80 e 90% de pontos coloridos Doppler presentes na parede folicular, durante 36 e 12 horas prévias à ovulação, seguido por uma diminuição brusca nas últimas quatro horas (Figura 6; Gastal et al., 2006b).

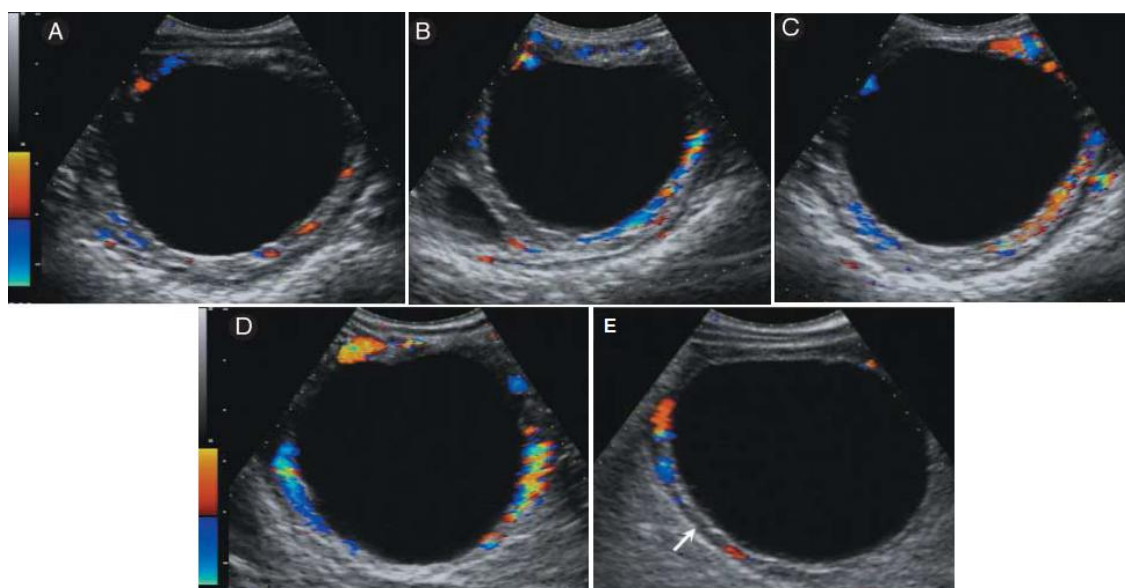


Figura 6. Sequência de imagens ultrassonográficas modo *color-Doppler*, função *Color-flow*, de folículos pré-ovulatórios de éguas com ovulação espontânea, ilustrando a PV da parede folicular 36, 38, 44 e 60 horas (A, B, C, e D, respectivamente), após o folículo atingir 35 mm de diâmetro (H0), e 3 horas antes da ovulação (E). A ovulação foi detectada 84 horas após H0. A seta na imagem (E) indica a banda anecóica. Fonte: Gastal et al. (2006b).

Ao se aproximar da ovulação o folículo perde o formato esférico e, a espessura da camada de células da granulosa assim como o percentual de pontos coloridos se tornam maiores na base do que no ápice folicular (GASTAL et al., 2006b). Neste mesmo estudo, não foi observada presença de sinais Doppler no ápice folicular, contudo, os fatores que levam a queda da PV neste período ainda não estão completamente elucidados.

Um fenômeno semelhante ao observado nos folículos de éguas com ovulação espontânea ocorre em éguas induzidas com 2500 UI de hCG. A PV folicular aumenta progressivamente durante o período pré-ovulatório, porém, de maneira mais acentuada, entre 36 e 12 horas que antecedem a ovulação, nos folículos de éguas tratadas com hCG. Durante as 12 horas prévias à ovulação, as alterações na hemodinâmica folicular apresentam novamente um perfil similar, entre éguas com ovulações espontâneas ou induzidas (GASTAL et al., 2006b).

Em éguas induzidas com hCG, o aumento mais acentuado entre 36 e 12 horas prévias à ovulação ocorre provavelmente devido ao intervalo entre a detecção de um folículo pré-ovulatório (35mm) e a ovulação, ser menor comparado a éguas com ovulações espontâneas. Desta maneira, a indução da ovulação antecipa os fenômenos prévios à ovulação, uma vez que estas alterações também ocorrem em ovulações espontâneas, contudo, mais lentamente (GASTAL et al., 2006b).

Além da perfusão sanguínea, a avaliação da maturação e da qualidade oocitária de folículos pré-ovulatórios também foi realizada em éguas submetidas à indução da ovulação com hCG, contudo, classificadas de acordo com a presença ou ausência de anticorpos circulantes anti-hCG (SIDDIQUI et al., 2009). Em todas as éguas com mensuração de anticorpos positivos, a presença da hCG não foi detectada 30 horas após o tratamento, o que provavelmente resultou em uma PV folicular significativamente menor ($68,6 \pm 4,3\%$) comparado ao grupo anticorpos negativo ($76 \pm 2,2\%$). Neste mesmo estudo observou-se que a concentração plasmática de LH foi menor, enquanto a concentração de E2 foi maior, em éguas com presença de anticorpos comparadas às éguas sem anticorpos. A hCG leva a queda da concentração plasmática de E2 e ao aumento das concentrações de LH endógeno (GASTAL et al., 2006, GINTHER et al., 2007), e estão associadas ao

aumento da enzima 17- β hydroxysteroid dehydrogenase no fluido folicular (BROWN et al., 2004). Desta maneira, o percentual de oócitos maduros, menor no grupo anticorpo-hCG presente (14%) comparado ao ausente (93%) podem estar relacionadas às alterações hormonais (SIDDIQUI et al., 2009).

Mudanças na angiogênese de folículos pré-ovulatórios também foram descritas por meio da histopatologia (KERBAN et al., 1999). Em éguas submetidas à indução da ovulação com hCG, observou-se um aumento significativo no número de vasos sanguíneos da parede folicular (teca interna e teca externa) nas horas 33, 36 e 39 pós-tratamento. Associados às mudanças vasculares, observou-se um aumento no grau de edema, hemorragia, vasodilatação e hiperemia, com valores máximos nas horas 36 e 39. Contudo, as tentativas para identificar os mediadores responsáveis por estas modificações vasculares, em resposta a gonadotrofina, ainda são inconsistentes. Os autores sugerem que as alterações observadas podem estar envolvidas com o aumento das concentrações de prostaglandinas (WATSON & SERTICH, 1991; BOERBOON & SIROIS, 1998) posto que este aumento ocorre concomitante às alterações hemodinâmicas.

O fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) e outros fatores de crescimento da mesma família, como fator de crescimento fibroblástico (FGF) 1 e 7, também possuem um papel importante no processo de desenvolvimento e maturação folicular, ovulação e formação inicial do CL. Estudos realizados em bovinos demonstraram que a secreção de VEGF e FGF é estimulada principalmente sobre ação do LH (SCHAMS et al., 2001). Estes fatores estão relacionados com a proliferação e permeabilidade de capilares sanguíneos, os quais dão suporte de nutrientes e fatores essenciais para o desenvolvimento e maturação folicular, assim como no processo de luteogênese (BERISHA et al., 2006; BERISHA et al., 2008).

Como descrito anteriormente, a PV das estruturas ovarianas está relacionada com o desenvolvimento e maturação folicular e oocitária, bem como com a fertilidade. Adicionalmente, Mortensen et al. (2009) relataram uma queda na taxa de recuperação embrionária em decorrência ao regime de exercício físico diário. Desta forma, Smith et al. (2012) avaliaram a PV folicular e a taxa de recuperação embrionária, de éguas submetidas ao exercício físico parcial ou total. A PV folicular foi menor nos grupos exercício-parcial

($45,9 \pm 3,6\%$) e total ($44,89 \pm 3,1\%$) comparada ao grupo controle ($54,9 \pm 3,6\%$). Da mesma maneira, a taxa de recuperação embrionária foi menor nos grupos exercício-parcial e total (44 e 43%, respectivamente), comparada a 67% no grupo controle. Quando estes grupos foram divididos de acordo com a recuperação embrionária, positiva ou negativa, observou-se que éguas nos ciclos com recuperação embrionária positiva apresentaram a PV folicular ($55,9 \pm 5,4\%$), significativamente maior que em ciclos negativo ($39,6 \pm 3,6\%$).

A perfusão sanguínea folicular, além de fornecer informações sobre diversos eventos durante a dinâmica folicular, tem sido correlacionada a outros fatores, como o estabelecimento da prenhez. Em estudo realizado por Silva et al. (2006), percebeu-se uma relação positiva entre o estabelecimento da prenhez e a extensão da vascularização do folículo pré-ovulatório. Um maior percentual de sinais Doppler na parede folicular associado a uma maior redução nos valores do RI e PI de vasos intraovarianos foram observados em éguas que ficaram gestantes quando comparado com éguas que não ficaram. Tal fato suportou a hipótese de que uma melhor taxa de prenhez está associada a um maior fluxo sanguíneo para o folículo pré-ovulatório.

Resultados semelhantes foram descritos em bovinos (SIDDIQUI et al., 2009). A PV de folículos pré-ovulatórios aumentou de maneira mais acentuada durante as 26 horas após indução com GnRH, em vacas que se tornaram prenhes comparadas as não que não se tornaram, resultando em maior PV folicular no momento da IA ($P < 0,03$).

2.2.2. LUTEOGÊNESE: RELAÇÕES COM A PERFUSÃO VASCULAR

Concomitante e subsequente à ovulação, as células da granulosa sofrem mudanças bioquímicas e morfológicas, processo denominado luteinização, que envolve as alterações morfogénéticas das células da granulosa, inicialmente produtoras de estrógeno, em células luteais secretoras de P4, em associação a uma intensa neovascularização (BERGFELT & ADAMS, 2011).

O CL é uma estrutura dinâmica que devido a sua atividade funcional curta e transitória, de aproximadamente 14 dias, demanda rápido

desenvolvimento e regressão de um extenso sistema vascular, sendo um dos tecidos mais vascularizados do corpo (GINTHER, 2007). Segundo Ginther et al. (2007), após a ovulação a área de fluxo sanguíneo luteal aumenta de forma constante e progressiva até envolver praticamente toda sua área ao redor do 6º dia pós-ovulação. Entre D8 e D14, a PV luteal apresenta valores máximos, seguido por uma queda durante o período de luteólise. Durante este período, a concentração plasmática de P4 apresenta um perfil semelhante, caracterizando uma relação entre a PV e concentração plasmática de P4 (Figura 7). Da mesma forma, Bollwein et al. (2002a), por meio de dados coletados da artéria ovariana, observaram uma relação entre o aporte sanguíneo ovariano e a concentração plasmática de P4 (BOLLWEIN et al., 2002a).

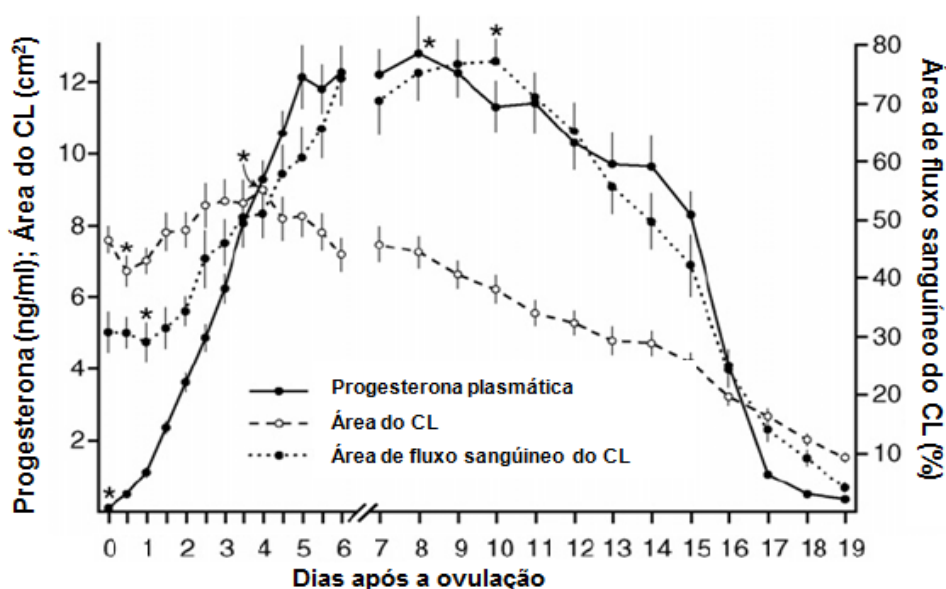


Figura 7. Média ($\pm$ e.p.m) para área luteal, área de fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas. Asteriscos indicam aumento ou decréscimo significativo ($P < 0,05$) dentro de cada momento. Dia 0 = dia da ovulação. Fonte: Ginther et al., (2007).

Resultados obtidos por análise imunohistoquímica foram semelhantes aos obtidos na US Doppler. Alziabi et al. (2003), observaram que após a ovulação, há uma invasão das células endoteliais na cavidade do corpo hemorrágico resultando no início do processo de vascularização inicialmente ruim, entre as células luteais. Já no D10, caracterizou-se uma completa e densa rede de capilares. Durante a fase inicial da regressão luteal (D14),

ocorreu um pequeno decréscimo na área e na densidade dos microvasos, enquanto que em D17, após a luteólise, a extensa rede vascular presente na fase lútea intermediária já regrediu completamente.

Fatores como a proliferação endotelial durante a fase lútea inicial e média sugerem uma intensa angiogênese luteal. A elevada e reduzida expressão de RNAm do VEGF, durante a luteogênese e luteólise, respectivamente, indicam que o VEGF possui uma atividade regulatória do fluxo sanguíneo neste tecido (ALZIABI et al., 2003). Um estudo *in vitro* demonstrou que o LH, PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, estão envolvidos na angiogênese e na regressão vascular luteal, em éguas. Entretanto, estes são processos complexos e regulados por inúmeros outros fatores (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

Um estudo recente descreveu que a PV luteal e a concentração plasmática de P4 não foram influenciadas pela vascularização do folículo pré-ovulatório. Folículos 12 horas antes da ovulação, com baixa perfusão sanguínea, por meio da análise de vasos da parede folicular, originaram CLs com uma extensa vascularização e produção de P4 adequada, com concentração média de 13,5 ng/mL no D8, da mesma maneira que folículos com alta perfusão vascular (Figura 8; ROMANO et al., 2012).

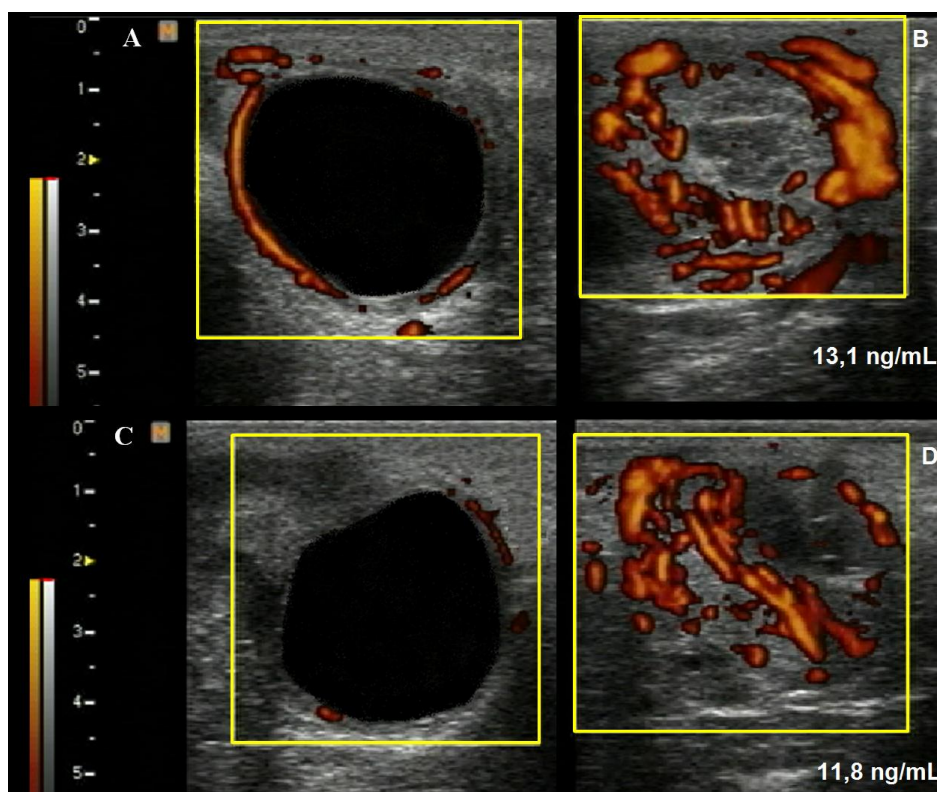


Figura 8. Imagens ultrassonográficas Doppler, função Power-flow, de folículos pré-ovulatórios e os respectivos corpos lúteos oito dias pós-ovulação, em éguas. A perfusão vascular folicular e luteal foram estimadas de acordo com a extensão de tecido (parede folicular ou tecido luteal) com sinais Doppler, durante exame contínuo e em tempo real. Folículos com alta (A) e baixa (C) vascularidade, deram origem a CLs funcionais e com elevada perfusão sanguínea e adequada produção de P4 (B e D). Fonte: Arquivo pessoal.

Além disso, o processo de neovascularização não está associado às dimensões do CL, uma vez que não há relação entre o diâmetro luteal e as mudanças nos valores do PI da artéria ovariana ipsilateral a ovulação (BOLLWEIN et al., 2002a). Adicionalmente, uma pesquisa realizada por Arruda et al., (2001) demonstrou que não há relação entre a área do CL e a produção de P4. Portanto, as mudanças cíclicas que ocorrem no aporte sanguíneo do ovário e CL, durante o diestro, devem ser principalmente determinadas por mudanças na resistência vascular ovariana devido ao crescimento e regressão dos capilares luteais (BOLLWEIN et al., 2002a).

2.2.3. INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS E A PERFUSÃO VASCULAR DO TRATO REPRODUTIVO

Diversos estudos descreveram as relações entre a PV do trato reprodutivo, produção de progesterona, qualidade oocitária e fertilidade. Em decorrência, novas pesquisas foram realizadas com objetivo de avaliar o efeito de diferentes fármacos na tentativa de otimizar o aporte sanguíneo do trato reprodutivo.

Desta maneira, a influência de hormônios como a P4 e o E2 sobre a hemodinâmica ovariana foi relatada por Bollwein et al. (2004a), com base nos valores do PI da artéria ovariana. Os tratamentos foram realizados individualmente, sendo a P4 (Regumate, 0,044 mg/kg, v.o.) administrada diariamente durante o diestro, e o E2 (Benzoato de estradiol, 5 mg, i.m.) nos dias 0, 5 e 10 pós-ovulação. Ambos os tratamentos resultaram na diminuição da perfusão sanguínea ovariana comparados ao grupo controle. A ação da P4 promoveu queda da PV apenas durante a fase de estro. Já a administração do E2 nos dias 0 e 5 não apresentou efeito significativo. Após a administração no D10, o fluxo sanguíneo ovariano foi suprimido apenas no final do diestro, entre D13 e D15.

Em outro estudo, a utilização do ácido acetilsalicílico (anticoagulante) ou captopril (vasodilatador), diariamente durante o diestro, resultou no decréscimo da resistência do fluxo sanguíneo e, consequentemente, no aumento da PV ovariana. Os valores do PI da artéria ovariana reduziram, 17% e 18%, e a concentração plasmática de P4 aumentou, 59% e 66%, nos grupos tratados com captopril e ácido acetilsalicílico, respectivamente, comparados ao grupo controle (BOLLWEIN et al., 2004b). Embora este estudo não abranja aspectos de fertilidade, tais intervenções poderão ser utilizadas como uma maneira alternativa para melhorar as condições uterinas e ovarianas e, consequentemente, elevar os índices reprodutivos.

Neste aspecto, a hCG tem sido estudada há mais de 20 anos em bovinos e mais recentemente em equinos, sobre seu efeito na luteogênese e nas características uterinas e ovarianas, na tentativa de elevar a eficiência reprodutiva.

A hCG é um hormônio glicoproteico composto por subunidades α e β , com peso molecular 30.000 e tempo de meia vida entre 8 a 12 horas (NEWCOMBE, 2011). A subunidade β da molécula de hCG possui atividade biológica semelhante ao LH, com uma similaridade de aproximadamente 80%, apresentando ação luteinizante e luteotrófica (COLE, 2009). Os hormônios luteotróficos, por sua vez, são os que sustentam o crescimento e a funcionalidade do CL (NISWENDER et al., 2000).

Em bovinos hCG tem mostrado uma influência positiva, principalmente pós-ovulação, sobre o desenvolvimento luteal e a fertilidade (RAJAMAHENDRAN & SIANANGAMA, 1992; RENSIS et al., 2008; BEINDORFF et al., 2009; RIZOS et al., 2012). Em equinos ainda há divergência entre os resultados na literatura. Algumas pesquisas descreveram efeito benéfico da hCG na produção de P4 (KELLY et al., 1988), na luteogênese e nos índices reprodutivos (FLEURY et al., 2007). Porém, outros autores relataram não haver incremento da hCG sobre o desenvolvimento luteal quando utilizada para induzir a ovulação (URQUIETA et al., 2009) ou durante o diestro (HENDRIKS et al., 2006). Adicionalmente, um efeito negativo da hCG na taxa de prenhez foi observada em receptoras de embrião tratadas no dia da TE (MCCUE et al., 2011). Desta maneira, apesar de inúmeras pesquisas terem sido realizadas nas últimas décadas, fornecendo informações extremamente importantes sobre o uso a hCG na reprodução animal, ainda há uma ampla área a ser explorada e estudada.

2. HIPÓTESES

A administração da hCG, na detecção de um folículo $\geq 35\text{mm}$ de diâmetro, resultará em aumento da PV folicular pós-tratamento e a US Doppler permitirá a detecção da eficiência do tratamento indutor de ovulação.

A administração de hCG, na detecção de um folículo $\geq 35\text{mm}$ de diâmetro ou no período de luteogênese, interferirá positivamente na PV luteal e na concentração plasmática de P4.

3. OBJETIVOS

O estudo em questão teve por objetivos gerais descrever as alterações na hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e caracterizar o desenvolvimento estrutural e funcional do CL, de éguas tratadas com distintas doses de hCG, em diferentes momentos do ciclo estral.

Os objetivos específicos foram:

- a. Caracterizar a PV do folículo pré-ovulatório de éguas pós-tratamento com diferentes doses de hCG;
- b. Descrever a PV luteal de éguas tratadas com diferentes doses de hCG, em diferentes momentos do ciclo estral;
- c. Descrever o perfil plasmático de P4 e correlacionar o desenvolvimento estrutural (área e volume) e funcional (PV e concentração plasmática de P4) do CL de éguas tratadas com distintas doses de hCG em diferentes momentos do ciclo estral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva de 2011/2012, no Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ), FMVZ/UNESP, localizado na Fazenda Lageado, Botucatu/SP, Brasil (Latitude 22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"). Foram utilizadas 25 éguas cíclicas, mestiças, com idade entre quatro a 18 anos e peso entre 250 a 400 kg. O escore de condição corporal de todas as éguas foi considerado alto, com escore médio sete (escala de 1 a 9, HENNEKE et al, 1983). A idade dos animais foi estimada pelas características dentárias como descrito pelo Manual da Associação Americana de Veterinários de Equinos (2002).

Os animais que participaram do experimento foram usados em acordo com a FMVZ/UNESP, com aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais, protocolo número 052/2011. As éguas foram mantidas piquetes e alimentadas com feno de *Coast-cross* (*Cynodon dactylon*), suplementação mineral, ração concentrada peletizada e acesso livre a água.

As éguas foram submetidas a um programa de luz artificial, com objetivo antecipar a atividade reprodutiva e, conseqüentemente, otimizar o potencial reprodutivo dos animais. O programa iniciou-se no solstício de inverno (21 de junho) e se manteve por 60 dias, com exposição diária a 15 horas de luz, com intensidade de 100 Lux (McKINNON et al., 2011). Não foram utilizados o primeiro e o último ciclo estral da estação reprodutiva com objetivo de descartar o efeito da sazonalidade.

4.2. DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Experimento 1 – Avaliação folicular

Os animais foram distribuídos em quatro grupos (n=6 éguas/grupo) de acordo com a dose de hCG utilizada: 750, 1500, 2500 UI ou sem tratamento.

Desta maneira, os grupos foram denominados Indução-750, Indução-1500 e Indução-2500 e Grupo controle, respectivamente.

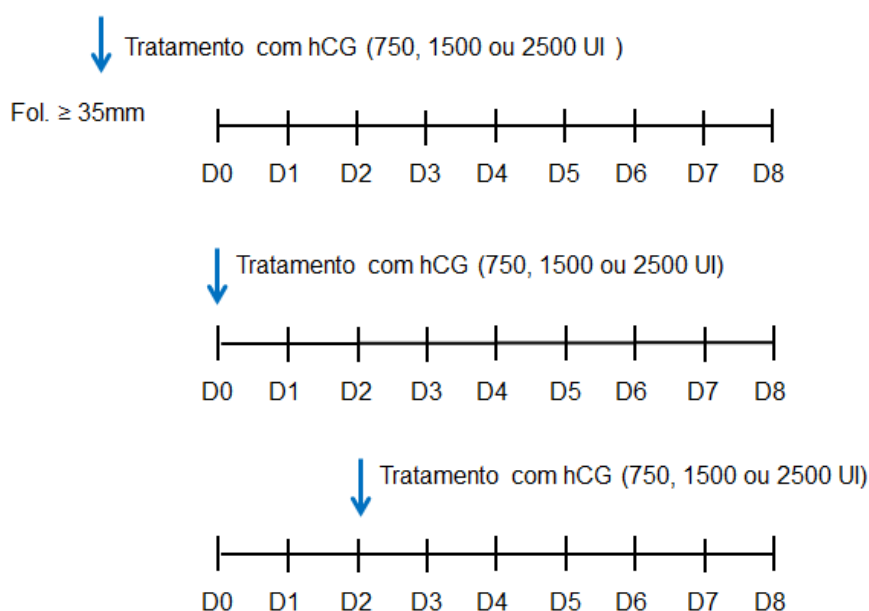
O tratamento com hCG (Vetecor 5000 U.I., Calier S.A., Barcelona, Espanha), foi realizado em administração única, por via intravenosa, na detecção de um folículo pré-ovulatório ≥ 35 mm de diâmetro, associado ao edema uterino evidente (mínimo 2, escore de classificação de 0 a 4). Para todos os grupos, não foram utilizados os ciclos estrais com codominância folicular ou ovulações de diestro.

Os parâmetros avaliados no experimento 1 foram: diâmetro e perfusão vascular folicular.

Experimento 2 – Avaliação luteal e produção de progesterona

Neste experimento, as éguas foram distribuídas em 10 grupos experimentais ($n=6$ éguas/grupo) de acordo com a dose de hCG e o momento do tratamento e, um grupo sem tratamento (Grupo controle). As doses utilizadas foram de 750, 1500 ou 2500 UI de hCG e os tratamentos foram realizados em um dos três distintos estágios do ciclo estral:

- a) folículo dominante ≥ 35 mm de diâmetro associado ao edema uterino;
- b) dia da ovulação (D0)
- c) 48 horas pós-ovulação (D2).



Desta maneira os grupos foram denominados: Indução-2500, Indução-1500, Indução-750, D0-2500, D0-1500, D0-750, D2-2500, D2-1500 e D2-750 e Grupo controle. Uma única administração de hCG, por via intravenosa foi realizada em um dos três momentos do ciclo estral. Somente éguas com ovulações espontâneas foram tratadas com hCG no D0 ou D2.

Os parâmetros avaliados no experimento 2 foram: PV luteal subjetiva e objetiva, área e volume luteal, e concentração plasmática de P4.

4.2. ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E DOPPLER

Todos os exames foram realizados com o aparelho ultrassonográfico Sonoace Pico, Medison do Brasil Ltda, com transdutor multifrequencial linear (LV5-9CDn, 5-9Mhz), modo-B e modo-Doppler colorido, função *Power-flow*. As configurações foram padronizadas previamente ao experimento e mantidas sem alteração ao longo de toda a coleta de dados.

Em ambos os experimentos, durante toda a coleta e avaliação dos dados, o operador não teve conhecimento dos grupos experimentais avaliados, para evitar uma possível influência subjetiva nos resultados.

Experimento 1 – Avaliação folicular

O acompanhamento do crescimento folicular foi realizado diariamente a partir de 25 mm de diâmetro. Quando o folículo atingiu 35 mm, associado ao edema uterino evidente, iniciaram-se os exames ultrassonográficos Doppler. A avaliação da PV folicular foi realizada imediatamente antes ao tratamento (H0), e a cada hora durante as primeiras 12 horas pós-tratamento. Após as 12 horas iniciais, a avaliação passou a ser realizada a cada 6 horas, até a detecção da ovulação (D0).

A PV do folículo pré-ovulatório foi avaliada de forma subjetiva, levando em consideração o percentual de parede folicular com a presença de pontos coloridos Doppler durante exame contínuo de no mínimo um minuto. Os vídeos dos exames ultrassonográficos foram gravados para posterior análise objetiva. Contudo, devido a grande variação observada da distribuição da perfusão

sanguínea ao longo da parede folicular, durante o exame ultrassonográfico, a seleção de uma imagem representativa da PV folicular total tornou-se inviável. Desta maneira, somente a análise subjetiva foi utilizada neste estudo, por permitir uma avaliação geral da PV, por meio da somatória da distribuição dos pontos coloridos Doppler, ao longo da parede folicular (Figura 9).



Figura 9. Imagens ultrassonográficas modo Doppler colorido, função *Power-flow*, de um folículo pré-ovulatório equino. A sequência de imagens representa o método de avaliação subjetivo da PV, pela soma da distribuição dos pontos coloridos Doppler, ao longo da parede folicular. Esta avaliação foi realizada em um exame contínuo de no mínimo um minuto. Fonte: arquivo pessoal

Experimento 2 – Avaliação luteal

Para a detecção do dia da ovulação as éguas foram acompanhadas diariamente a partir da presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro. A partir da ovulação, as avaliações do CL foram realizadas diariamente até o oitavo dia pós-ovulação.

A área (mm^2) e volume (mm^3) luteal foram mensurados a partir de uma imagem fixa em modo-B, e foram determinados por meio da função *scanners tracing* do equipamento. Nos casos de CL cavitários, a área luteinizada foi calculada pela subtração da área da cavidade ou coágulo, em relação à área total do CL (Figura 10).



Figura 10. Imagem ultrassonográfica modo-B de um CL equino com cavidade. A linha vermelha contínua representa a delimitação externa da área luteinizada e a linha verde representa o limite externo da cavidade luteal. O espaço entre as duas linhas foi considerado a área luteinizada. Fonte: arquivo pessoal

A avaliação PV luteal foi realizada inicialmente de maneira subjetiva considerando o percentual de tecido luteal com sinais coloridos Doppler durante o exame contínuo de no mínimo um minuto (Figura 11).

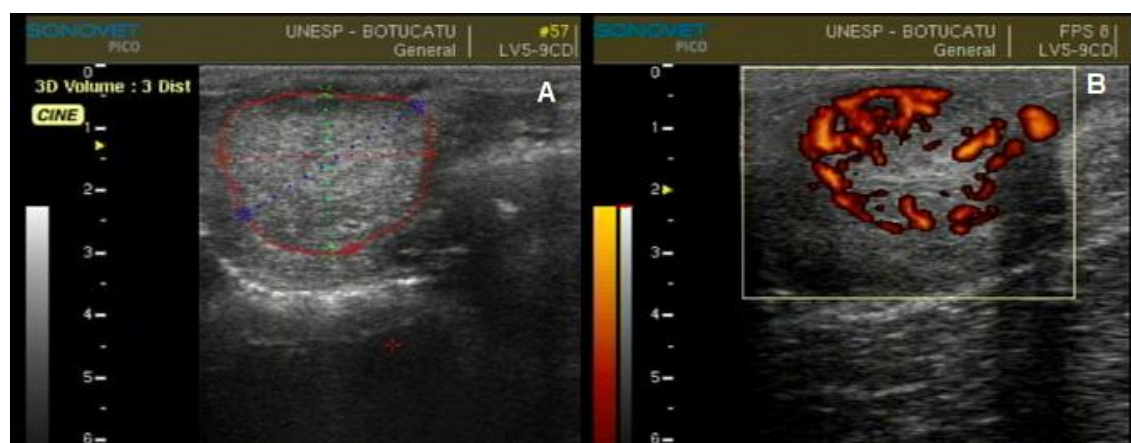


Figura 11. Imagem ultrassonográfica de um CL equino, em modo-B (A) e modo-Doppler colorido, função *Power-flow* (B). A linha vermelha contínua, na imagem A, delimita a área luteal, e as linhas tracejadas são utilizadas para mensuração do volume. Na imagem B os pontos coloridos Doppler representam a perfusão vascular luteal. Fonte: Arquivo pessoal

Posteriormente, realizou-se a análise objetiva, com intuito de validar o método subjetivo. Para tanto, os exames ultrassonográficos foram gravados em um computador portátil equipado com placa de captura de vídeo (Pinnacle Studio 9). Para análise, os vídeos foram fragmentados em uma imagem por segundo, utilizando-se o programa “Free Video to JPG Converter v.5.0.22”. Em seguida, três imagens do CL de cada exame, caracterizadas por apresentarem a maior quantidade de sinais coloridos em sua maior área, foram selecionadas, extraídas e salvas em formato TIFF, utilizando-se o programa Adobe PhotoShop 5.5 (Adobe Systems, San Jose, CA). O número total de pixels e a intensidade foram gerados pelo programa ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD), em uma imagem formato TIFF (Figura 12). A intensidade dos pixels é caracterizada com base no brilho dos pixels coloridos, sendo que maior brilho representa maior intensidade e maior velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007). A intensidade total dos pixels é a somatória das intensidades, de cada pixel, gerada pelo computador (GINTHER & SILVA, 2009).

Além disso, a área luteal vascularizada (mm²) foi utilizada como um dos parâmetros da análise objetiva, calculada pela equação a seguir, no programa Microsoft Excel 2010:

$$\text{Área vascularizada} = N^{\circ} \text{ total de pixels coloridos} \times 0,0465$$

Nota: 1 pixel colorido corresponde a área de 0,0465 mm².

Para a análise estatística, utilizou-se a média dos valores obtidos das três imagens selecionadas de cada avaliação.

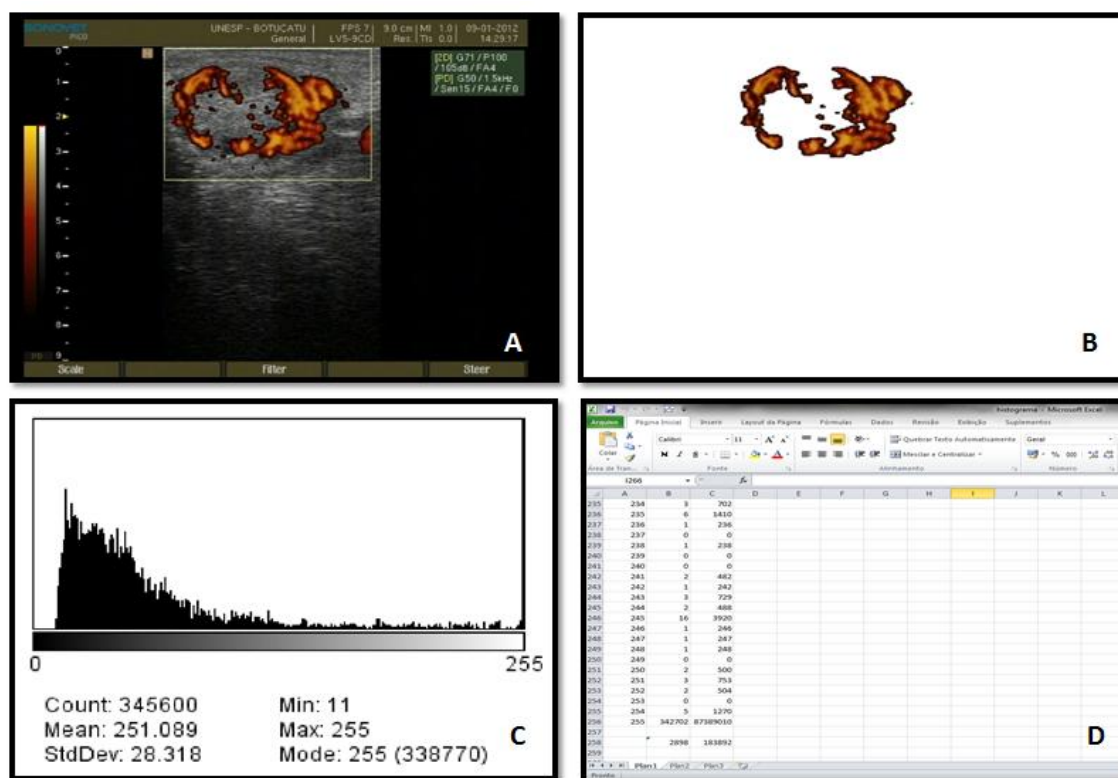


Figura 12. Imagens ultrassonográficas Doppler, função *Power-flow*, de um corpo lúteo equino (A) e sua respectiva imagem extraída, em formato TIFF, que representa a área de pontos coloridos (B). O histograma com valores da contagem de pixels coloridos e intensidade de pontos foi gerado pelo programa Image J 1.31v (C). A análise do número total de pixels coloridos e intensidade total dos pixels, para obtenção da área luteal vascularizada (mm^2), foi realizada utilizando-se o programa Microsoft Excel 2010 (D). Fonte: arquivo pessoal.

4.3. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA

Amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados a vácuo, por punção da veia jugular, diariamente a partir do D-1 (um dia antes da ovulação) ao D8. Este processo foi realizado imediatamente antes ao exame ultrassonográfico. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 1200g durante 10 minutos e, em seguida, o plasma foi separado em tubo de polipropileno de 2mL e armazenado a -20°C , até a realização do ensaio.

A concentração plasmática de P4 foi mensurada por meio da técnica de radioimunoensaio utilizando-se *kit* comercial (*kit* de progesterona fase solidada, Diagnostic Product Corporation, DPC, Los Angeles, CA, USA). Os coeficientes de variação e sensibilidade intraensaio foram $7,6 \pm 0,7\%$ e $0,05 \text{ ng/mL}$, respectivamente.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

No experimento 1, para melhor visualização, os dados foram divididos e avaliados em três períodos. O primeiro abrangeu apenas as avaliações a cada hora, durante as 12 horas iniciais pós-tratamento. O segundo se referiu às avaliações a cada seis horas durante as 36 primeiras horas pós-tratamento. O terceiro período avaliado foi durante as 24 horas prévias a ovulação, com análises retroativas, tomando como ponto fixo a ovulação, contudo, apenas entre os grupos tratados com hCG.

Para análise, foram utilizados os valores percentuais subjetivos e, adicionalmente, devido a grande variação dos valores de PV folicular no momento inicial de avaliação, padronizou-se como valor zero o momento em que foi realizada a primeira avaliação (H0). Os valores subsequentes representam o aumento ou diminuição em relação ao momento inicial, denominada variação relativa. Estes valores foram obtidos pela seguinte fórmula:

$$\text{Variação relativa} = \frac{\text{Valor avaliado em cada momento} - \text{Valor inicial (H0)}}{\text{Valor inicial (H0)}}$$

No experimento 2, para os momentos (presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro; dia da ovulação ou dois dias pós-ovulação) em que não foram detectados efeito da dose, os dados foram analisados conjuntamente, dentro de cada momento do tratamento, independente da dose. Para avaliação do efeito de tempo, as comparações foram realizadas tomando como ponto fixo o dia avaliado em relação ao dia anterior.

Nos dois experimentos, para visualização da normalidade de distribuição dos dados, a avaliação das variáveis respostas foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dentre elas, apenas os valores da concentração plasmática de P4 não apresentaram distribuição normal e foram transformados para a escala log para análise.

Modelos lineares de medidas repetidas foram utilizados para comparar as médias de cada variável resposta: PV folicular, PV luteal subjetiva e objetiva, área e volume luteal, e concentração plasmática de P4, entre grupos e

momentos (SAS PROC MIXED - Version 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Um termo de interação entre grupos e momentos foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre os grupos foi dependente do momento analisado. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-p resultantes de comparações múltiplas, e a interação grupo-momento. O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

5. RESULTADOS

Experimento 1

O diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento do tratamento foi semelhante ($P>0,1$) entre os grupos Indução-2500, Indução-1500, Indução-750 e o controle, com valor médio de $35,6\pm0,23\text{mm}$. A partir deste momento, folículos de éguas tratadas com hCG cessaram o crescimento até a ovulação, apresentando diâmetro médio na avaliação prévia a ovulação de $35,5\pm0,48\text{mm}$. Já no grupo controle os folículos continuaram seu crescimento, atingindo, em média, $45,2\pm2,63\text{mm}$ de diâmetro na última avaliação, diferindo estatisticamente ($P<0,05$).

Todas as éguas com ovulação induzida ($n=18$) ovularam no período de 30 a 42 horas após o tratamento com hCG. Não houve diferença estatística ($P>0,1$) no intervalo entre o momento do tratamento e a detecção da ovulação entre os grupos, apresentando uma média de $41,0\pm1,0$, $38,0\pm2,0$ e $41,0\pm1,9$ horas nos grupos Indução-2500, Indução-1500 e Indução-750, respectivamente. Enquanto as éguas do grupo controle ovularam, em média, $105,6 \pm 14,0$ horas após tratamento com NaCl 0,9% (Figura 13).

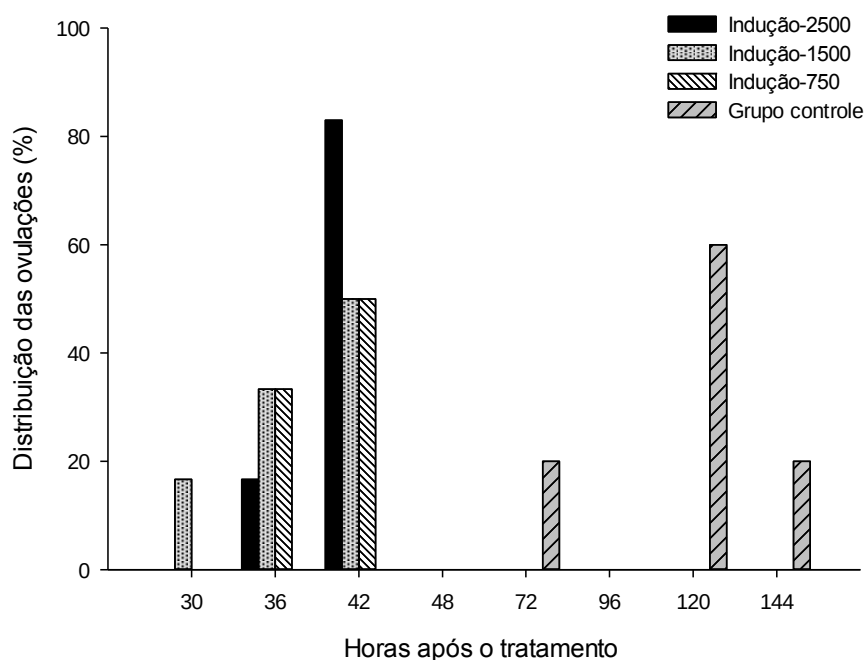


Figura 13. Distribuição das ovulações (%) ao longo do tempo (horas) de éguas tratadas com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCl 0,9% (grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo; H0=momento imediatamente antes do tratamento).

A PV do folículo pré-ovulatório apresentou um perfil semelhante entre todos os grupos experimentais. Durante as primeiras 12 horas após o tratamento, não detectou-se efeito de dose ($P>0,1$) entre os grupos tratados com hCG, e efeito de tratamento ($P>0,1$) quando comparados ao grupo controle (Figura 14). Adicionalmente, não foi observado efeito do tempo, dentro de cada grupo, uma vez que não houve diferença entre os valores da PV ao longo das 12 primeiras horas ($P>0,1$).

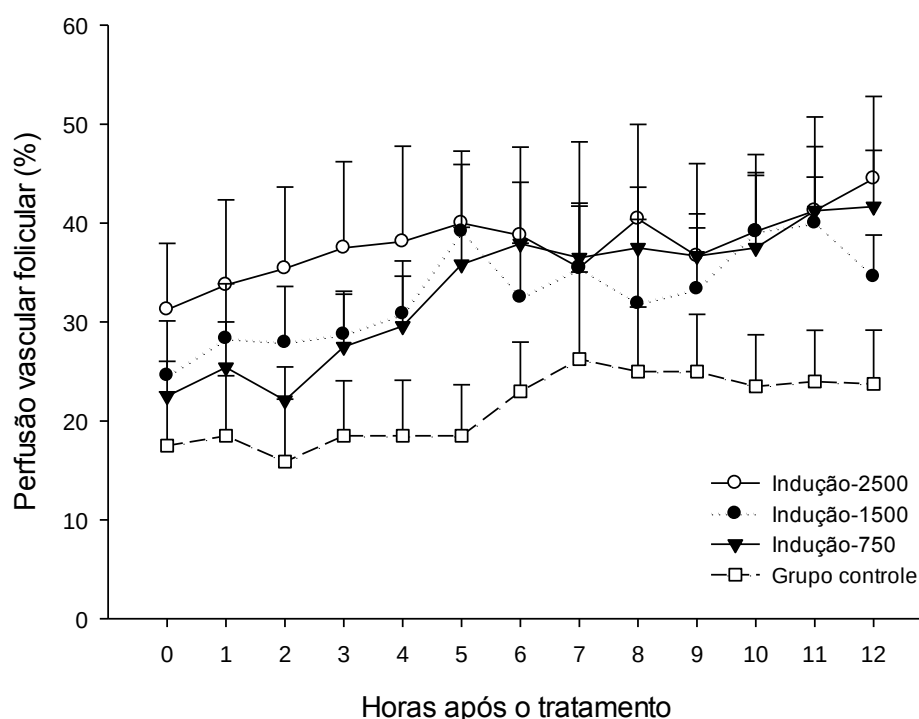


Figura 14. Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular folicular (%) durante 12 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCl 0,9% (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$).

Assim como observado nos valores originais, não foi encontrada diferença significativa ($P>0,1$) na variação relativa da PV folicular, entre os diferentes grupos, dentro de cada momento e, ao longo das horas, dentro de cada grupo (Figura 15).

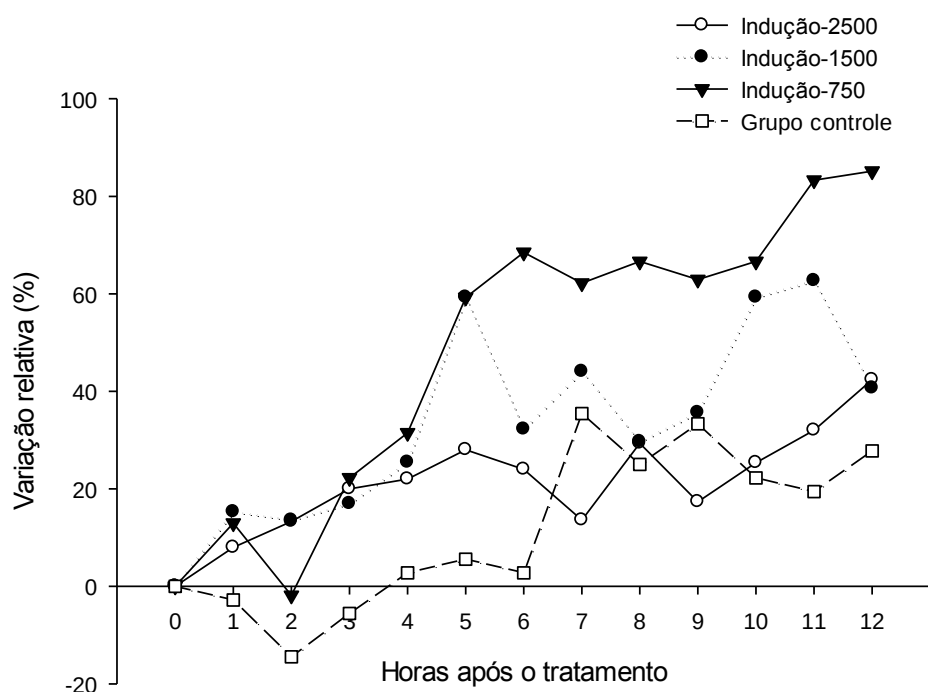


Figura 15. Média ($\pm$ e.p.m) para variação relativa (%) da perfusão vascular folicular durante 12 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCl 0,9% (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$).

Similar ao observado nas 12 primeiras horas, quando analisados os dados com intervalo de 6 horas, durante as 36 horas pós-tratamento, não foi detectado efeito da dose e do tratamento com hCG, quando comparado ao grupo controle, dentro de cada momento ($P>0,1$). Além disso, não houve efeito do tempo dentro de cada grupo (Figura 16).

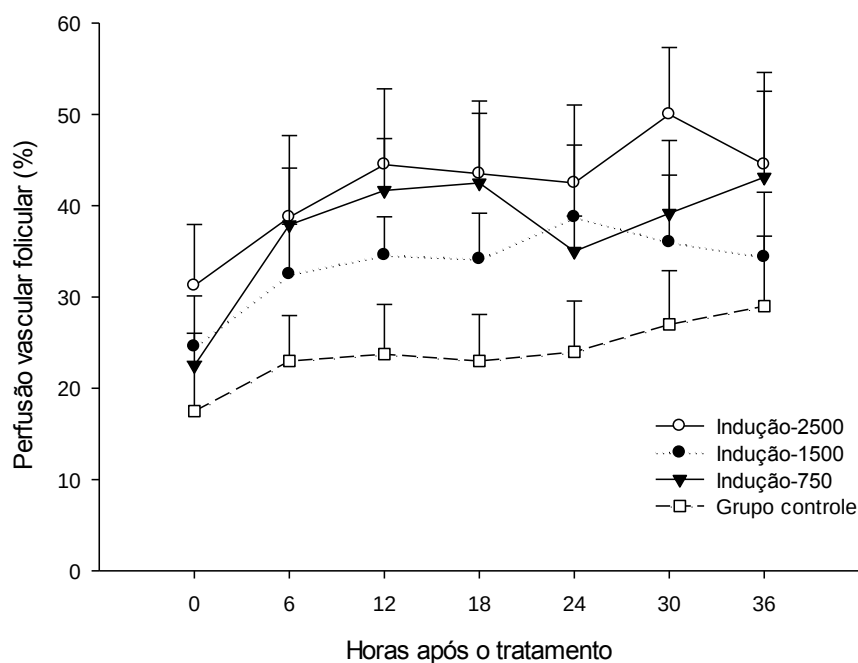


Figura 16. Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular folicular (%) durante 36 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCl 0,9% (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e momento ($P>0,1$).

Da mesma maneira ao observado para os valores brutos da PV folicular, as alterações da variação relativa não apresentaram diferença entre os grupos experimentais, não sendo observado efeito da dose e do tratamento, dentro de cada momento ($P>0,1$). Adicionalmente, as variações ocorridas ao longo do tempo, dentro de cada grupo, não apresentaram significância ($P>0,1$; Figura 17).

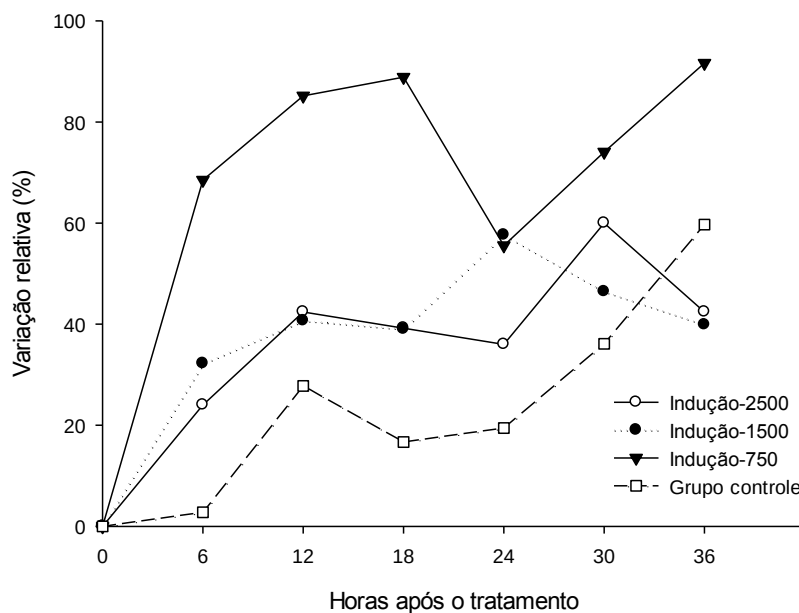


Figura 17. Média ($\pm$ e.p.m) para variação relativa (%) da perfusão vascular durante 36 horas pós-tratamento com 2500, 1500, 750 UI de hCG ou NaCl 0,9%, (Grupo controle), na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e momento ($P>0,1$).

Na análise retroativa, durante 24 horas prévias à ovulação, não foi detectada diferença significativa ($P>0,1$) entre as doses de hCG, dentro de cada momento e, ao longo do tempo, dentro de cada grupo (Figura 18).

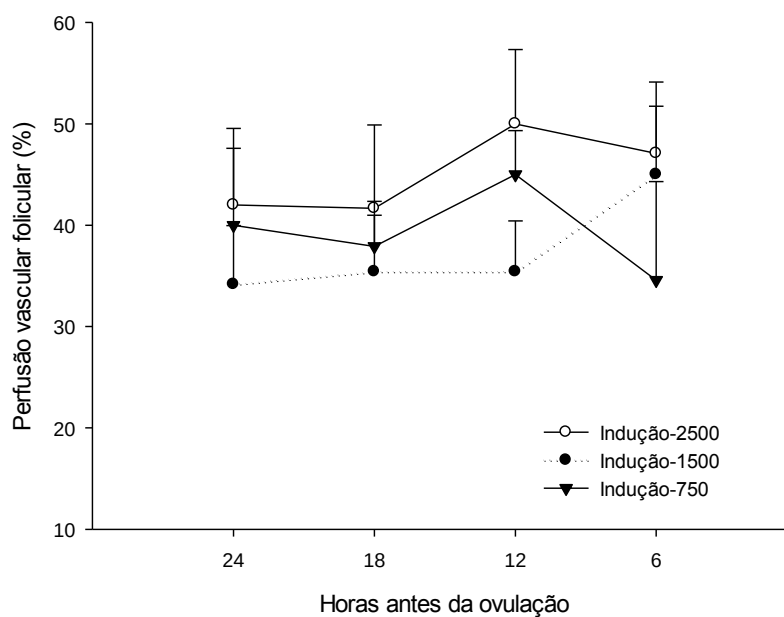


Figura 18. Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular folicular (%) durante 24 horas prévias a ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG, na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro ($n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e momento ($P>0,1$).

Experimento 2

As dimensões do CL não foram influenciadas pela dose de hCG utilizada no presente estudo. A área e o volume luteal foram similares entre os grupos experimentais ($P>0,1$; Figura 19).

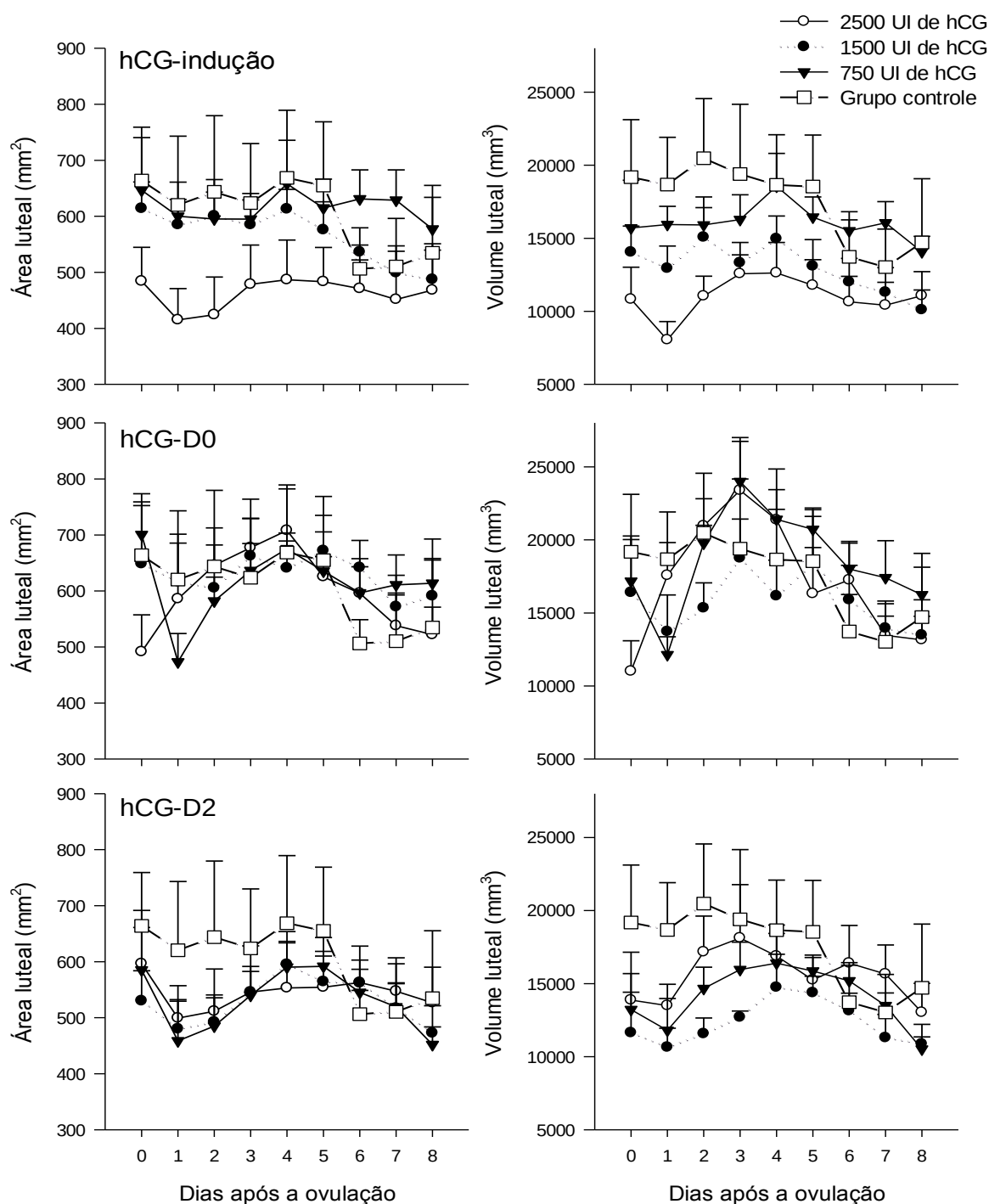


Figura 19. Média ($\pm$ e.p.m) para área (mm²) e volume luteal (mm³), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, éguas sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e momento ($P>0,1$).

Como não houve efeito da dose, os dados dos grupos tratados com diferentes doses de hCG foram avaliados conjuntamente levando em consideração apenas o momento da administração (presença de folículo $\geq 35\text{mm}$, dia da ovulação, e dois dias pós-ovulação). Desta maneira, foram formados três novos grupos: hCG-Indução, hCG-D0 e hCG-D2 ($n=18$ éguas/grupo). Quando estes grupos foram comparados ao grupo controle, não foi detectado efeito de tratamento para a área e volume luteal ($P>0,1$). Além disso, não houve efeito do tempo ($P>0,1$), uma vez que as dimensões se mantiveram sem alterações significativas ao longo dos dias, para todos os grupos (Figura 20).

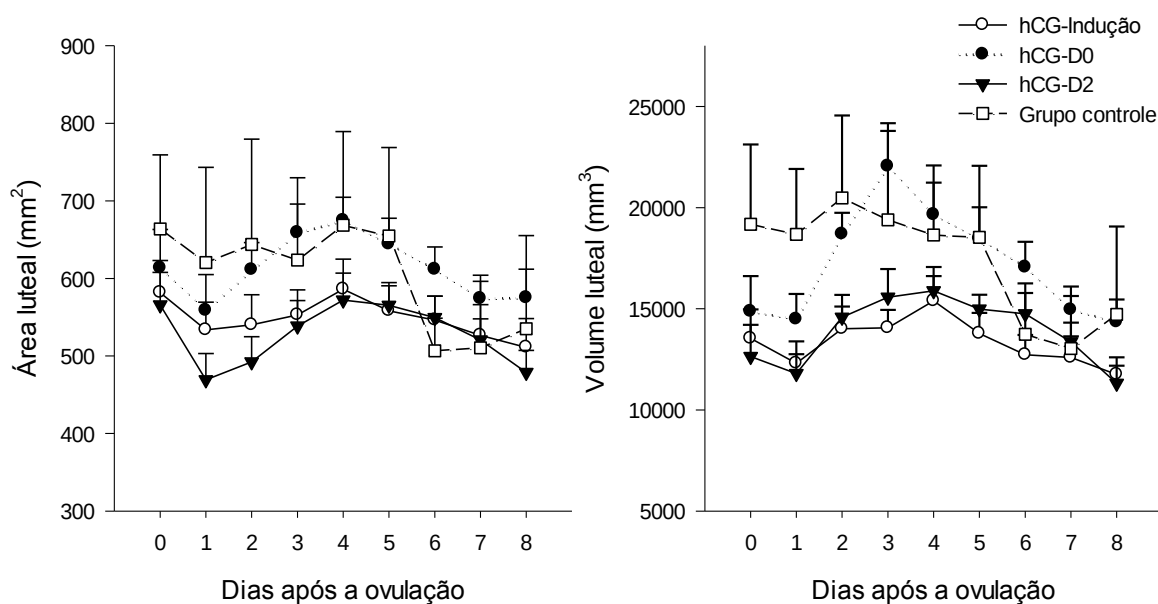


Figura 20. Média ($\pm$ e.p.m) para área (mm^2) e volume luteal (mm^3), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com hCG ($n=18$ éguas/grupo) em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle, $n=6$). Não houve diferença significativa para efeito de grupo e tempo ($P>0,1$).

Não foi observado efeito da dose de hCG utilizada, para PV luteal subjetiva dentro de cada momento ($P>0,1$; Figura 21).

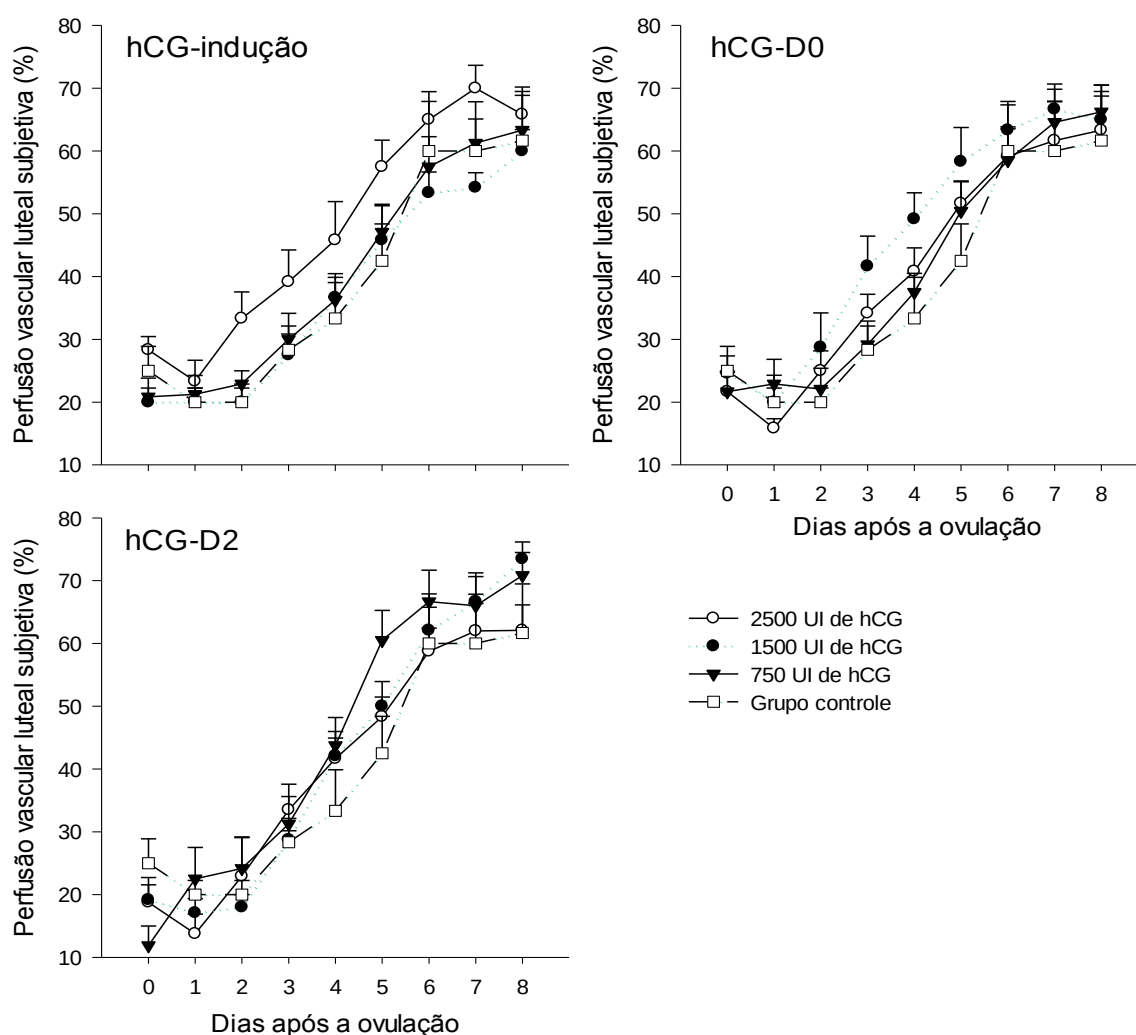


Figura 21. Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular luteal subjetiva (%), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, éguas sem tratamento (Grupo controle; $n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$).

Da mesma maneira que observado para as variáveis área e volume luteal, os dados de PV luteal subjetiva foram avaliados conjuntamente, por não haver diferença significativa entre as doses ($P>0,1$), levando em consideração o momento da administração da hCG (hCG-indução, hCG-D0 e hCG-D2; $n=18$ éguas/grupo).

Quando estes grupos foram comparados entre si e ao grupo controle, não foi detectado efeito do momento da administração da hCG ($P>0,1$), assim como efeito do tratamento com hCG ($P>0,1$; Figura 22).

Quando os dados foram analisados ao longo dos dias, dentro de cada grupo, um efeito temporal foi observado para todos os grupos experimentais ($P<0,001$). A PV subjetiva, durante as 48 horas pós-ovulação se manteve baixa, seguido de aumento significativo ($P<0,001$) progressivo a partir do D2 até D6, nos grupos hCG-Indução, hCG-D0 e hCG-D2. No grupo controle a PV luteal aumentou a partir do D4 até D6. Valores numéricos máximos foram atingidos no 8º dia pós-ovulação, em todos os grupos experimentais (Figura 22 e 23).

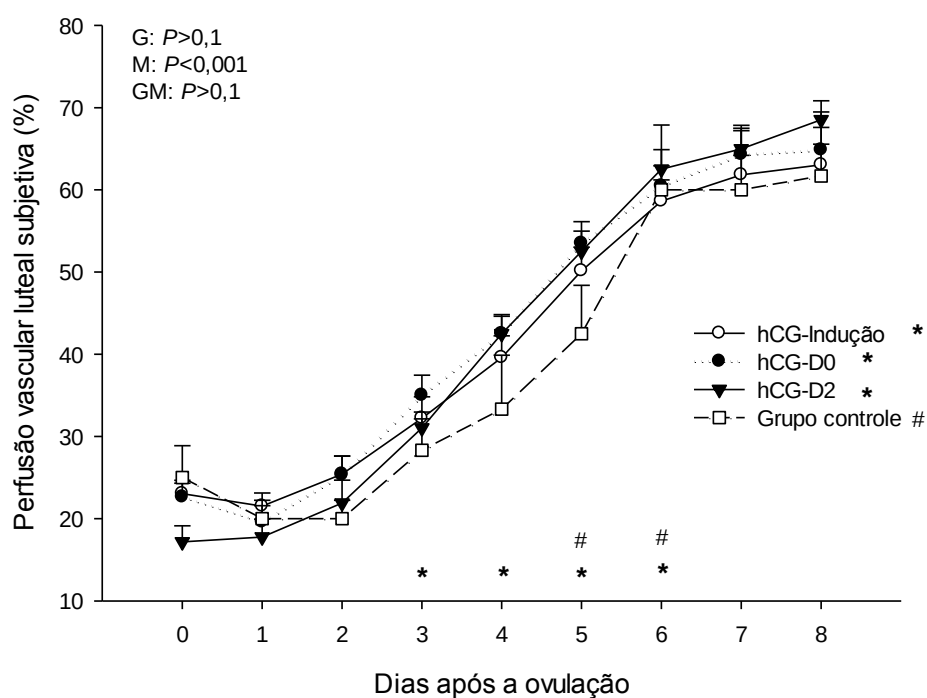


Figura 22. Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular luteal subjetiva (%), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas hCG (n=18 éguas/grupo), em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle, n=6). Valores P para efeito de grupo (G), momento (M) e a interação grupo-momento (GM) estão expressos no gráfico. Símbolos (*, #) indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao momento anterior.

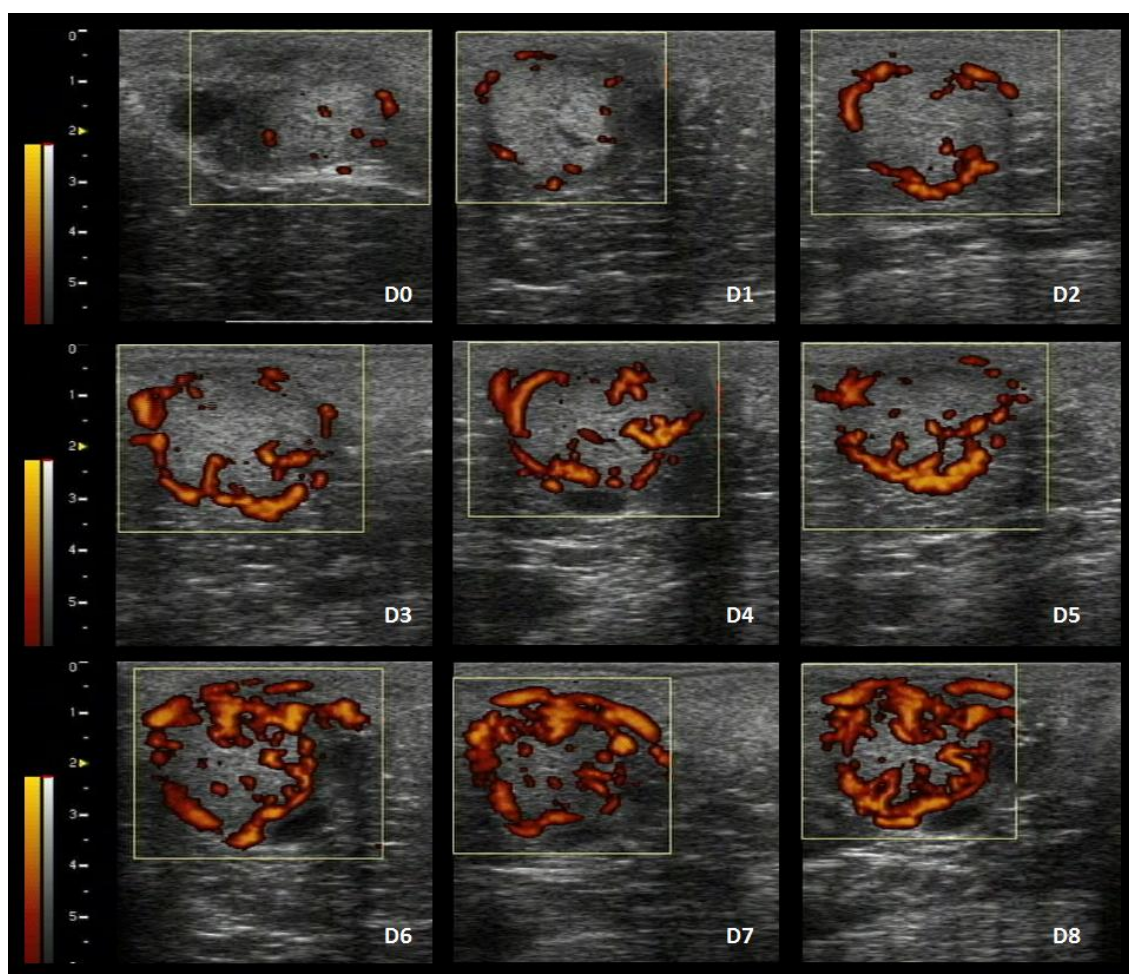


Figura 23. Imagens da perfusão vascular luteal durante oito dias pós-ovulação (D0 a D8), obtidas por meio da ultrassonografia Doppler colorida, função *Power-flow*. A classificação subjetiva da perfusão vascular (%) foi determinada de acordo com a extensão (0-100%) de tecido luteal com pontos coloridos em relação à área luteinizada. Fonte: arquivo pessoal.

Para validar do método subjetivo de avaliação da PV luteal, foram realizadas análises objetivas. Não foi encontrada diferença significativa entre as diferentes doses de hCG, dentro de cada momento ($P > 0,1$). Desta maneira, não detectou-se efeito de dose, para todas as variáveis objetivas analisadas: número de pixels coloridos (Figura 24), área luteal vascularizada (Figura 25) e intensidade total dos pixels (Figura 26).

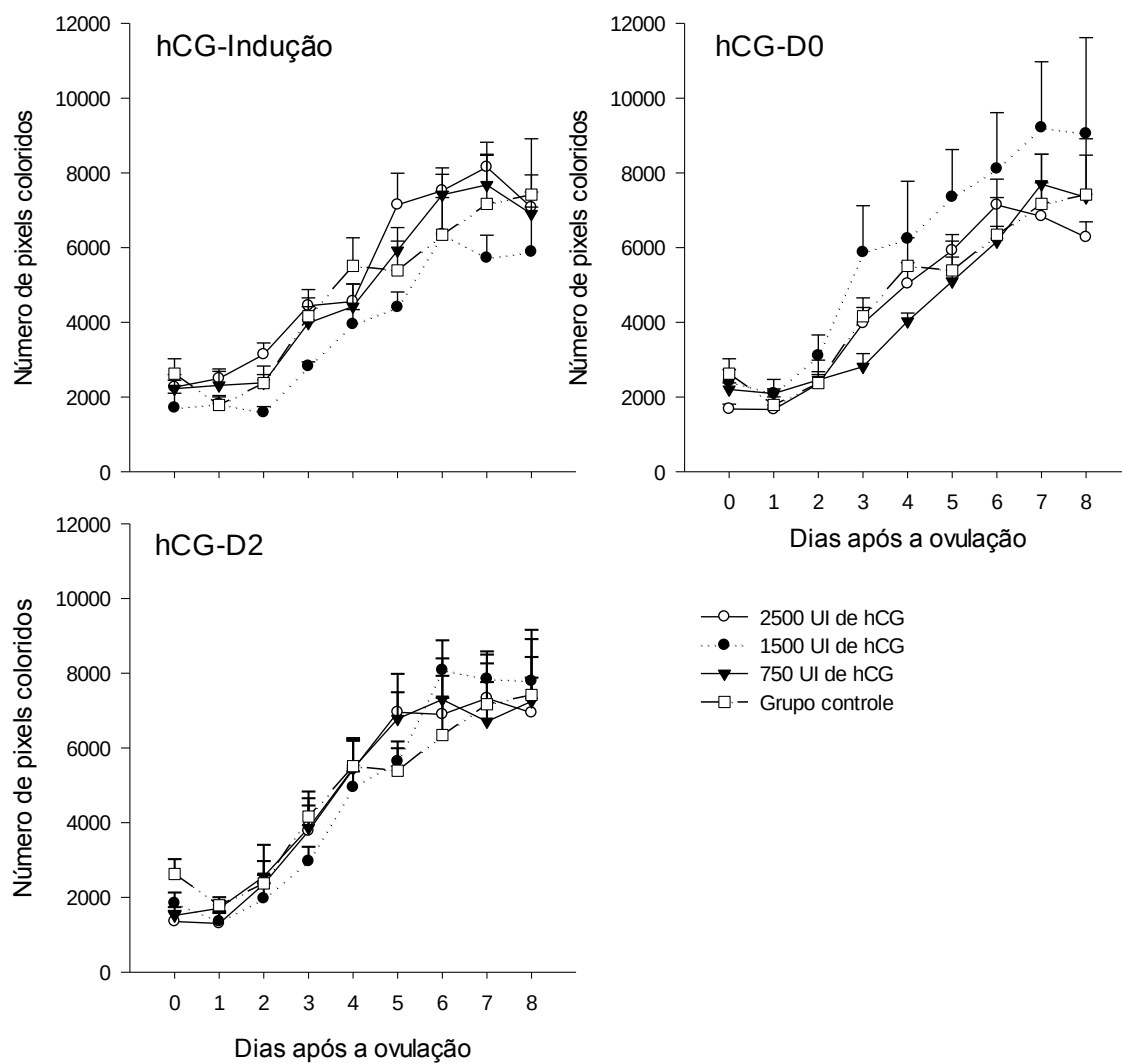


Figura 24. Média ($\pm$ e.p.m) para número de pixels coloridos, durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle; $n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$).

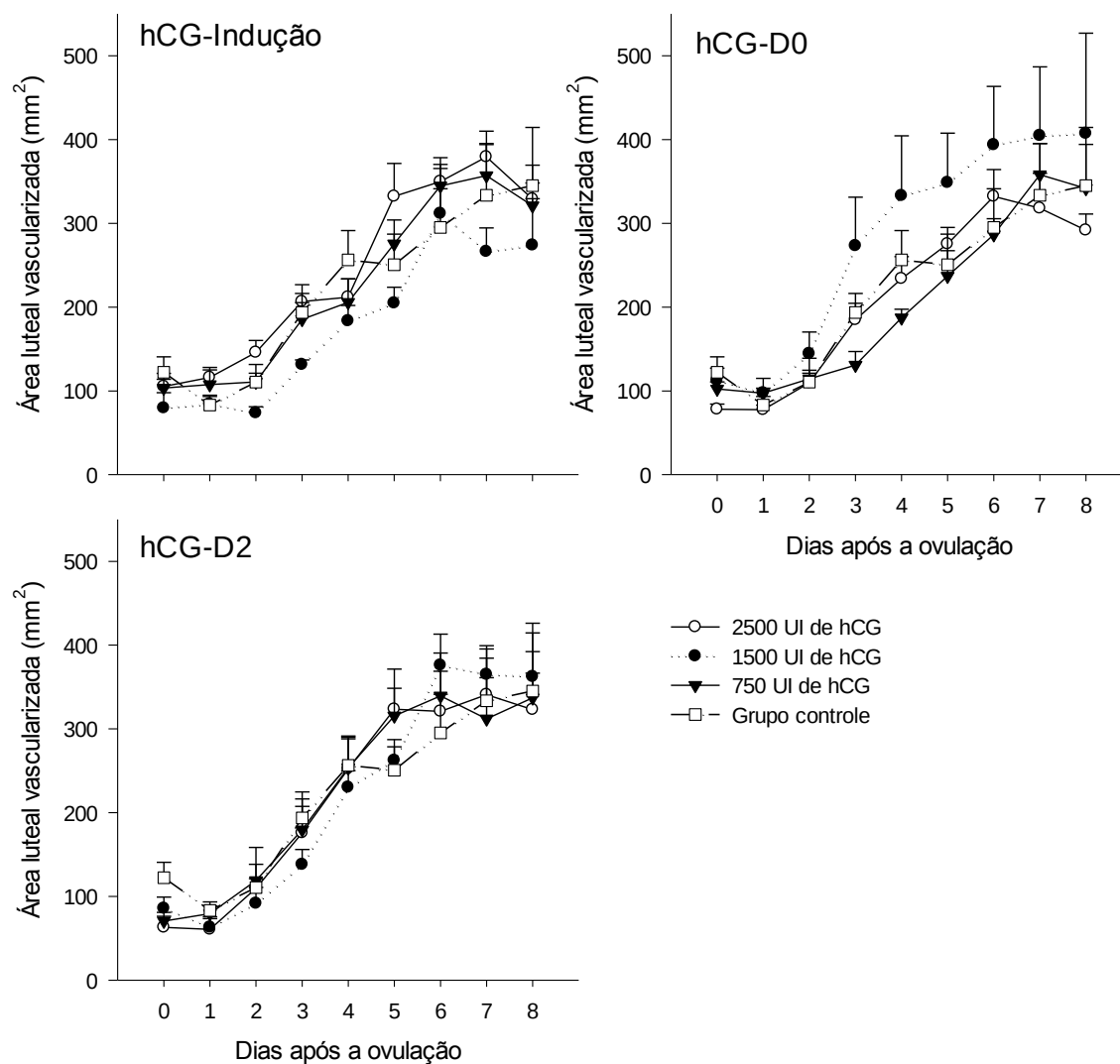


Figura 25. Média ($\pm$ e.p.m) para área luteal vascularizada (mm^2), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle; $n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P > 0,1$).

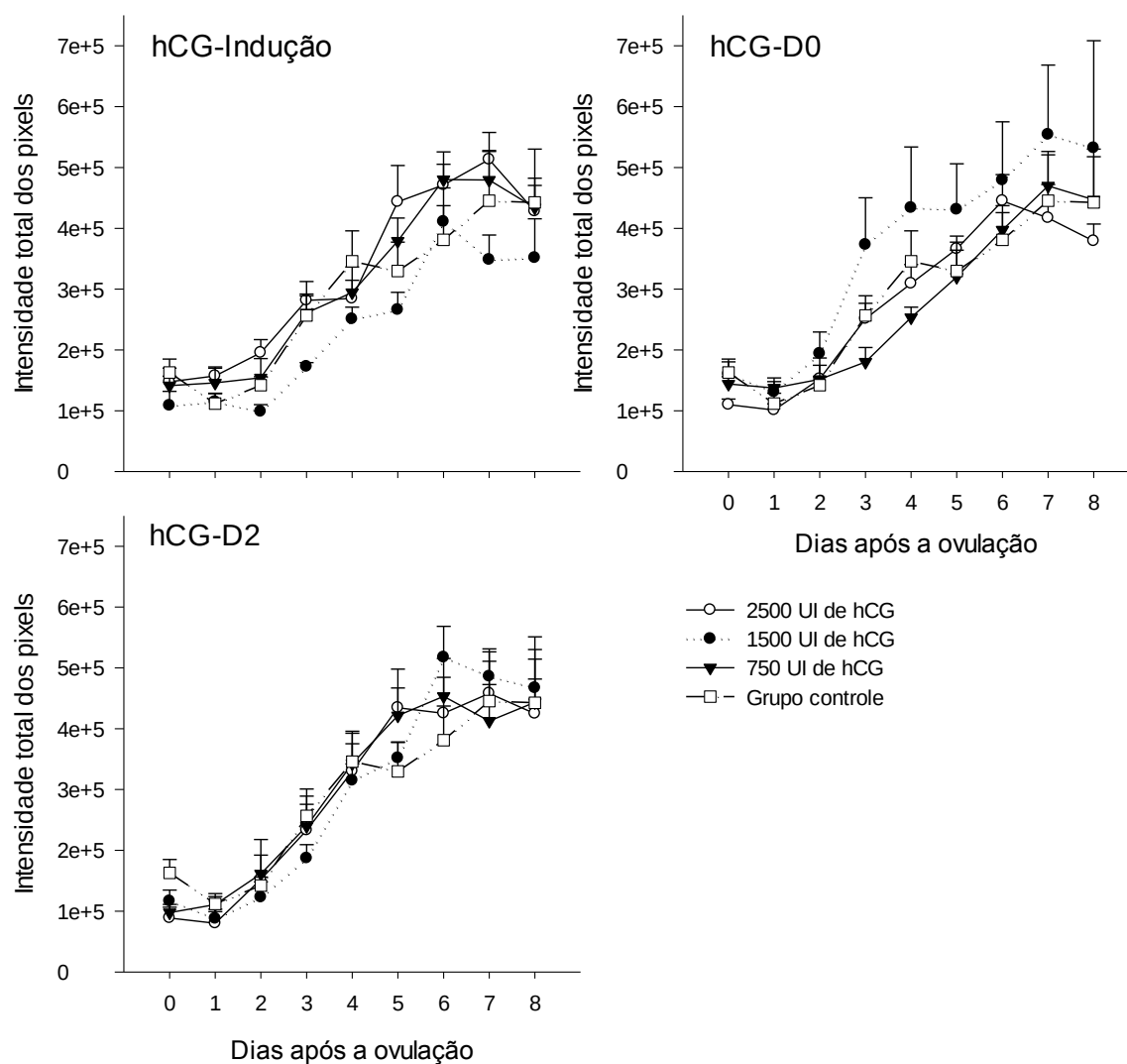


Figura 26. Média ($\pm$ e.p.m) para intensidade total dos pixels, durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle; n=6 éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$).

Da mesma maneira que observado as demais variáveis, os dados do número de pixels coloridos, área luteal vascularizada e intensidade total dos pixels foram avaliados conjuntamente, por não haver diferença significativa entre as doses ($P>0,1$), levando em consideração o momento da administração da hCG (hCG-indução, hCG-D0 e hCG-D2; n=18 éguas/grupo).

Quando estes grupos foram comparados entre si e ao grupo controle, não foi detectado efeito do momento da administração da hCG ($P>0,1$), assim como efeito do tratamento com hCG para as três variáveis objetivas ($P>0,1$).

Quando os dados foram analisados ao longo dos dias, dentro de cada grupo, um efeito do tempo foi observado em todos os grupos experimentais ($P < 0,0001$). O número de pixels coloridos, área luteal vascularizada e intensidade total dos pixels aumentaram significativamente a partir de D2 até D6 nos grupos hCG-Indução e hCG-D2. Nos grupos hCG-D0 e controle, foram detectadas diferenças significativas entre D2 a D4, e D5 a D7 (Figura 27).

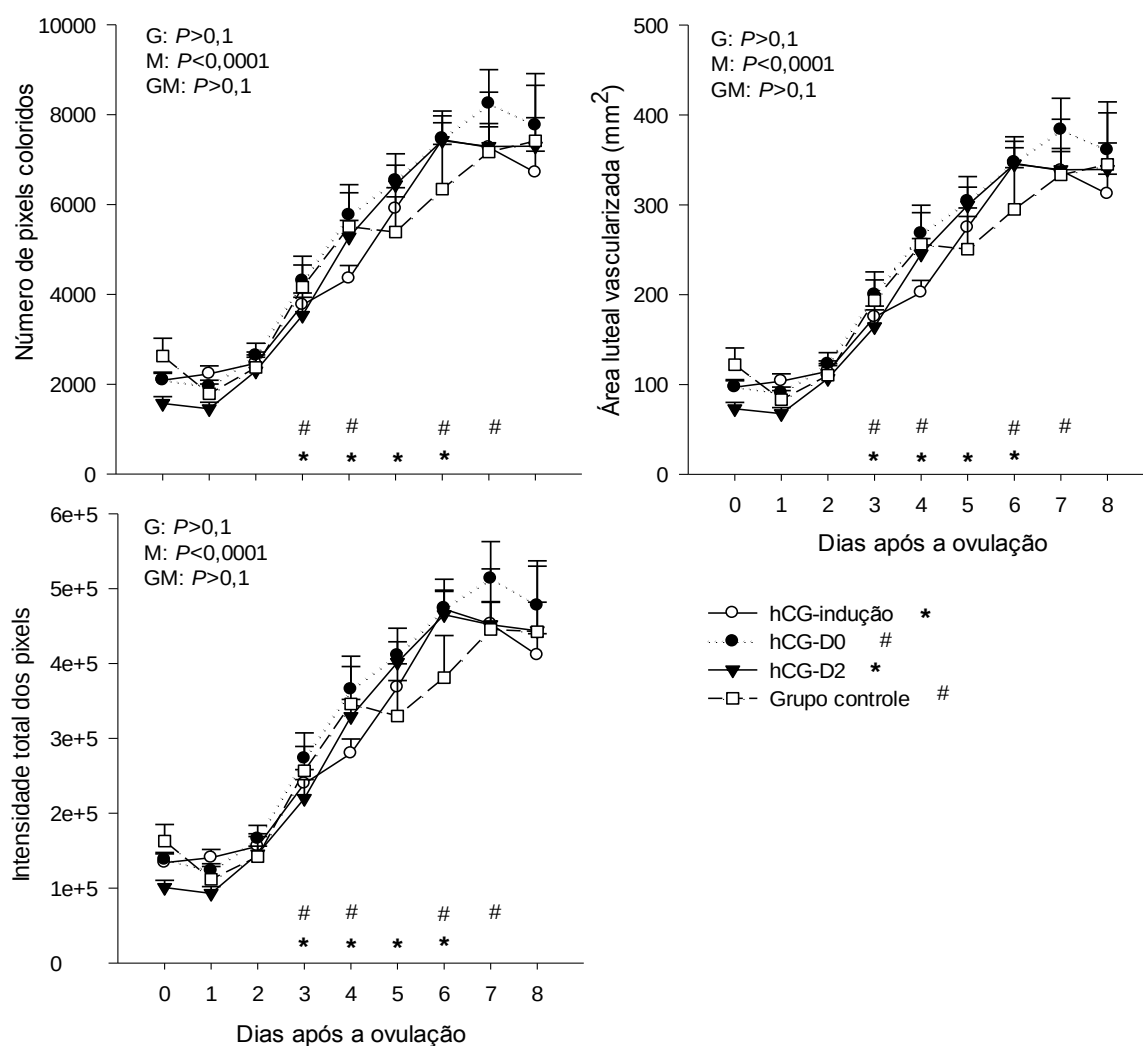


Figura 27. Média ($\pm$ e.p.m) para número de pixels coloridos, área luteal vascularizada (mm^2) e intensidade, durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas hCG ($n=18$ éguas/grupo) em distintos momentos do ciclo estral, e sem tratamento (Grupo controle, $n=6$). Valores P para efeito de grupo (G), momento (M) e a interação grupo-momento (GM) estão expressos no gráfico. Símbolos (*) e (#) indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao momento anterior.

Quando avaliada a concentração plasmática de P4 não houve diferença ($P>0,1$) entre as distintas doses de hCG, dentro de cada momento (Figura 28).

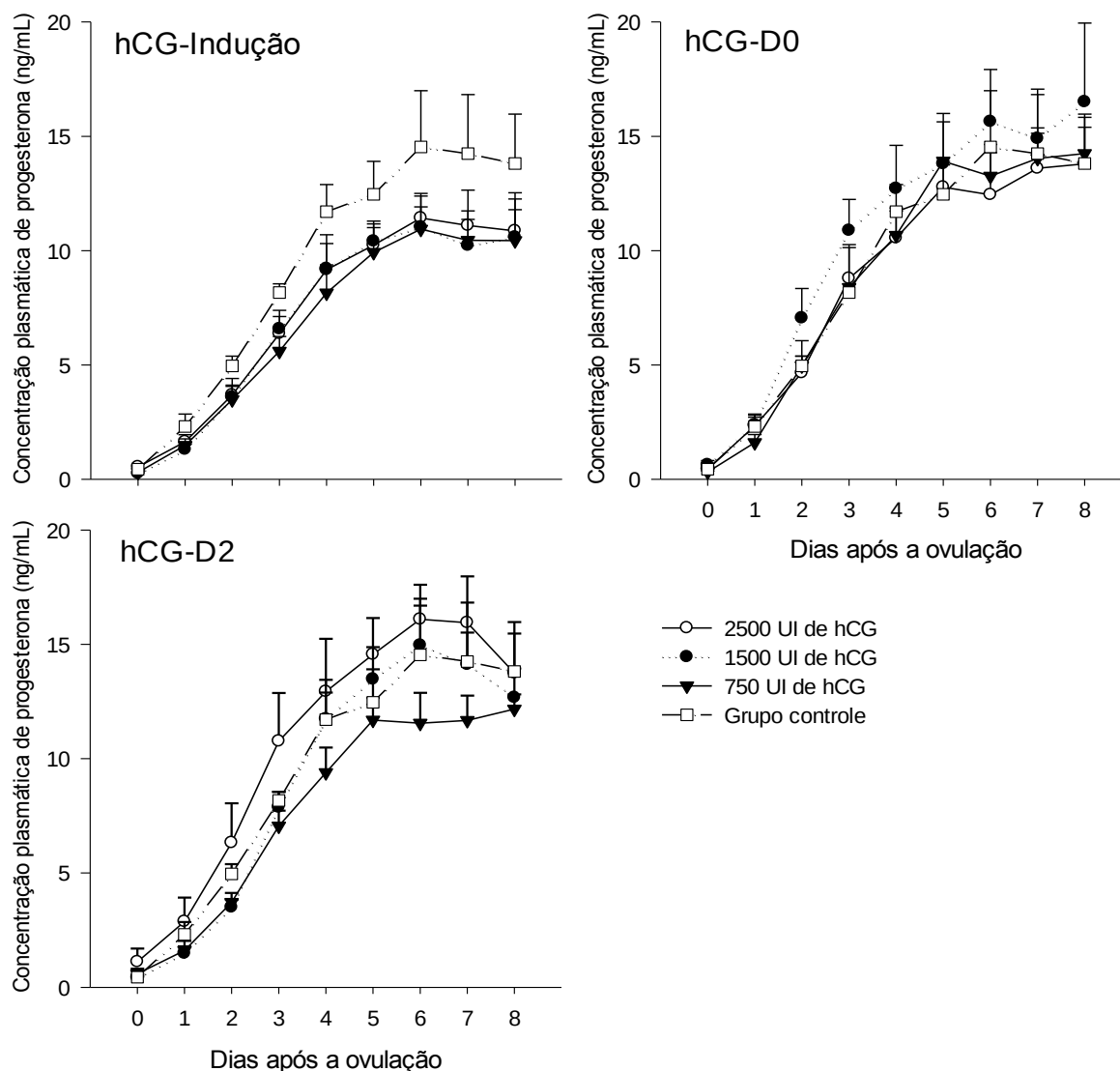


Figura 28. Média ($\pm$ e.p.m) para concentração plasmática de progesterona (ng/mL), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com 2500, 1500 ou 750 UI de hCG em distintos momentos do ciclo estral e, éguas sem tratamento (Grupo controle; $n=6$ éguas/grupo). Não houve diferença significativa para efeito de grupo ($P>0,1$).

Como não foi detectado efeito de dose, os dados para concentração plasmática de P4 foram analisados conjuntamente, de acordo com o momento do tratamento. Semelhante ao observado para PV luteal, a concentração plasmática de P4 não diferiu entre grupos hCG-Indução, hCG-D0 e hCG-D2 ($P>0,1$), dentro da cada momento. Quando foram comparados ao grupo

controle, não foi detectada diferença significativa, não havendo, desta forma, efeito do tratamento ($P>0,1$).

A concentração plasmática de P4, avaliada ao longo do tempo, aumentou significativamente ($P<0,0001$) a partir de D0 até D4, nos grupos hCG-Indução e hCG-D2, e entre D0 e D3, nos grupos hCG-D0. Valores numéricos máximos foram atingidos, em média, no 6º dia pós-ovulação, exceto para o grupo hCG-D0 que alcançou concentração máxima, no D8 (Figura 29).

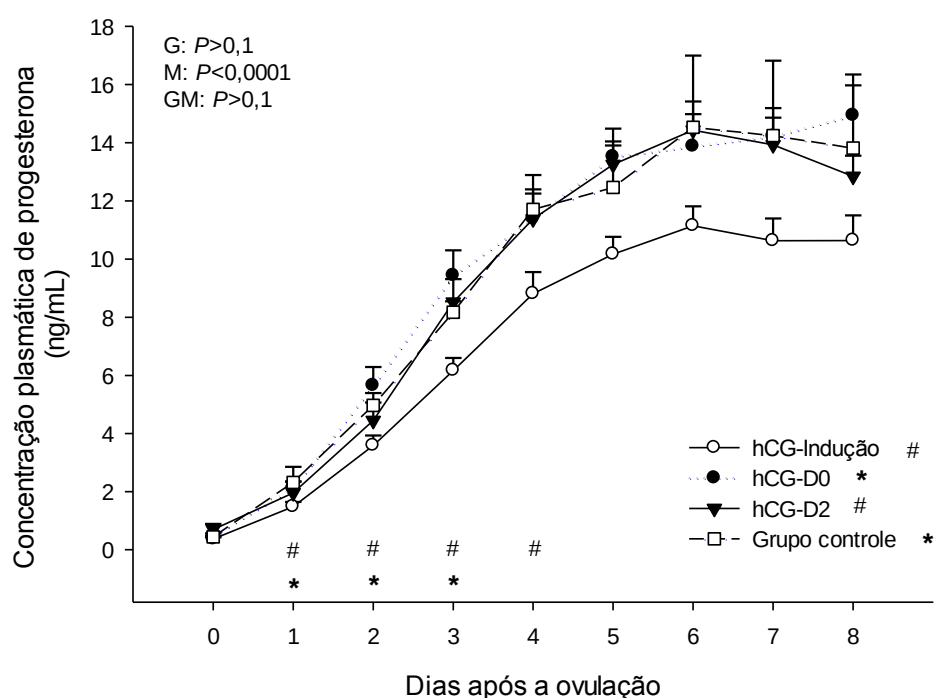


Figura 29. Média ($\pm$ e.p.m) para concentração plasmática de progesterona (ng/mL), durante oito dias após ovulação, de éguas tratadas com hCG ($n=18$ éguas/grupo), em distintos momentos do ciclo estral e, sem tratamento (Grupo controle, $n=6$). Valores P para efeito de grupo (G), momento (M) e a interação grupo-momento (GM) estão expressos no gráfico. Símbolos (*) e (#) indicam diferença estatística do dia sinalizado em relação ao momento anterior.

Com objetivo de descrever e correlacionar o desenvolvimento estrutural e funcional do CL, e os métodos de avaliação da PV luteal, uma nova análise foi realizada. Uma vez que não houve efeito da dose e do tratamento com hCG, para todas as variáveis, dentro de cada momento ($P>0,1$), os dados dos 60 ciclos estrais acompanhados no experimento foram unificados.

Em relação ao desenvolvimento estrutural e funcional do CL, observou-se correlação positiva entre a área e o volume luteal ($r=0,75$; $P<0,0001$), e baixa correlação de ambos com a PV luteal subjetiva ($r=-0,12$; $P<0,001$ e $r=-0,07$; $P=0,08$), e com a concentração plasmática de P4 ($r=0,13$; $P<0,01$ e $r=0,14$; $P<0,01$), respectivamente. Por outro lado, a PV luteal subjetiva apresentou alta correlação com a concentração plasmática de P4 ($r=0,94$; $P<0,001$).

O número de pixels coloridos, área luteal vascularizada e intensidade apresentaram correlação com a PV luteal subjetiva ($r=0,82$, $r=0,81$ e $r=0,82$; $P<0,0001$) e, com a concentração plasmática de P4 ($r=0,76$, $r=0,75$ e $r=0,76$; $P<0,0001$; Figura 30).

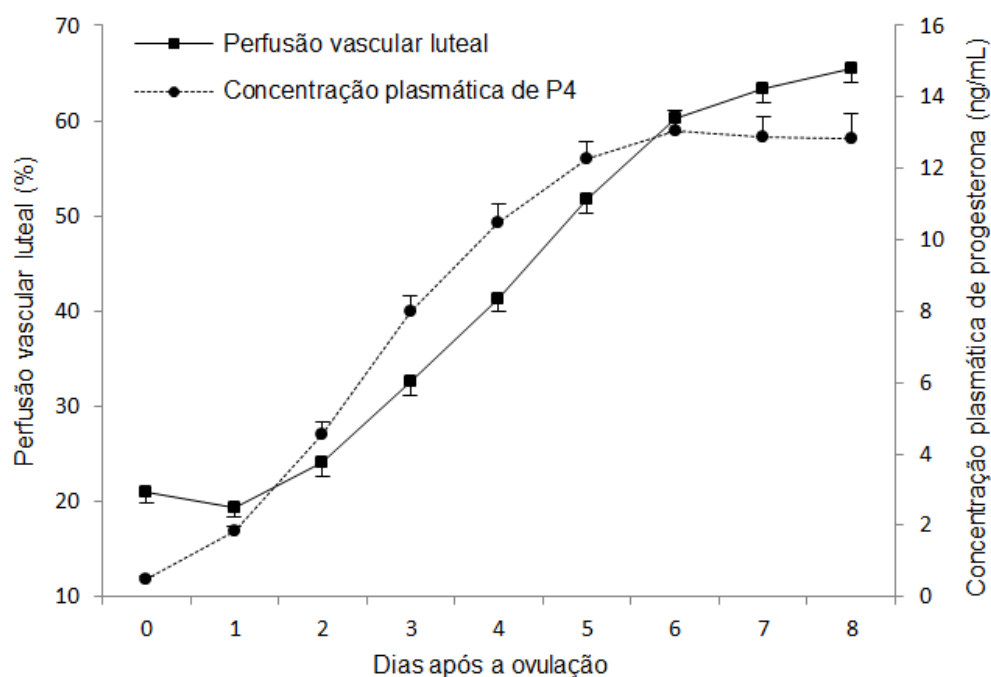


Figura 30. Média ($\pm$ e.p.m) para perfusão vascular luteal (%) e concentração plasmática de progesterona (ng/mL) de éguas durante oito dias após ovulação ($n=60$ ciclos).

6. DISCUSSÃO

Todas as éguas tratadas com hCG na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro, ovularam entre 24 a 48 horas pós-tratamento. Desta forma, as subdoses de 750 e 1500 UI de hCG foram tão eficazes quanto 2500 UI para indução da ovulação, no intervalo de tempo esperado, como previamente descrito por Gastal et al. (2006a).

A PV folicular apresentou um perfil semelhante durante as 36 primeiras horas pós-tratamento, entre os grupos tratados com hCG, independente da dose, e o grupo controle, semelhante ao descrito por Gastal et al. (2006b). Contudo, diferente ao observado por estes pesquisadores, em nosso estudo, não foi detectado efeito do tempo sobre a PV folicular, dentro do mesmo grupo. Apesar da PV folicular aumentar numericamente entre o momento inicial (H0) e final (H36), este aumento não atingiu diferença estatística entre os grupos no presente experimento. Semelhante aos valores brutos, a variação relativa não diferiu estatisticamente entre os grupos. Desta maneira, como a hCG não resultou em alterações significativas na PV folicular pós-tratamento, a predição da eficácia do tratamento indutor de ovulação com hCG, por meio da US Doppler não foi possível.

Embora o FSH e o LH estejam envolvidos com a proliferação de células foliculares e maturação folicular (EVANS et al., 1997), e a perfusão sanguínea aumente de acordo com a maturação folicular (GASTAL et al., 2006b), a administração exógena destas gonadotrofinas, individualmente, não resultou em aumento da PV ovariana e folicular (ALTERMATTA et al., 2012). Da mesma maneira, a ação LH da molécula da hCG apesar de desencadear o processo de maturação folicular e ovulação, previamente descrito por Richards et al. (2002), não promoveu aumento da PV folicular após o tratamento, em nosso estudo, independente da dose utilizada.

Resultados preliminares obtidos por Uliane et al. (2011), demonstraram que não houve diferença na hemodinâmica folicular de éguas após o tratamento tanto com hCG quanto com deslorelina. A PV folicular aumentou de 17% para 52% entre a indução da ovulação e a última avaliação prévia a ovulação, no grupo deslorelina, respectivamente, enquanto que no grupo hCG aumentou de 26% para 64%, porém, não foi descrito se este aumento diferiu

estatisticamente ao longo do tempo, dentro de cada grupo. Boakari et al. (2013), apresentaram resultados preliminares, em quem não foi detectada alterações significativas na PV do folículo pré-ovulatório durante as 36 primeiras horas pós-tratamento com deslorelina.

No presente estudo foi observado que durante as 24 horas que antecedem a ovulação, a PV folicular se manteve sem alterações significativas, próximo aos 40%, ao passo que Gastal et al. (2006b), observaram uma queda brusca da PV folicular nas 4 horas previas a ovulação. No entanto, a frequência de avaliações realizadas nos dois estudos foi diferente. Enquanto Gastal et al. (2006b), realizaram exames a cada hora até a detecção da ovulação, no presente estudo os exames foram realizados a cada 6 horas, podendo não ter sido detectado o decréscimo da PV do folículo pré-ovulatório

A utilização da hCG, para induzir a ovulação em vacas leiteiras submetidas a protocolos de IATF, resultou em maior concentração plasmática de P4 e melhor fertilidade, comparado ao GnRH, em um período caracterizado pela baixa performance reprodutiva devido ao estresse pelo calor (RENSIS et al., 2008). Por outro lado, Rajamahendran & Sianangama (1992), não observaram este incremento na produção de P4 em condições ambientais normais.

Em equinos, um efeito benéfico sobre a concentração plasmática de P4 em decorrência a ação LH semelhante da molécula de hCG, quando utilizada para induzir a ovulação, foi descrito por Fleury et al. (2007). Contudo, Urquieta et al. (2009), relataram que a hCG não afetou o desenvolvimento estrutural e funcional do CL tanto de éguas cíclicas quanto éguas que se tornaram gestantes. Da mesma forma, em nosso estudo, quando as éguas induzidas com hCG foram comparadas às éguas com ovulações espontâneas, não detectou-se diferença significativa para área, volume, PV luteal e concentração plasmática de P4. Embora a hCG seja capaz de desencadear uma cascata de eventos que resulta no processo de ovulação e formação do CL (RICHARDS et al., 2002), a hipótese que o uso da hCG, para induzir a ovulação, apresenta efeito benéfico no desenvolvimento funcional do CL não foi observada, independente da dose utilizada.

Em casos de ovulações espontâneas, as éguas apresentam um período longo de exposição às concentrações elevadas de LH, necessária para o

processo de maturação folicular, ovulação e luteogênese (GINTHER, 1992). Apesar do tempo entre a presença de folículos ≥ 35 mm e a ovulação ser menor em éguas com ovulações induzidas, e conseqüentemente, o tempo de exposição ao LH ser reduzido, segundo Ginther et al. (2009), a hCG desencadeia um aumento acentuado nas concentrações de LH endógeno durante as 36 horas pós-tratamento. Contudo, quando padronizados pela ovulação, o perfil da concentração de LH durante as 48 horas prévias a ovulação e durante quatro dias pós-ovulação, foi semelhante em éguas com ovulações induzidas ou espontâneas. Este fato possivelmente explica os resultados encontrados no presente estudo, em que não foi observado efeito benéfico da hCG sobre o desenvolvimento luteal, provavelmente por desencadear um aumento nas concentrações de LH endógeno suficientes para promover adequada luteogênese.

O diâmetro folicular não afetou diretamente a formação estrutural e funcional do CL. Apesar de éguas com ovulações induzidas terem o diâmetro folicular menor no último exame prévio à ovulação, comparadas às éguas com ovulações espontâneas, a área e o volume luteal, assim como a concentração plasmática de P4 e a PV luteal foram semelhantes entre elas.

No presente estudo, nenhuma alteração foi detectada no desenvolvimento funcional do CL em decorrência à PV do folículo pré-ovulatório elevada. Éguas com ovulação induzida com 2500 UI de hCG e com baixa PV folicular ($35,5 \pm 1,7\%$) 12 horas antes da ovulação, originaram CLs com extensa área vascularizada e adequada produção de P4, da mesma maneira que éguas com folículos com alta PV ($62,5 \pm 5,2\%$). Portanto, sugere-se que o *status* funcional do CL não é afetado pela PV do folículo pré-ovulatório. Desta maneira, o aumento na taxa de prenhez relatado por Silva et al. (2006), pode estar mais relacionado a fatores intrafoliculares e à maturação oocitária do que ao desenvolvimento estrutural e funcional do CL.

A hCG, por ter uma ação biológica e uma afinidade de aproximadamente 80% ao LH (COLE, 2009), tem sido alvo de estudos sobre sua influência no desenvolvimento do CL, concentração de P4 e fertilidade, em diferentes espécies, não apenas para induzir a ovulação, mas também utilizada durante o diestro.

Um efeito benéfico da hCG sobre a luteogênese, concentração plasmática de P4 e fertilidade, quando utilizada pós-ovulação, foi descrito na espécie bovina (RAJAMAHENDRAN & SIANANGAMA, 1992; SANTOS et al., 2001; BEINDORFF et al., 2009; RIZOS et al., 2012). Na espécie equina, os resultados descritos na literatura ainda são conflitantes sobre a influência da hCG na luteogênese e índices reprodutivos. Estudo realizado por Kelly et al. (1988), *in vitro*, demonstrou que o LH equino assim como a hCG foram capazes de estimular a secreção de P4. Neste mesmo estudo, observou-se *in vivo* aumento na concentração sérica de P4 entre D7 e D14, após administrações consecutivas de 1000 IU no 3º, 4º e 5º dia após o final do estro.

Em outro estudo, Fleury et al. (2007), observaram que a administração de 2500 UI de hCG um dia pós-ovulação resultou na antecipação da maturação do CL, representada pelo aumento acentuado das concentrações plasmáticas de P4 no D4, comparadas ao grupo controle. No mesmo estudo, quando a hCG foi utilizada em programas de transferência de embriões, no dia da inovulação embrionária (D5 a D8), a concentração plasmática de P4 aumentou significativamente entre o momento da administração e o D13.

Segundo Watson et al. (1995), apesar de não ter sido detectada uma relação temporal entre LH e P4, a administração de hCG no D8, resultou em aumento das concentrações de P4 pós-tratamento, com coletas de sangue a cada 15 min durante 6 horas pós-tratamento, em três de quatro éguas, analisadas individualmente ($P < 0,01$). Desta maneira, os autores sugerem que o uso de uma substância LH semelhante pode modificar a funcionalidade do CL. Contudo, Hendriks et al. (2006), não observaram influência da hCG, administrada no 7º dia pós-ovulação, sobre a fluxo sanguíneo ovariano, PV luteal e concentração plasmática de P4 ao longo de 10 dias pós-tratamento. Adicionalmente, McCue et al. (2012), relataram que receptoras de embrião tratadas com hCG, no dia da inovulação, apresentaram menor taxa de prenhez (72,1%) comparadas à éguas tratadas com GnRH (86,9%) e solução salina (88,5% n=61/grupo).

Como a maturação das células luteais ocorre entre três a cinco dias após a ovulação (BERGFELT & ADAMS, 2011), a hipótese do presente estudo foi que o fornecimento adicional de LH, previamente a este período, resultasse em melhor processo de luteinização e, conseqüentemente, maior concentração

plasmática de P4. Contudo, foi observado que as administrações de hCG, no D0 ou D2, não resultou em melhora no desenvolvimento estrutural e funcional do CL, por meio da avaliação da concentração plasmática de P4, área, volume e PV luteal.

Em bovinos, a hCG administrada no 8º dia pós-ovulação desencadeou a ovulação e luteinização dos maiores folículos durante o diestro, o que resultou no aumento do número de corpos lúteos secundários e, conseqüentemente, maior concentração plasmática de P4 e taxa de prenhez (RAJAMAHENDRAN & SIANANGAMA,1992). Resultados semelhantes foram descritos por Santos et al. (2001) quando a hCG foi administrada no 5º dia pós-ovulação. Rizos et al. (2012), observaram que além da formação dos CLs acessórios, houve hipertrofia do CL original, entre D7 e D14 pós-ovulação, em vacas tratadas com hCG no D5 e que receberam o embrião no D7. Tal fato resultou no aumento da concentração plasmática de P4 e do tamanho dos conceptos recuperados no 14º dia pós-ovulação, após abate dos animais, comparado com o grupo controle.

A formação de CLs secundários em éguas, em decorrência a ação da hCG, quando administrada durante o diestro, não foi observada no presente estudo, possivelmente pelo fato que a maioria dos ciclos estrais de éguas apresenta apenas uma onda de crescimento folicular. Nestes casos, durante o início do diestro, momento em que foi administrada a hCG, folículos que estão em crescimento ainda não são responsivos à indução da ovulação ou ao processo de luteinização, como observado em vacas (Rajamahendran & Sianangama,1992; Santos et al., 2001; Rizos et al., 2012). Contudo, Beindorff et al. (2009), detectaram uma elevação temporária na PV luteal seguido de aumento imediato e prolongado na concentração plasmática de P4 após tratamento com hCG no D7, na ausência de CLs secundários, em decorrência a aspiração dos folículos maiores que 5 mm de diâmetro no D6. Adicionalmente, Rizos et al. (2012), observaram aumento na área de tecido luteal após administração da hCG e maior concentração de P4 pós-tratamento com hCG. Desta maneira, além da formação de CLs secundários, torna-se evidente a influência da hCG no desenvolvimento estrutural e funcional do CL na espécie bovina, diferente do observado na espécie equina neste trabalho,

sendo provável que haja uma diferença fisiológica entre as espécies em resposta a hCG sobre a luteogênese e produção de P4.

Em éguas, as concentrações endógenas de LH ainda permanecem em níveis elevados por dois dias pós-ovulação, em média, tanto em éguas com ovulações espontâneas quanto éguas com tratadas com hCG (GINTHER et al., 2009). Estas concentrações de LH, aparentemente, são suficientes para garantir um processo de luteinização adequado, uma vez que semelhante desenvolvimento estrutural e funcional foi observado, no presente estudo, entre éguas tratadas com hCG durante o diestro inicial e éguas do grupo controle.

A baixa PV luteal subjetiva encontrada durante as primeiras 48 horas pós-ovulação, com média de $21,5 \pm 0,71\%$ de pontos coloridos Doppler presentes na área luteinizada, é possivelmente decorrente de um processo de vascularização inicialmente baixo, uma vez que Alziabi et al. (2003), observaram baixa quantidade de vasos presentes na estrutura luteal, obtidos por análises histológicas.

Um perfil semelhante entre perfusão vascular luteal e a concentração plasmática de P4, observadas em todos os grupos experimentais, corroboram com os resultados de estudos prévios (GINTHER, 2007; GINTHER et al., 2007, 2008). A rápida proliferação das células endoteliais e o estabelecimento de uma densa rede de capilares ocorrem durante a fase luteal inicial e intermediária, o que é necessário para síntese e secreção de P4 (GINTHER, 1992; ALZIABI et al., 2003; FERREIRA-DIAS et al., 2006). O aumento progressivo na concentração plasmática de P4 e a alta correlação positiva com os parâmetros Doppler, observados no presente trabalho, foram similares a estudos prévios em éguas com ovulações espontâneas (BOLLWEIN et al., 2002; GINTHER et al., 2007).

Segundo Arruda et al. (2001), em éguas a atividade funcional do CL não depende de sua dimensão, uma vez que não houve relação entre a área luteal e a concentração plasmática de P4. Adicionalmente, Bollwein et al. (2002) não observaram relação entre o diâmetro luteal e o fluxo sanguíneo ovariano, em éguas com ovulações espontâneas. A alta correlação positiva detectada, no presente estudo, entre a concentração plasmática de P4 e a PV luteal subjetiva, associada com a ausência de alterações nas dimensões do CL,

indicam que a US Doppler é um método mais eficiente que o convencional modo-B, para avaliação de funcionalidade luteal.

7. CONCLUSÕES

A administração da hCG, independente da dose utilizada, na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro, não promoveu aumento da PV folicular durante as 36 primeiras horas pós-tratamento, não sendo possível prever a eficiência do tratamento por meio da US Doppler.

A administração da hCG, independente da dose utilizada, na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro, no dia da ovulação, ou dois dias pós-ovulação, não influenciou o desenvolvimento estrutural (área e volume) e funcional (PV luteal e concentração plasmática P4) do CL.

A alta correlação entre a PV luteal subjetiva e o número de pixels coloridos, intensidade total dos pixels e área luteal vascularizada demonstra que o método subjetivo de avaliação é eficiente.

8. REFERÊNCIAS

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, 2004a.

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, 2004b.

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.

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

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.D.; CALEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. Existem relações entre o tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.5, p.233-239, 2001.

BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; PENNO, Y.; PAUL, V.; BOLLWEIN, H. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro–microdialyzed corpora lutea. **Theriogenology**, v.72, p.528–534, 2009.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Luteal Development. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, Second Edition, Wiley Blackwell, pp.2055-2064, 2011.

BERISHA, B.; WELTER, H.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, O.; H.D.MEYER, H.; SCHAMS, D. Expression of Fibroblasti Growth Factor (FGF1) e FGF7 in mature follicle during the periovulatory period after GnRH in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p. 307-313, 2006.

BERISHA, B.; STEFFL, M.; WELTER, H.; KLIEMA, H.; H. D. MEYERA, 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.

BOAKARI, Y. A.; FERREIRA, J. C.; CANESIN, H. S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography evaluation of vascularity in the wall of preovulatory follicles in mares treated with deslorelin: preliminary results In: III Congreso Argentino de Reproducción Equina, 2013, Buenos Aires. **Reproducción Equina III**. Rio Cuarto: Unirio, v.1, p.130-133, 2013.

BOERBOOM, D. e SIROIS, J. Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles. **Endocrinology**, v.139, p.1662-1670, 1998.

BOLLWEIN, H.; KOLBERG, B.F.; STOLA, R. The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.61, p.1137-1146, 2004a.

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.

BOLLWEIN, H.; MAYER R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 597-605, 2003.

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

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 129-38, 2002b.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; STEFFEN, S.; STOLA, R. The effect of acetylsalicylic acid and captopril on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.61, p.301-309, 2004b.

BROWN, K.A.; BOERBOOM, D.; BOUCHARD, N.; DORE M., LUSSIER, J.G.; SIROIS, J. Human chorionic gonadotropin-dependent regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in preovulatory follicles and its potential role in follicular luteinization. **Endocrinology**, v.145, p.1906–1915, 2004.

COLE, L.A. New discoveries in the biology and detection of hCG . **Reproductive biology and endocrinology**, v.7:8, p.1-37. Review.

EVANS, T.J.; CONSTANTINESC, C.M.; GANJAM, V.K. Clinical Rreproductive Anatomy and Physiology of the mare. In: Youngquist, R.S., **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 1st edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p.43–70, 1997.

FERREIRA-DIAS, G.; PINTO BRAVO, P.; MATEUS, L.; REDMERC, D.A. MEDEIROS, J.A. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.30, p. 247–259, 2006.

FERREIRA, J.C., IGNÁCIO, F.S., MEIRA, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during early gestation in mares: new concepts of evaluation. **Animal Reproduction Science**, v.121, p. 281–283, 2010.

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.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; SOUSA, F.A.C.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. **Rev Bras Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 31, p. 27-31, 2007.

FORTUNE, J.E., RIVIERA, G.M., EVANS, A.C.O., TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p.648-654, 2001.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biology of Reproduction**, v.61, p.724-730, 1999.

GASTAL, E.L.; SILVA, L.A.; GASTAL, M.O.; EVANS, M.J. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares, **Animal Reproduction Science**, v.94, p.186 -190, 2006a.

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, 2006b.

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p. 213-220, 2007.

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

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

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography**. Cross Plains: Equiservices, p.258, 2007.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques and Potencial. **Journal of Equine Veterinary Science**, p.516- 526, 2004.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**, 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 642p., 1992.

HENDRIKS, W.K.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Effect of administering PGF₂ or hCG on day 7 after ovulation on ovarian, uterine and luteal blood flow in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.223–225, 2006.

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(4), p.371-372, 1983.

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

KERBAN, A.; 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.

MCCUE, P.M.; ARNOLD, L.K.; CARROLL, B.S.; BURDEN, C.A.; GRAGG, D.M.; SCOFIELD, D.B.; HATZEL, J.N.; FERRIS, R.A. Administration of deslorelin or hCG at the time of embryo transfer: effect on pregnancy rates in recipient mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.415, 2012. In: 8th International Symposium in Equine Embryo Transfer – ISEET, Vancouver/BC, Canadá, 2012.

MORTENSEN, C.J.; CHOI, Y.H.; HINRICHS, K; ING, N.H.; KRAEMER, D.C.; VOGELSANG, S.G.; VOGELSANG, M.M. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.237-244, 2009.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.

NEWCOMBE. Human Chorionic Gonadotrophin. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, Second Edition, Wiley Blackwell, pp.1804-1810, 2011.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.

RAJAMAHENDRAN, R.; SIANANGAMA, P.C. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. **J. Reprod. Fert**, v.92, p. 577-584, 1992.

RENSIS, F.; VALENTINI, R.; GORRIERI, F.; BOTTARELLI, E.; LOPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v.69, p.1077–1082, 2008.

RICHARDS, J.S.; RUSSEL, D.L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L.L. Ovulation: new dimension and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**, v.64, p.69-92, 2002.

RIZOS, D.; SCULLY, S.; KELLY, A.K.; EALY, A.D.; MOROS, R.; DUFFY, P.; NAIB, A.A.; FORDE, N.; LONERGAN, P. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.472–481, 2012.

ROMANO, R. M.; FERREIRA, J. C.; CANESIN, H. S.; IGNÁCIO, F. S.; NOVAES FILHO, L. F.; MEIRA, C. Luteal vascular perfusion and plasma progesterone concentration are not affected by the vascularity of preovulatory follicle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p. 421, 2012.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; POOL, L.; OVERTON, M.W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **J. Anim. Sci**, v.79, p.2881–2894, 2001.

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.

SILVA, L.A. Ultrassonografia Doppler na reprodução equina: presente e futuro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária + Equina**, v.29, p.66-77, 2010.

SILVA, L.A., GASTAL, E. L., BEG, M. A., GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, .v.72(3), p.755-761, 2005.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GUINTEHER, 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.

SMITH R.L.; VERNON, K.L.; KELLEY, D.E.; GIBBONS, J.R.; MORTENSEN, C.J. Impact of moderate exercise on ovarian blood flow and early embryonic outcomes in mares. **Journal of animal science**, v.90(11), p.3770-3777, 2012.

STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v.9, p.210-216, 2012.

ULIANI, R.C.; SILVA, L.A.; ALVARENGA, M.A. Variation on vascularization of follicles induced to ovulate with hCG and GnRH evaluated by Doppler ultrasonography - preliminary results. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2011. 39 (Suppl 1): Abstracts - 25th Annual Meeting SBTE-Brazil. August 2011.

URQUIETA, B.; DURA, M.C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V.H. hCG-Induced Ovulation in Thoroughbred Mares Does Not Affect Corpus luteum Development and Function During Early Pregnancy. **Reprod Dom Anim**, v.44, p.859–864, 2009.

WATSON, E.D. e SERTICH, P.L. Concentrations of arachidonic metabolites, steroids and histamine in preovulatory horse follicles after administration of human chorionic gonadotropin and the effect of intrafollicular injection of indomethacin. **Journal of Endocrinology**, v.129, p.131-139, 1991.

WATSON, E.D.; COLSTON, M.; BROADLEY, C. LH and Progesterone concentrations during diestrus in the mare and effect of hCG. **Theriogenology**, v.43, p.1325-1337, 1995.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

9.1 Trabalho enviado para a revista “Livestock Science”.

Use of Human Chorionic Gonadotrophin for ovulation induction or during the early diestrus does not affect the corpus luteum development and secretory function

R.M. Romano^{1*}, J.C. Ferreira¹, H.S. Canesin¹, F.S. Ignácio¹, L.F. Novaes Filho¹, Y.L. Boakari¹, J.C.F. Pantoja¹, C. Meira^{1#}

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Correspondence should be addressed to R.M. Romano or C. Meira. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu/SP, Brasil, Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970.

*rafa_mromano@yahoo.com.br or #meira@fmvz.unesp.br

Abstract

Currently, human chorionic gonadotrophin (hCG) has been used to induce ovulation and as a luteotrophic agent in cattle. However, influence of hCG therapy on the functional status of equine CL is unclear at this moment. This study aimed to characterize the hemodynamic and secretory function of early and midcycle corpus luteum (CL) of mares treated with different doses of hCG at distinct stages of the estrus cycle. Mares were assigned into nine experimental groups (n=6 mares/group) according to dose of hCG and moment of treatment. A single i.v. injection of one of three different doses of hCG (750, 1500 or 2500 IU) were performed in one

of three distinct stages of the estrus cycle: a) dominant follicle $\geq 35\text{mm}$ associated with uterine edema (Induction group), b) day of ovulation (D0 group), or c) 48 hours after ovulation (D2 group). Additionally, a Control group, treated with NaCl 0.9% ($n=6$) was included in the experimental approach. Mode-B and Doppler ultrasonography were used to evaluate luteal vascular perfusion, number of colored pixels, total pixel intensity and area of the CL from D0 to D8 (D0 = day of ovulation). Blood samples were collected immediately before each exam to measure plasma progesterone (P4) concentration. Diestrus ovulations were not detected. No effect of dose and moment of treatment was detected for all end points, within each day. Luteal area did not differ throughout the days ($P>0.1$), while Doppler parameters and plasma P4 concentration presented a significant increase during the experiment in all experimental groups. Secretory function and hemodynamic of the CL were not affected ($P>0.1$) by hCG dose and moment of treatment. In conclusion, hCG therapy during estrus or early diestrus, independently of dose, does not improve luteal blood flow and progesterone synthesis in mares.

Keywords: Doppler ultrasonography, vascular perfusion, corpus luteum, mare, hCG

Introduction

The corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland responsible for progesterone (P4) synthesis. Physiological functionality of this dynamic structure requires a prompt development of an extensive vascular network (Ginther, 2007) and an intense and progressive luteal angiogenesis is observed during early diestrus (Alziabi et al., 2003).

Color Doppler ultrasonography is a non-invasive real time pulse-wave technique currently used for transrectal study of the reproductive system hemodynamics in large animals. This technology has been used to evaluate blood flow of vessels and tissues such that changes in number, direction and velocity of red cells originate ultrasonic images with specific

colors and tonalities (Ginther, 2007). Considering the extensive luteal vascular network, Doppler ultrasonography has proven to be an efficient real time method for *in vivo* evaluation of structural and functional status of the CL in mares (Bergfelt and Adams, 2011).

Luteinizing Hormone (LH) is essential for the luteogenesis process and adequate functionality of the CL (Niswender et al., 2000), whereas human chorionic gonadotrophin (hCG) is a glycoprotein with a LH-like biological activity with luteotrophic action (Newcombe, 2011). Currently, hCG therapy has been used to improve luteal secretory function and fertility in cattle (Rajamahendran and Sianangama, 1992; Rensis et al., 2008; Beindorff et al., 2009; Rizos et al., 2012). Similarly, *in vivo* and *in vitro* studies suggested a positive correlation between hCG supply, plasma P4 concentration and fertility in mares (Kelly et al., 1988; Fleury et al., 2007). However, Urquieta et al. (2009) and Hendriks et al. (2006) reported no influence of hCG therapy during estrus and early diestrus on future CL functionality. As luteal cells maturation occurs until the first three or four days after ovulation in mares (Bergfelt and Adams, 2011), an exogenous LH supply during the end of estrus or initial diestrus may have potential to improve luteogenesis. Therefore, considering the unclear influence of hCG on equine CL functionally at this moment, the real effect of hCG therapy on P4 synthesis and luteal angiogenesis must be clarified.

The main purpose of this study was to characterize the hemodynamic and secretory function of early and midcycle CLs of mares treated with different doses of hCG at distinct stages of the estrus cycle. Specific goals were: a) to determine the temporal relationship between luteal blood flow, area of the CL and plasma P4 concentration of mares treated with hCG, b) to test the hypothesis that hCG therapy in the presence of a pre-ovulatory follicle, at the day of ovulation, or two days after ovulation, improves synthesis of P4, and c) to test the hypothesis that hCG influence on the angiogenesis and functionality of the equine CL is dose-dependent.

Material and methods

Animals and experimental groups

A total of 25 cycling mixed breed mares with 4 to 18 years of age, weighing 250-400 kg were used. Animals were handled in accordance with São Paulo State University Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Research. All mares were maintained on grass hay, pelleted feed and trace-mineralized salt with free access to water. Score for body condition for all mares was high throughout the experiment according to Henneke et al. (1983). Age of mares was estimated from dental characteristics as described by the American Association of Equine Practitioners Manual (2002). Mares were scanned daily for follicular development monitoring and ovulation detection using B-mode ultrasonography.

Prior to the beginning of the experiment, all mares were submitted to ovulation inducing treatment with 2500 IU of hCG to identify animals with refractory responses to hCG-therapy. Mares that did not ovulate between 24 and 48 hours post-treatment were not used.

Mares were assigned into nine experimental groups (n=6 mares/group) according to dose of hCG and moment of treatment. Treatments were performed in one of three distinct stages of the estrus cycle: a) dominant follicle ≥ 35 mm associated with uterine edema (Induction group), b) day of ovulation (D0 group), or c) 48 hours after ovulation (D2 group). A single i.v. injection of one of three different doses of hCG was used: 750, 1500 or 2500 IU (Vetecor[®] 5000 U.I., Calier S.A, Barcelona, Espanha). Only mares with spontaneous ovulation were used on D0 and D2 groups. Additionally, a Control group with non-hCG treated mares (n=6) was included in the experimental approach.

Mares from Control group were treated with a single i.v. injection of 2 mL of 0.9% NaCl solution when a pre-ovulatory follicle ≥ 35 mm associated with uterine edema was detected. In mares from D0, D2 and Control groups, conventional B-mode ultrasonography exam was done

once a day until visualization of a CL determining the day of spontaneous ovulation. Day of ovulation was considered D0.

Ultrasonography

Ultrasonography exam was performed once a day from D0 to D8. Color Doppler ultrasound (Sonoace Pico; Medison do Brasil Ltda) equipped with a linear-array multifrequency transducer (LV5-9CDn, 5 to 9 Mhz) was used for evaluation of vascular perfusion of the CL. Brightness and contrast controls of the monitor and the gain controls of the scanner were standardized to constant settings (Gastal et al, 1998).

Power Doppler function was used to display blood flow signals in the luteal tissue as previously described by Ginther et al. (2007). Vascular perfusion of the CL was initially estimated subjectively considering the percentage (0 to 100%) of luteal tissue with color Doppler signals during real-time imaging and continuous exam with a minimal of 1 minute scan. Objective evaluation, considering the luteal number of color Doppler pixels and total pixel intensity of each ultrasonography exam, was performed to validate the subjective analysis (Audioslide 1). All Power Doppler scans were recorded on a laptop computer equipped with a video capture card (Pinnacle Studio 9). The three more representative frames of each exam were extracted, selected, and saved in JPG and later TIFF format, using the softwares "Free Video to JPG converter v.5.0.22" and Adobe PhotoShop 5.5 (TIFF format, Adobe Systems, San Jose, CA). Number of luteal color Doppler signals was indicated by the total number and intensity of pixels per colored image which are calculated by the software ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD) as previously described by Ginther and Utt. (2004). Doppler intensity indicates the greater blood velocity considering the degree of brightness of the colored pixels (Ginther, 2007). Total pixel intensity of the CL was based in the computer-generated brightness level for each pixel, summed for all pixels (Silva and Ginther, 2009).

The area of the CL (mm^2) was determined using the scanner's tracing function, in one B-mode still image. In case of cavity CLs, the luteinized area was calculated subtracting the cavity area from the total CL area.

Progesterone Assay

Blood samples were collected immediately before each ultrasonography exam by puncture of the jugular vein into vacuum heparinized tubes to measure plasma P4 concentration. After collection, samples were centrifuged (1200g for 10 min). Plasma was separated and stored at -20°C until assayed. Plasma P4 concentration was measured using radioimmunoassay with commercial kit (Coat-a-count progesterone Kit, Diagnostic Product Corporation, DPC, Los Angeles, CA, USA). The intra-assay coefficient of variation and sensitivity of assay were $7.6\pm 0.7\%$ and 0.05 ng/mL , respectively.

Statistical analyses

Linear models of repeated measures were used to compare the means of each response variable between groups and moments, and their interaction (SAS PROC MIXED - Version 9.2 SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Tukey test was used to adjust p-values resulting from multiple comparisons, and group-moment interaction. The level of significance was defined at 0.05. Data are presented as $\text{mean}\pm(\text{s.e.m})$.

Results

Pre-ovulatory follicle diameter at the moment of hCG administration was similar ($35.6\pm 0.23\text{ mm}$; $P>0.1$) between all Induction mares. Mares ovulated between 24 and 48 hours after induction of ovulation, with mean interval of 41.0 ± 1.0 , 38.0 ± 2.0 and 41.0 ± 1.9 hours post-treatment with 2500, 1500 or 750 IU of hCG, respectively. In the Control group, the interval between 0.9% NaCl treatment and spontaneous ovulation detection was significantly greater

(105.6±14.0 hours; $P<0.05$). Follicle diameter on the last scan prior to ovulation of Induction mares was significantly smaller ($P<0.05$) than in mares with spontaneous ovulation (35.5±0.48 mm and 45.2 ±2.63 mm, respectively).

Multiple ovulations were not observed throughout the experiment. The luteal dimension did not differ (562.7±20.6 mm²; $P>0.1$) throughout the days in all experimental groups. No effect ($P>0.1$) of hCG dose and moment of treatment was detected for area of the CL within each day.

Effect of hCG dose was not detected ($P>0.1$) for luteal vascular perfusion and plasma P4 concentration within Induction, D0 and D2 groups (Figure 1). Similarly, number of colored pixels and total pixel intensity were not affected ($P>0.1$) by hCG dose (Figure 2).

As no effect of hCG dose was detected for plasma P4 concentration and Doppler parameters, data were combined to evaluate the influence of moment of treatment independently of the hCG dose. Therefore, hCG-treated mares were divided in Induction, D0 or D2 groups (n=18 mares/group). When compared to Control group, no effect of moment of treatment ($P>0.1$) was observed for luteal vascular perfusion, plasma P4 concentration, number of colored pixels and total pixel intensity (Figure 3).

A progressive increase on vascular perfusion of the CL and plasma P4 concentration were detected in all experimental groups. Progressive increase of luteal vascular perfusion was found ($P<0.001$) from D2 to D6 in Induction, D0 and D2 groups. Significant increase of plasma P4 concentration was detected from D0 to D4 in Induction and D2 groups and from D0 to D3 in D0 and Control groups.

The number of colored pixels and total pixel intensity increased ($P<0.001$) from D2 to D6 in Induction and D2 groups. In D0 and Control groups, objective Doppler parameters (number and intensity of Doppler pixels) increased from D2 to D4 and from D5 to D7.

Area of the CL was not correlated with subjective luteal vascular perfusion ($r=-0.14$; $P<0.0001$) or plasma P4 concentration ($r=0.12$; $P<0.0001$). A positive correlation ($r=0.69$;

$P<0.0001$) was detected between subjective luteal vascular perfusion and plasma P4 concentration (illustrated by Figure 4). Similarly, number of colored pixels and total pixel intensity were positively correlated with the subjective luteal vascular perfusion ($r=0.82$ and $r=0.81$, respectively; $P<0.0001$) and with plasma P4 concentration ($r=0.77$ and $r=0.75$, respectively; $P<0.0001$).

Discussion

The findings of this study demonstrated the absence of hCG influence, independent of dose and moment of treatment, on the functional and structural status of the early and mid CL in mares. Secretory function of the CL was not affected by hCG therapy as previously described (Hendriks et al., 2006; Urquieta et al., 2009). Additionally, the present study characterized for the first time the luteal hemodynamic of mares treated with subdoses of hCG during estrus and early diestrus.

Our data suggest that follicle dimension does not influence directly the following luteogenesis in mares. Although hCG treated mares had smaller follicle diameter during the last exam prior to ovulation detection when compared to spontaneous ovulating mares, no difference was found between groups for area of the CL, plasma P4 concentration and luteal Doppler parameters during the first days of diestrus. Apparently, ovulation inducing-treatment with hCG is able to trigger a cascade of events that result in the ovulation process in mares (Richards et al., 2002) without improvement of luteogenesis and secretory function of the CL in contrast to the described in cattle (Rensis et al., 2008). According to Ginther et al. (2009), hCG supplement of mares with pre-ovulatory follicles induces a greater endogenous LH surge during the first 36 hours post-treatment. Additionally, plasma LH concentrations during early diestrus of mares with induced or spontaneous ovulation are similar.

Subdoses of hCG were just as effective in inducing ovulation within 48 hours post-treatment such as high doses of hCG as previously reported by Gastal et al. (2006). A supposed

beneficial effect on luteal P4 synthesis as a consequence of hCG action when used to induce ovulation described by Fleury et al. (2007) was not detected. Moreover, morphometric parameters and functional status of CLs originated from ovulation inducing treatments with low doses (750 and 1500 IU of hCG) were similar to the observed in mares treated with 2500 IU of hCG or with spontaneous ovulation. According to Urquieta et al. (2009), treatment with 2500 IU of hCG during estrus does not affect CL development. Therefore, the hypothesis that hCG ovulation induction treatment has beneficial effect on luteogenesis in mares, independently of the dose, was not supported.

Plasma P4 concentration and luteal hemodynamics between D0 and D8 of hCG-treated and non-treated mares were similar. According to Kelly et al. (1988), an increased P4 concentration between D7 and D14 after administrations of 1000 IU between three and five days after the end of estrus is observed in mares. Moreover, Fleury et al. (2007) reported an earlier luteogenesis in mares treated with hCG one day post-ovulation. However, the present study demonstrated no influence of hCG on the luteal development when administrated on the day of ovulation detection or two days post-ovulation.

When administrated during diestrus, a positive influence of hCG on plasma P4 concentration is observed in cattle as consequence of early luteogenesis and secondary ovulations (Rajamahendran and Sianangama, 1992; Santos et al., 2001; Rizos et al., 2012). Administration of hCG on day six post-ovulation induces an immediate and long-term rise in P4 concentration and a temporary elevation of luteal blood flow (Beindorff et al., 2009). However, the evident influence of hCG on the functional status and hemodynamics of the bovine CL was not observed in mares of the present study. Probably, the physiological response of hCG-action on luteal angiogenesis and, consequently, progesterone synthesis differs between both species.

The simultaneous changes on plasma P4 concentration and luteal blood flow observed in all experimental groups were expected and confirmed previous studies (Ginther et al.,

2007a; 2007b; 2008). The prompt endothelial cell proliferation with a dense capillary network establishment occurs during early and mid-luteal phases, required for synthesis and secretion of P4 (Ginther, 1992; Alziabi et al., 2003; Ferreira-Dias et al., 2006). The progressive increase on plasma P4 concentration and high positive correlation with Doppler parameters are in agreement with previous reports in mares with spontaneous ovulation (Bollwein et al., 2002; Ginther et al., 2007). No correlation was detected between area of the CL and luteal vascular perfusion or plasma P4 concentration. According to Arruda et al. (2001), secretory functional activity of equine CL does not depend on its size. Additionally, no relationship between luteal diameter and ovarian blood flow was reported in mares by Bollwein et al. (2002). The high positive correlation detected between plasma P4 concentration and luteal vascular perfusion associated with an absence of CL dimension changes during the experiment indicated Doppler technology as a more effective method than conventional ultrasonography for evaluation of luteal functionality.

In conclusion, hCG therapy during estrus or early diestrus, independently of dose, does not improve luteal blood flow and progesterone synthesis in mares. Luteogenesis process and incidence of accessory CL are not affected by supplementation with hCG.

Acknowledgements

This research was financially supported by FAPESP, SP, Brazil.

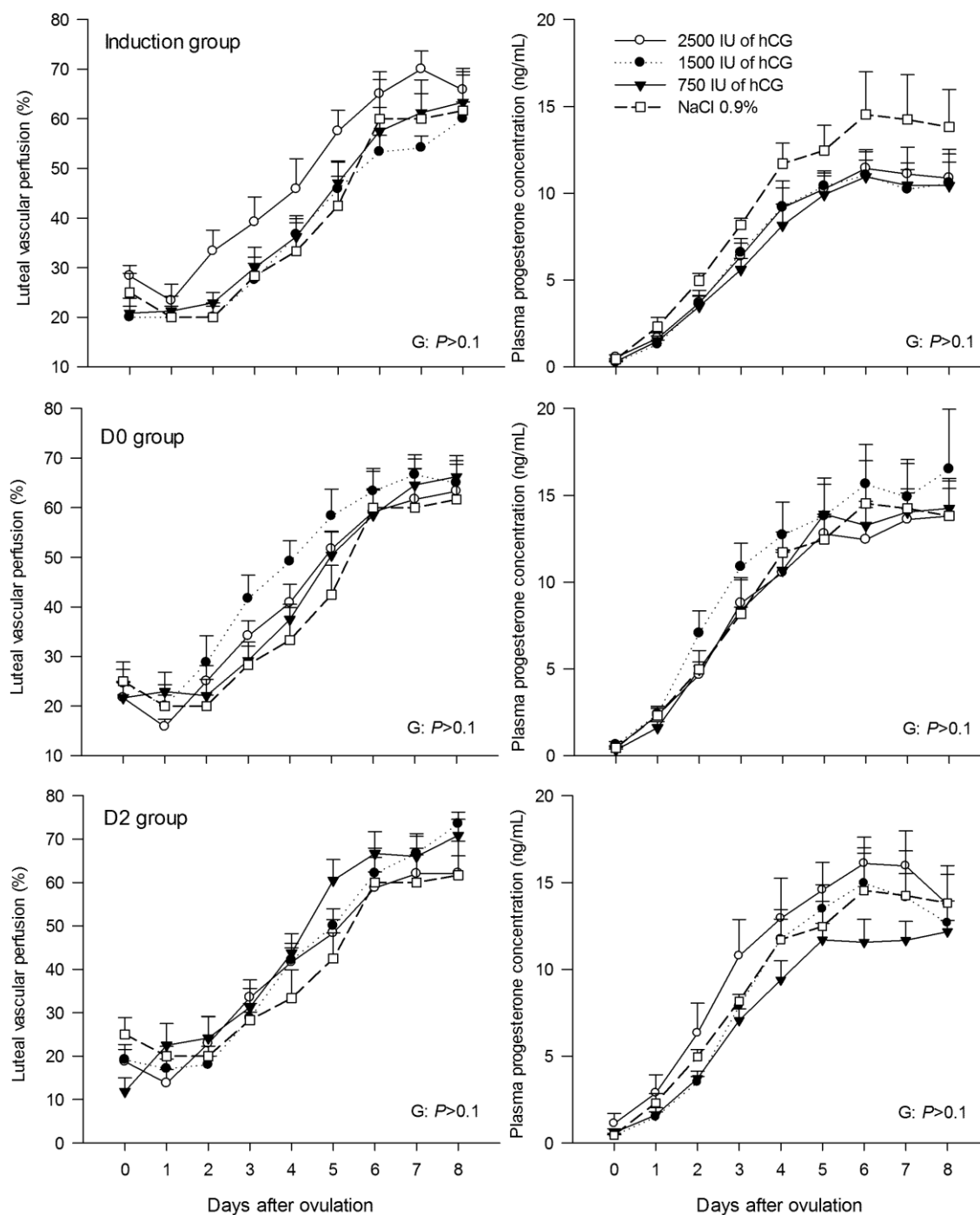


Figure 1. Mean ($\pm$ s.e.m.) for luteal vascular perfusion (%) and plasma P4 concentration (ng/mL) of mares treated with 2500, 1500, 750 IU of hCG ($n=6$ mares/group) or 2 mL of NaCl 0.9% in distinct moments of the estrus cycle. Single treatments have been performed in the presence of a pre-ovulatory follicle associated with uterine edema, on the first day of CL visualization or two days post-ovulation (Induction, D0 and D2 groups, respectively). Probabilities for effect of group (G) are shown. No effect of hCG dose within each day was observed ($P > 0.1$) in Induction, D0 and D2 groups.

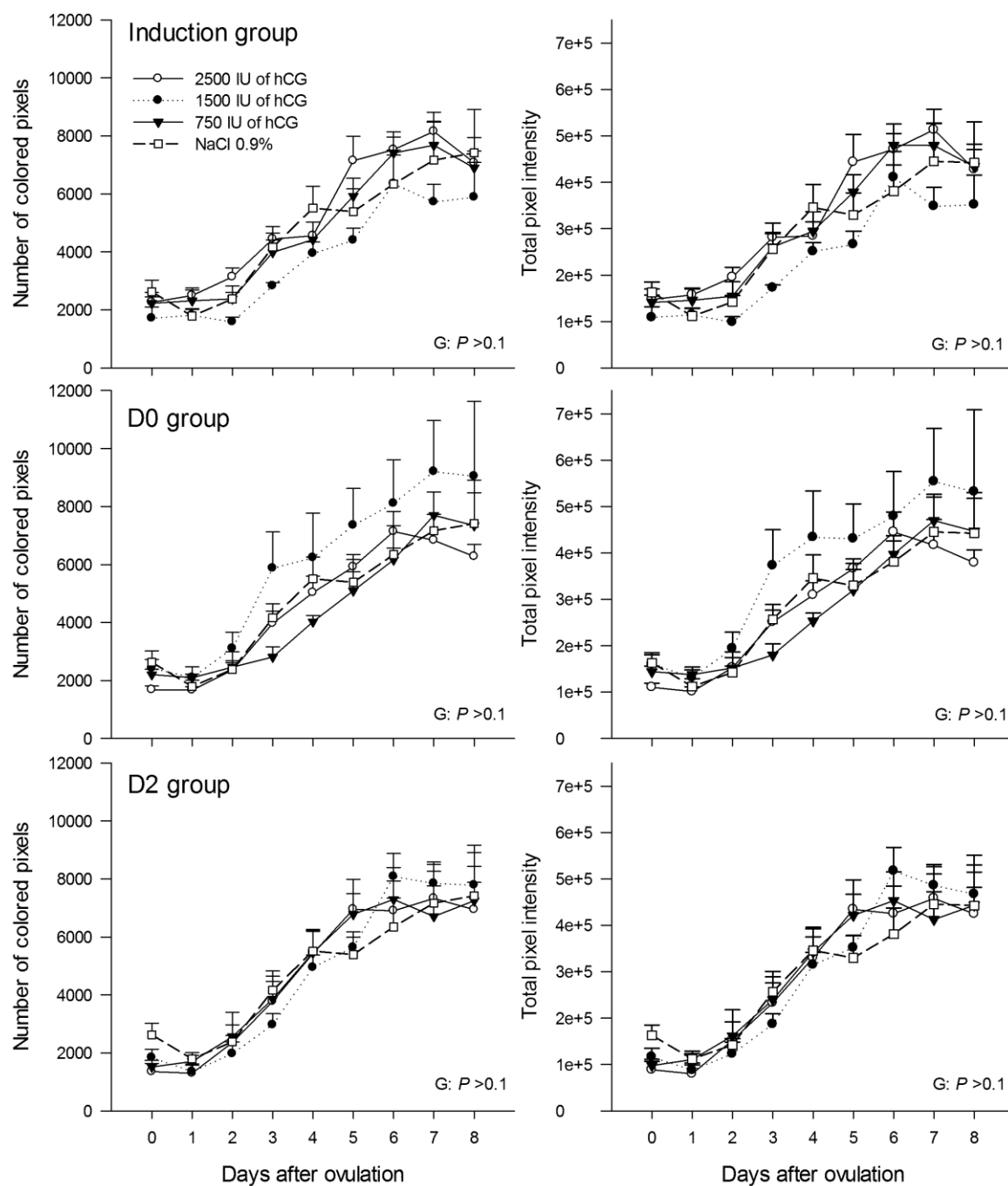


Figure 2. Mean ($\pm$ s.e.m.) for number of colored pixels and total pixel intensity of mares treated with 2500, 1500, 750 IU of hCG ($n=6$ mares/group) or 2 mL of NaCl 0.9% in distinct moments of the estrus cycle. Single treatments have been performed in the presence of a pre-ovulatory follicle associated with uterine edema, on the first day of CL visualization or two days post-ovulation (Induction, D0 and D2 groups, respectively). Probabilities for effect of group (G) are shown. No effect of dose was observed ($P>0.1$).

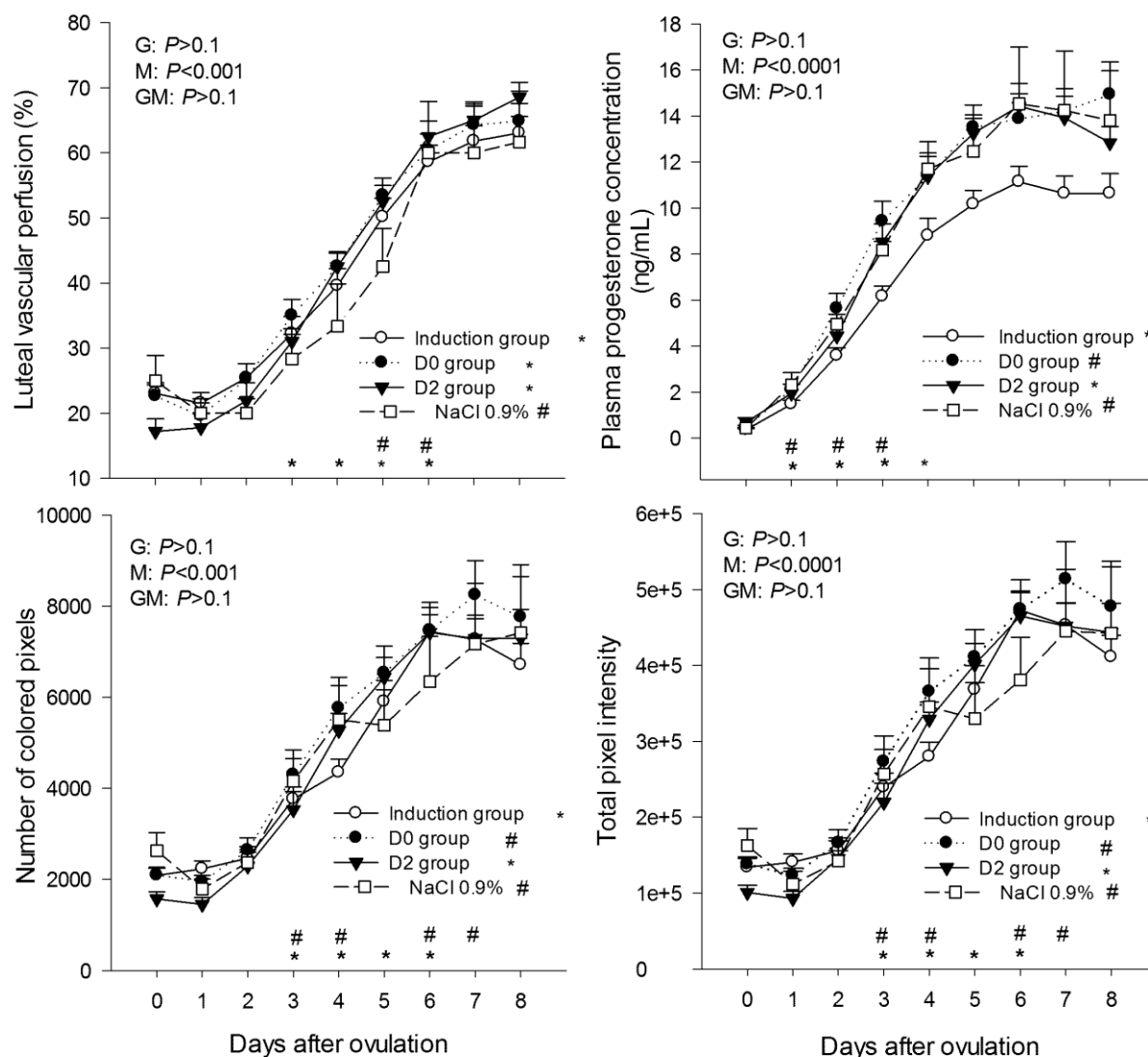


Figure 3. Mean ($\pm$ s.e.m.) luteal vascular perfusion (%), plasma P4 concentration (ng/mL), number of colored pixels and total pixel intensity of mares treated with 2500, 1500, 750 IU of hCG ($n=18$ mares/group) or 2 mL of NaCl 0.9% ($n=6$) in distinct moments of the estrus cycle. Single treatments have been performed in the presence of a pre-ovulatory follicle associated with uterine edema, on the first day of CL visualization or two days post-ovulation (Induction, D0 and D2 groups, respectively). Probabilities for effect of group (G) and day (D) and the interaction (GD) are shown. Significant and progressive increase of all end points was detected throughout days in all experimental groups. Symbols (*) and (#) indicate statistical difference from previous day within the respective group.

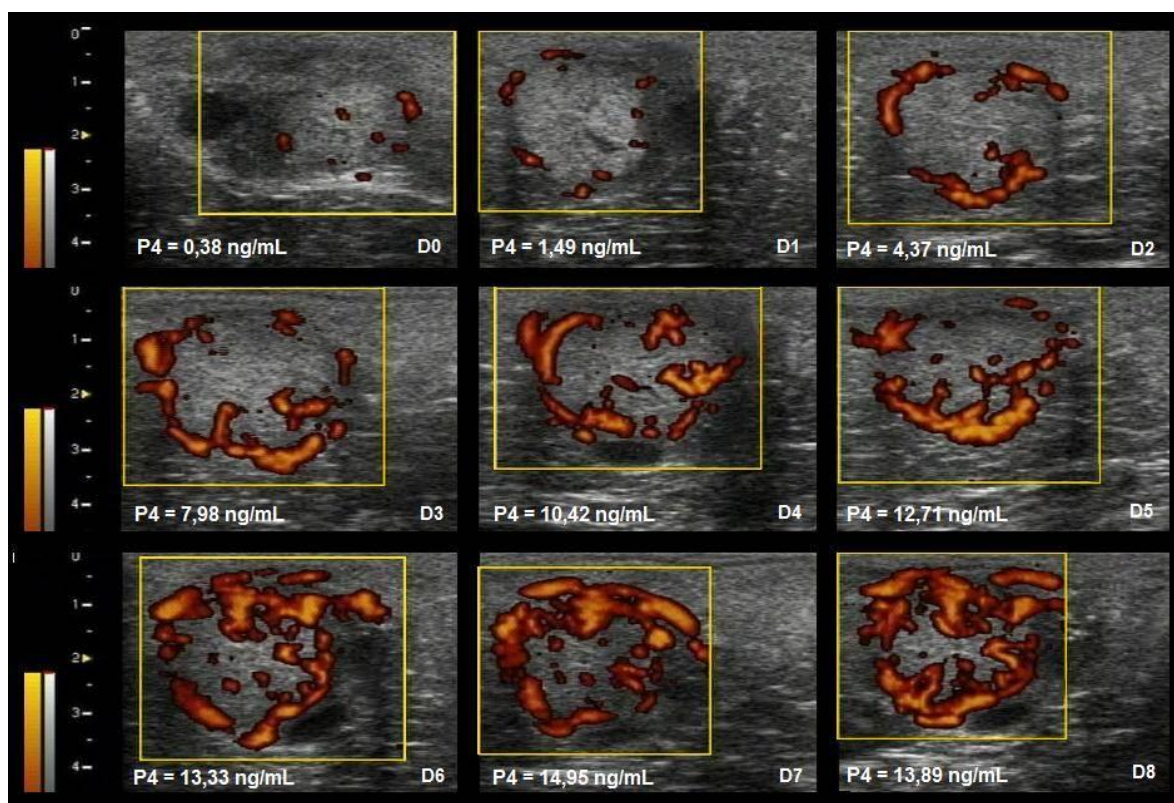


Figure 4. Colored Power-flow Doppler sonograms of equine CL during early diestrus. Day of estrus cycle (D0 = day of ovulation) and respective plasma P4 concentration are shown. Subjective vascular perfusion of the CL (%) was scored according to the extent of luteal tissue with colored Doppler signals in the luteinized area.

References

American Association of Equine Practitioners Manual. 2002. Official Guide for Determining the Age of the Horse, pp 26. Lexington, KY: AAEP.

Arruda, R.P.; Visintin, J.A.; Fleury, J.J.; Garcia, A.R.; Madureira, E.D.; Caleghini, E.C.C.; Neves-Neto, J.R. 2001. Are there relationships between the luteal size, luteal morphoechogenicity by ultrasound and plasmatocal progesterone concentrations in recipient mares? *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38, 233-239.

Alziabi, M.O.; Watson, E.D.; Fraser, H.M., 2003. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*, 125, 259-270.

Beindorff, N.; Honnens, A.; Penno, Y.; Paul, V.; Bollwein, H. 2009. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lutea. *Theriogenology*, 72, 528–534.

Bergfelt, D.R.; Adams, G.P. Luteal Development. 2011. In: McKinnon A.O.; Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D. *Equine Reproduction*, Second Edition, Wiley Blackwell, pp.2055-2064.

Bollwein, H.; Mayer R.; Weber, F.; Stolla, R. 2002. Luteal blood flow during cycle in mares. *Theriogenology*, 65, 2043-2051.

Ferreira-Dias, G.; Pinto-Bravo, P.; Mateus, L.; Redmer, D.A. Medeiros, J.A. 2006. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, 30, 247–259.

Fleury, P.D.C.; Alonso, M.A.; Sousa, F.A.C.; Andrade, A.F.C.; Arruda, R.P. 2007. Use of hCG to improve the reproductive characteristics and fertility in recipients mares. *Rev Bras Reprod Anim*, 31, 27-31.

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

Gastal, E.L.; Silva, L.A.; Gastal, M.O.; Evans, M.J. 2006. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares, *Animal Reproduction Science*, 94, 186 -190.

Ginther, O.J.; Gastal, E.L.; Gastal, M.O.; Utt, M.D.; Beg, M.A. 2007a. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, 99, 213-220.

Ginther, O.J.; Gastal, E.L.; Gastal, M.O.; Beg, M.A. 2007b. Effect of prostaglandin F2alpha on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest Anim Endocrinol.*, v.32, p.315-328.

Ginther, O.J.; Rodrigues, B.L.; Ferreira, J.C.; Araujo, R.R.; Beg, M.A. 2008. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reprod Fertil Dev.*, v.20, p.684-693.

Ginther, O.J.; Beg, M.A.; Gastal, E.L.; Gastal, M.O.; Cooper, D.A. 2009. Treatment with human chorionic gonadotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17β estradiol decrease and more rapid LH increase in mares. *Animal Reproduction Science*, 114, 311–317.

Ginther, O.J. 1992. *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects*, Second Edition. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 642p.

Ginther, O.J., 2007. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography*. Cross Plains: Equiservices, p.258.

Hendriks, W.K.; Colenbrander, B.; Stout, T.A.E. 2006. Effect of administering PGF2 or hCG on day 7 after ovulation on ovarian, uterine and luteal blood flow in the mare. *Animal Reproduction Science*, 94, 223–225.

Henneke, D.R.; Potter, G.D.; Kreider, J.L.; Yeates, B.F. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15, 371–372.

Kelly, C.M.; Hoyer, P.B.; Wise, M.E. 1988. In vitro and In vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotropin stimulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84, 593-600.

Newcombe, J.R.; Human Chorionic Gonadotropin. In: McKinnon A.O.; Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D. *Equine Reproduction*, Second Edition, Wiley Blackwell, pp.1804-1810.

Niswender, G.D.; Juengel, J.L.; Silva, P.J.; Rollyson, M.K.; McIntush, E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Reviews*, 80, 1–29.

Rajamahendran, R.; Sianangama, P.C. 1992. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fert*, 92, 577-584.

Rensis, F.; Valentini, R.; Gorrieri, F.; Bottarelli, E.; Lopez-gatius, F. 2008. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology*, 69, 1077–1082.

Rizos, D.; Scully, S.; Kelly, A.K.; Ealy, A.D.; Moros, R.; Duffy, P.; Naib, A.A.; Forde, N.; Lonergan, P. 2012. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 472–481.

Richards, J.S.; Russel, D.L.; Ochsner, S.; Espey, L.L. 2002. Ovulation: new dimension and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual Review of Physiology*, 64, 69-92.

Santos, J.E.P.; Thatcher, W.W.; Pool, L.; Overton, M.W. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci*, 79, 2881–2894.

Urquieta, B.; Duran, M.C.; Coloma, I.; Parraguez, V.H. 2009. hCG induced ovulation in Thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. *Reproduction Domestic Animals*, 44, 859-864.

9.2. Normas da Revista “Livestock Science”.

PREPARATION

Article structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasise part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants,
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

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.

The abstract should not be longer than 400 words.

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.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information. 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.

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.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

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.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$.

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

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:
<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) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

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

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; NLM Catalog (Journals referenced in the NCBI Databases): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>; CAS (Chemical Abstracts Service): via <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

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 <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, highresolution 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: <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 <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.