

**FMVZ-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Campus de Botucatu**

**RESPOSTA LUTEAL À $\text{PGF}_{2\alpha}$ (DINOPROST
TROMETAMINA) DURANTE AS FASES DE
LUTEOGÊNESE E MANUTENÇÃO DO
CORPO LÚTEO EM ÉGUAS**

Luiz Fernando Novaes Filho

Orientador: Prof. Adj. Cezinande de Meira

**Botucatu – SP
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

**RESPOSTA LUTEAL À $\text{PGF}_{2\alpha}$ (DINOPROST
TROMETAMINA) DURANTE AS FASES DE
LUTEOGÊNESE E MANUTENÇÃO DO
CORPO LÚTEO EM ÉGUAS**

LUIZ FERNANDO NOVAES FILHO

ORIENTADOR: Prof. Adj. Cezinande de Meira

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

BOTUCATU – SP
FEVEREIRO 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL:

Luiz Fernando, Novaes Filho.

Resposta luteal à $PGF_{2\alpha}$ (Dinoprost Trometamina) durante as fases de luteogênese e manutenção do corpo lúteo em éguas / Luiz Fernando Novaes Filho. – Botucatu : [s.n.], 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014

Orientador: Cezinande de Meira

Capes:

1. Equino - Reprodução. 2. Progesterona. 3. Inseminação artificial. 4. Reprodução animal.

Palavras-chave: Corpo lúteo; Luteólise; Égua; Progesterona; Prostaglandina $F2_{\alpha}$.

Nome do Autor: Luiz Fernando Novaes Filho

Título: RESPOSTA LUTEAL À $\text{PGF}_{2\alpha}$ (DINOPROST TROMETAMINA) DURANTE AS FASES DE LUTEOGÊNESE E MANUTENÇÃO DO CORPO LÚTEO EM ÉGUAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi

Membro

UNIFESP/SP

Data da Defesa: 14 de Fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que tornou possível a realização de mais um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e por permitir acesso aos meios necessários para a realização de mais um sonho.

Ao meu orientador, professor Cezinande de Meira, pela orientação e confiança no meu trabalho. Pela amizade e pelos ensinamentos transmitidos ao longo desse período que contribuíram de maneira inexplicável à minha formação. Obrigado!

Aos meus pais, Luiz Fernando Novaes e Gloria Maria da Penha Martins Novaes: pelo amor, carinho, dedicação e entrega para a realização dos meus sonhos e, principalmente, para a formação do meu caráter. Sem palavras para descrever toda a minha admiração e AMOR por vocês. OBRIGADO POR TUDO!

Às minhas irmãs, Rafaela Martins Novaes e Bruna Martins Novaes que eu tanto amo e que mesmo com todas as dificuldades encontradas na vida, ainda encontram tempo para me dar todo o apoio possível e necessário. Amo vocês!

Às minhas avós, duas guerreiras, Maria Lucia da Costa Novaes e Rita da Penha Martins. Aqui cabe um agradecimento especial à minha avó Ruth (Rita) que me aguentou durante toda a minha graduação.

Aos meus avôs, Armando Martins e Antônio Novaes Filho que, apesar da distância, estarão sempre em meu coração.

À minha namorada, amiga e companheira Fernanda Saules Ignácio, que me apoia a todo o momento e nunca me deixou desanimar. Sempre bem disposta, com sorrisos e gargalhadas contagiantes nos momentos mais agradáveis e com palavras carinhosas e certas nos momentos mais difíceis. Além de tudo, ainda contribuiu de maneira indescritível para o desenvolvimento desse projeto e para o meu crescimento profissional. Sem você nada seria igual. Obrigado por tudo! AMO VOCÊ!

A todos os membros da equipe Meira que contribuíram para a realização do projeto: Fernanda Saules Ignácio, Jair Camargo Ferreira, Heloísa de Siqueira Canesin, Yatta Linhares Boakari e Rafael Mide Romano.

Aos amigos que formei em Botucatu ao longo do curso de Mestrado: Mide, Alexandre Baiano, Hyago, Yamê, Helene, Elisa, Felipe Alemãozinho,

Fernando Gaucho, Fernando Dal Sasso, Pedro Victor, Thiago Nita, Leandro Americo, Raissa, Naiana, Ivo, Samuel, Sidnei, Endrigo, Luis Fernando, Felipe Teflon.

Aos amigos que hoje considero parte da minha família e me ajudaram muito com incentivos e risadas nos momentos mais difíceis: Alexandre Baiano, Fernando Dal Sasso e Mide.

A professora Eunice Oba pela ajuda valiosíssima nas dosagens hormonais.

Ao professor José Carlos Figueiredo Pantoja pelas análises estatísticas e colaboração no desenvolvimento do projeto.

A todos os outros professores, funcionários, residentes, estagiários e colegas de pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo bom convívio e pelo apoio.

À FAPESP pelo auxílio concedido para o desenvolvimento do projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa acadêmica que foi fundamental para a minha dedicação integral ao projeto.

Meu agradecimento especial a todas as éguas que participaram desse projeto e a todos os animais que passaram em minha vida.

*"De que me adianta temer o que já aconteceu? O tempo do medo
já aconteceu, agora, começa o tempo da esperança..."*

(Paulo Coelho)

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Corte transversal de um CL em modo-B (I), com a área total circunscrita pela linha amarela, e modo power-Doppler (II), indicando a área de sinais coloridos 12
- FIGURA 2 - Média geral da área total do CL (médias $\pm$ EPM; A) para os grupos, área do CL (médias $\pm$ EPM) durante as 48 horas e avaliação após o tratamento no D2 (B; D2-NaCl, D2-Pgf, D2-1/10Pgf e D2-1/20Pgf) e no D8 (C; D8-NaCl, D8-Pgf, D2-1/10Pgf e D8-1/20Pgf) 14
- FIGURA 3 - Área de sinais coloridos captada no CL (médias $\pm$ EPM) dos grupos no D2 (A; D2-NaCl, D2-Pgf, D2-1/10Pgf e D2-1/20Pgf), no D8 (B; D8-NaCl, D8-Pgf, D2-1/10Pgf e D8-1/20Pgf) e dos grupos submetidos aos mesmos tratamentos em CLs imaturos e maduros (C, D, E e F) durante as 48h de avaliação após o tratametno. (*) diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo 16
- FIGURA 4 - Perfusão vascular objetiva (médias $\pm$ EPM) no CL avaliadas de 0 – 1 (1 = 100% de perfusão) dos grupos tratados no D2 (A), no D8 (B), e dos grupos submetidos ao mesmo tratamento em CLs imaturo e maduro (C, D, E e F) durante 48h de avaliação pós-tratamento. (*) diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo 17

FIGURA 5 - A perfusão vascular subjetiva (médias $\pm$ EPM) do CL no D2 (A), D8 (B) e entre grupos submetidos aos mesmos tratamentos em CLs imaturo e maduro durante 48h de avaliação após o tratamento: (C) D2-NaCl x D8-NaCl, (D) D2-Pgf x D8-Pgf, (E) D2-1/10Pgf x D8-1/10Pgf, (F) D2-1/20Pgf x D8-1/20Pgf. Letras maiúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre grupos num mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo. (*) indica tendência estatística $0,05 \leq P \leq 0,09$. 19

FIGURA 6 - Concentrações plasmáticas de progesterona (médias $\pm$ EPM) no D2 (A), D8 (B) e dos grupos submetidos aos mesmos tratamentos em CLs imaturo e maduro durante as 48h de avaliação pós-tratamento: (C) D2-NaCl x D8-NaCl, (D) D2-Pgf x D8-Pgf, (E) D2-1/10Pgf x D8-1/10Pgf, (F) D2-1/20Pgf x D8-1/20Pgf. Letras maiúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre grupos num mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo. (*) indica tendência estatística $0,05 \leq P \leq 0,09$. 22

SUMÁRIO

	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiii
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1.	Corpo Lúteo	2
2.1.2	Luteólise	5
3.	OBJETIVOS	8
4.	HIPÓTESE	8
5.	MATERIAL E MÉTODOS	9
5.1.	Animais e grupos experimentais	9
5.1.1.	<i>Efeito do tratamento com baixas doses de prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre o CL imaturo equino (fase de luteogênese)</i>	9
5.1.2.	<i>Efeito do tratamento com baixas doses de prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre o CL maduro equino</i>	10
5.2.	Variáveis experimentais	10
5.2.1.	<i>Avaliação da perfusão sanguínea luteal, área total do CL e área com sinais coloridos.</i>	10
5.2.2.	<i>Perfil plasmático de progesterona</i>	12
5.3	<i>Análise estatística</i>	13
6.	RESULTADOS	14
6.1.	Avaliação da área total	14
6.2.	Avaliação da área com sinais coloridos no CL	14
6.3	<i>Avaliação da perfusão vascular do CL</i>	16
6.4	<i>Avaliação da perfusão plasmática de progesterona</i>	19
7.	DISCUSSÃO	22
8.	CONCLUSÃO	27
8.	REFERÊNCIAS	28
10.	TRABALHO CIENTÍFICO	35
10.1.	Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Equine Veterinary Science	35

10.2.	Normas da revista	52
-------	-------------------------	----

NOVAES FILHO, L.F. Resposta luteal à $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dinoprost Trometamina) durante as fases de luteogênese e manutenção do corpo lúteo em éguas. Botucatu. 2014. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

Estudos recentes têm demonstrado diferentes respostas do CL quando da administração de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ em diferentes doses e momentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com baixas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre características funcionais e estruturais de CLs em fases distintas do diestro em éguas. As éguas foram distribuídas aleatoriamente em 8 grupos: D2-NaCl (n=6; 2 mL de solução de NaCl à 0,9%); D2-Pgf (n=9; 10 mg de Dinoprost Trometamina); D2-1/10Pgf (n=6; 1 mg de Dinoprost Trometamina); D2-1/20Pgf (n=6; 0,5 mg de Dinoprost Trometamina); D8-NaCl (n=7; 2 mL de solução de NaCl à 0,9%); D8-Pgf (n=6; 10 mg de Dinoprost Trometamina); D8-1/10Pgf (n=7; 1mg Dinoprost Trometamina); D8-1/20Pgf (n=7; 0,5 mg de Dinoprost Trometamina). A área total do CL (AT), a perfusão sanguínea objetiva (PVO) e subjetiva (PVS) do CL e as concentrações plasmáticas de progesterona (P4) foram avaliados a cada 6 horas durante 48 horas (H0 = momento imediatamente antes do tratamento). A AT não sofreu interferência da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ independente do dia de tratamento. A P4 apresentou uma correlação positiva com a PVO e PVS, sendo esta última mais sensível na detecção das alterações de P4. O tratamento no D2 não foi capaz de induzir a luteólise completa em nenhuma égua enquanto que o tratamento no D8 promoveu luteólise completa em todas as éguas do grupo controle positivo e parcial e completa em algumas éguas dos grupos D8-1/10Pgf e D8-1/20Pgf. Resposta dose-dependente da $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi observada, ou seja, quanto menor a dose aplicada menor as quedas em PVS e P4. Conclui-se que a resposta do CL ao tratamento com diferentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ depende da fase de desenvolvimento do CL.

Palavras-chave: corpo lúteo, luteólise, égua, progesterona, prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$.

NOVAES FILHO, L.F. Luteal response to $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dinoprost tromethamine) during corpus luteum luteogenic and maintenance phases in mares. Botucatu. 2014. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Recent studies have demonstrated different response of the CL to different doses of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ on different moments. The present experiment aims to evaluate the effect of treatments with $\text{PGF}_{2\alpha}$ low doses over functional e structural characteristics of the CLs at two distinct stages. Mares were randomly assigned into groups: D2-NaCl (n=6; 2 mL of saline solution); D2-Pgf (n=9; 10 mg of Dinoprost Tromethamine); D2-1/10Pgf (n=6; 1 mg of Dinoprost Tromethamine); D2-1/20Pgf (n=6; 0,5 mg of Dinoprost Tromethamine); D8-NaCl (n=7; 2 mL of saline solution); D8-Pgf (n=6; 10 mg of Dinoprost Tromethamine); D8-1/10Pgf (n=7; 1mg of Dinoprost Tromethamine); D8-1/20Pgf (n=7; 0,5 mg of Dinoprost Tromethamine). Total area (AT), objective (PVO) and subjective (PVS) vascular perfusion of the CL and plasmatic progesterone (P4) were evaluated every six hours for 48h after treatment (H0 = immediately before treatment). $\text{PGF}_{2\alpha}$ did not influenced on AT or day of treatment. P4 showed a positive correlation to PVO and PVS, and PVS was strongly correlated to P4. Treatment on D2 was not able to induce total luteolysis in any mare while treatment on D8 promoted total luteolysis in all mares in group D8-Pgf and 29% and 14% of the mares for the groups D8-1/10Pgf and D8-1/20Pgf, respectively. Parical luteolysis were also detected in groups on D8. The response to $\text{PGF}_{2\alpha}$ seems to be dose-dependent, the decrease in $\text{PGF}_{2\alpha}$ dose proportionally decreases PVS and P4. It is concluded that CL response to treatment with different doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ depends os the CL developmental stage.

Keyowrds: corpus luteum, luteolysis, mare, progesterone, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$.

1. INTRODUÇÃO

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária produtora de progesterona e responsável pela duração da fase lútea, uma vez que este hormônio exerce ação de supressão na liberação do LH (GINTHER et al., 2005). Desta forma, agentes luteolíticos são amplamente utilizados em programas de reprodução assistida com o intuito de encurtar o ciclo estral e de interromper gestações (McKINNON et al., 2011). Devido ao seu efeito ecbólico também são muito utilizados para promover a limpeza uterina no estro e após a inseminação até o segundo dia após detecção da ovulação (TROEDSSON et al., 2001; NIE et al., 2003b).

Porém, estudos têm demonstrado que a administração de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$ - Dinoprost Trometamina ou Cloprostenol) no início do diestro pode interferir nas concentrações plasmáticas de progesterona e no estabelecimento da gestação (TROEDSSON et al., 2001; NIE et al., 2003b). Entretanto, pouco se sabe sobre a influência de baixas doses de $PGF_{2\alpha}$ sobre CLs em fase de desenvolvimento (luteogênese).

O CL pode responder de forma diferente à administração da $PGF_{2\alpha}$ quando doses reduzidas são utilizadas (NIE et al., 2003a) ou quando aplicações são realizadas em diferentes momentos do desenvolvimento do CL (fase de luteogênese ou de manutenção) (BERGFELT et al., 2006; TROEDSON et al., 2001). O tratamento com baixas doses de $PGF_{2\alpha}$ pode provocar uma regressão parcial do CL (reduz a concentração de progesterona, mas não provoca a luteólise total) assim como em CLs imaturos observa-se a ressurgência da produção de progesterona (NIE et al., 2003a).

Desta forma, nesse estudo foi avaliada a resposta a baixas doses de $PGF_{2\alpha}$ e a sua relação com o perfil plasmático de progesterona, a perfusão vascular e a morfoecogenecidade do CL em diferentes momentos do diestro o que permitiu uma melhor compreensão da ação luteolítica da $PGF_{2\alpha}$ em CLs em desenvolvimento e a sua influência na produção de progesterona.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Corpo Lúteo

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina transitória formada no sítio de ovulação e responsável pela produção de progesterona (P4). A P4 é um hormônio esteroide essencial para o controle do ciclo estral por atuar sobre o comportamento sexual da fêmea tornando-a não receptiva ao macho. Adicionalmente, a P4 prepara o ambiente uterino para o potencial recebimento do embrião e posterior manutenção da gestação (GINTHER, 1992).

Em éguas, a ovulação ocorre numa região específica do ovário denominada fossa de ovulação, única região do ovário da égua recoberto por epitélio germinativo (McKINNON et al., 2011). O processo ovulatório é caracterizado por uma reação inflamatória incluindo hiperemia, congestão, permeabilidade vascular aumentada e edema (KERBAN et al., 1999).

Em cerca de 50 % das ovulações, ocorre a formação de um CL compacto, caracterizado por uma liberação abrupta do fluido folicular que dura entre 5 e 90 segundos, restando apenas 15 % desse fluido no antro. Os outros 50 % dos CLs formados são cavitários, onde a liberação desse fluido folicular é lenta e gradual, levando 6 a 7 minutos para a evacuação de 4 a 17 % do volume total do fluido folicular, enquanto que a liberação completa desse fluido pode levar 30 minutos ou até mesmo ocorrer entre 5 e 20 horas (TOWNSON & GINTHER, 1989).

A formação desses corpos hemorrágicos não é considerada como uma condição patológica e tende a diminuir gradualmente com o tempo devido a organização do tecido luteal e ao processo de coagulação. O percentual médio do CL ocupado pelo coágulo atinge valores máximos três dias pós ovulação (PIERSON & GINTHER, 1985).

O aumento do LH desencadeia a ovulação, no entanto, a maior concentração sanguínea deste hormônio é detectada dois dias após a ovulação. Isso ocorre devido à característica da curva de LH circulante na égua, uma vez que o LH nesta espécie apresenta uma meia-vida longa e uma liberação contínua, são necessários até seis dias para que a máxima

concentração seja alcançada na corrente sanguínea e o mesmo tempo para retornar a concentrações basais (GINTHER, 1992).

A reprogramação das células da granulosa em células luteais é um processo irreversível e que ocorre mais marcadamente poucas horas após a ovulação com mudanças genômicas e estruturais. As células em luteinização param de se dividir e iniciam a expressão de novas moléculas que permitem a sobrevivência em um ambiente hormonal diferente (STOCCO, et al., 2007).

O tecido luteal equino aumenta principalmente com a hipertrofia das células luteínicas que é intensificada 10h pós-ovulação e passa de um tamanho de 10 μm de diâmetro para até 37 μm (GINTHER, 1992).

A reorganização celular com o objetivo de síntese de progesterona pelas células luteais é caracterizada por uma diminuição na expressão das enzimas que convertem progesterona em 17β -estradiol (P450 17α -hidroxilase e P450 aromatase), por um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em progesterona [P450 clivadora de cadeia lateral (P450_{scc}) e a 3β -hidroxiesteróide desidrogenase (3β -HSD)] e aumento da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) para o interior da membrana mitocondrial (FRASER et al., 1986).

O CL é formado por células luteais, distintas em células luteais grandes e pequenas, e não luteais. Apesar disso, ao contrário do que ocorre em outras espécies, as células luteais equinas derivam-se exclusivamente das células da granulosa do folículo pré-ovulatório (VAN NIEKERK et al., 1975). Além das células esteroidogênicas, o CL é composto por: fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos. (TOWNSON & LIPTAK, 2003).

O período luteínico pode ser dividido em três estágios: desenvolvimento (luteogênese), manutenção e regressão (luteólise). A luteogênese tem início durante o processo de maturação folicular, quando o aumento pré-ovulatório de LH resulta na luteinização das células da granulosa promovendo a inversão da esteroidogênese (WUTTKE et al., 1998). A luteinização das células da granulosa é concluída três dias após a ovulação (D0=dia da ovulação) e a hipertrofia das células luteais é observado até D9 (McKINNON et al., 2011).

A ultrassonografia é uma técnica não invasiva de visualização de órgãos internos e, pode ser considerada, o melhor método para a detecção de CLs,

especialmente nos casos de ovulação dupla e detecção recente da ovulação. A avaliação ultrassonográfica do CL envolve a mensuração do diâmetro e da área do CL, a ecogenecidade do tecido luteal e, mais recentemente, o uso da ultrassonografia Doppler. (McKinnon et al., 2011).

De modo geral, a imagem ultrassonográfica de um CL apresenta uma ecogenecidade que varia em tons de cinza de acordo com o estágio de desenvolvimento. O CL equino atinge valores máximos de ecogenecidade 24 a 48h após a ovulação que diminuem progressivamente até atingirem valores baixos nove dias após a ovulação (GINTHER, 1995). CLs imaturos são mais hiperecóticos no início do diestro, com o desenvolvimento do CL e a hipertrofia das células luteais e o aumento do fluxo sanguíneo e produção de progesterona, há uma diminuição na ecogenecidade desse CL no meio do diestro. No final do diestro, há um aumento dessa ecogenecidade devido a degeneração celular e desvascularização desse CL em regressão (Ginther, 1992).

O CL é uma das estruturas mais vascularizadas do organismo. Devido a sua meia-vida curta, o sistema vascular luteal da égua deve apresentar um rápido desenvolvimento e regressão (GINTHER, 2007). Desta forma, a máxima proliferação endotelial do CL equino é detectada entre três e quatro dias pós-ovulação (AL-ZI'ABI et al., 2003), enquanto que a ecogenicidade luteal máxima é observada em D2 (BERGFELT & GINTHER, 1996; TOWNSON & GINTHER, 1989). O desenvolvimento de capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existent é essencial para a formação e função luteal e uma extensa angiogênese ocorre no CL em desenvolvimento (GINTHER, 2007). Logo após a ovulação, as primeiras células vasculares invadem o parênquima luteal em desenvolvimento. O desenvolvimento de uma nova microcirculação de vasos sanguíneos envolve a degradação da matrix extracelular, proliferação de células endoteliais, expansão de vasos capilares e desenvolvimento do lúmen capilar. Esta densa rede capilar supre a necessidade por nutrientes, hormônios e lipoproteínas ligantes de colesterol das células luteais e fornece um mecanismo rápido e eficiente para o aumento da concentração plasmática de progesterona (STOCCO et al., 2007).

A regulação molecular da angiogênese no CL é complexa e apresenta uma vasta lista de reguladores. Estes reguladores incluem o VEGF, essencial

para a proliferação vascular, o fator de crescimento fibroblástico básico e as angiopoietinas (STOCCO et al., 2007) que são, aparentemente, estimulados pelo LH (FRASER et al., 2005). Mudanças na rede vascular do CL estão presentes durante toda a fase luteal, sugerindo que numerosos, mas ainda não definidos fatores angiogênicos são produzidos pelo CL equino durante toda a sua vida ativa. A densidade microvascular aumenta durante as fases de desenvolvimento e manutenção do CL, enquanto que uma diminuição da mesma é observada nos estágios pré-luteolítico e luteolítico (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

2.1.1. Luteólise

A vida útil do CL é o principal fator determinante da duração do diestro. Em éguas, a regressão funcional e estrutural do CL (luteólise funcional e estrutural, respectivamente) ocorre entre os dias 13 e 16 pós-ovulação em consequência da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (GINTHER, 1992). A secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio é dependente de dois fatores fundamentais: (1) da formação de receptores uterinos para a ocitocina e (2) da habilidade de produzir $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela autorregulação da expressão de *cox-2* no endométrio. A ocitocina responsável por esse estímulo a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem origem tanto hipofisária quanto endometrial e responde a um mecanismo de feed-back (McKINNON et al., 2011).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$, um ácido graxo hidroxilado insaturado, é sintetizado no endométrio devido a uma série de reações. Sua síntese inicia a partir da hidrólise dos ácidos graxos da membrana celular pela enzima fosfolipase A2, liberando ácido aracdônico que será utilizado como substrato. A enzima cicloxigenase catalisa a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina H2 (PGH_2) que é rapidamente convertido em $\text{PGF}_{2\alpha}$. Portanto, é a disponibilidade de ácido aracdônico e a atividade da cicloxigenase que determinam a capacidade de síntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$, produção esta controlada por um mecanismo denominado down-regulation (NISWENDER et al., 2000).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ age de diversas maneiras para induzir a luteólise: inibe a agregação de receptores de LH na membrana das células luteais; inibe a enzima StAR que afeta a captação de colesterol (precursor da progesterona)

pela membrana mitocondrial; e aumenta a produção de endotelina-1 (McCRACKEN et al., 1999; MILVAE, 2000). A endotelina-1 é um vasoconstritor protéico e modulador de células esteroidogênicas produzida pelas células endoteliais em resposta a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e sua presença está inversamente proporcional às concentrações de progesterona (GIRSH et al., 1996; LEVY et al., 2000).

Existem dois tipos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ amplamente utilizadas: Dinoprost Trometamina (análogo natural) e o Cloprostenol (análogo sintético). O Dinoprost Trometamina apresenta uma meia-vida mais curta, sendo rapidamente metabolizado (KINDHAL et al., 1980), enquanto que o Cloprostenol apresenta uma meia-vida biológica maior e é um agente luteolítico muito mais potente que o Dinoprost Trometamina, já que não é degradado pelas enzimas 15-hidroxidesidrogenase e 13,14-redutase (BOURNE, 1981).

Ao contrário dos ruminantes domésticos, onde a $\text{PGF}_{2\alpha}$ alcança o ovário por meio de um mecanismo denominado contracorrente (GINTHER, 1981; GINTHER, 1974), nas éguas o caminho do agente luteolítico é via circulação sistêmica (GINTHER e FIRST, 1971). Essa diferença na rota da $\text{PGF}_{2\alpha}$ já foi demonstrada por diversos trabalhos que detectaram que: 1) não existe diferença no efeito luteolítico da $\text{PGF}_{2\alpha}$, quando o tratamento é realizado por via intramuscular ou intravenosa (DOUGLAS & GINTHER, 1975); 2) não houve relação quanto ao lado de remoção do corno uterino e a manutenção lútea (GINTHER, 1971); 3) não há relação entre o lado de inserção de um dispositivo intra-uterino e a ausência luteal (GINTHER, 1992); ausência de anatomia vascular que favoreceria um caminho útero-ovariano ipsilateral (GINTHER et al., 1972); e 5) resposta luteal semelhante à infusão intravenosa ou intrauterina da $\text{PGF}_{2\alpha}$ para simular um pulso de PGFM (GINTHER et al., 2009).

A degradação lenta da $\text{PGF}_{2\alpha}$ quando comparada aos ruminantes (STAEMPFLI, 2011) associada à circulação sistêmica na égua, tornam a espécie equina aproximadamente 18 vezes mais sensível ao efeito luteolítico da administração sistêmica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ do que nos ruminantes (GINTHER, 1992; DOUGLAS E GINTHER, 1975). Em função dessa maior sensibilidade, uma única dose sistêmica de 5 mg de dinoprost trometamina é recomendada para a indução clínica da luteólise na égua, enquanto que na vaca a dose indicada é

de 25 mg. Isso pode explicar a presença dos efeitos colaterais nas éguas como: sudorese, diarreia, cólica (STAEMPFLI, 2011).

Para compensar a maior sensibilidade aos efeitos luteolíticos foram desenvolvidos alguns mecanismos como: liberação sistêmica da $\text{PGF}_{2\alpha}$; liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em pulsos numa maior frequência que em vacas (GINTHER et al., 2008); meia-vida mais curta da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na circulação sistêmica quando comparada aos ruminantes, no entanto, pouco se sabe sobre a meia-vida da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em éguas; a ocitocina facilita o início da luteólise o que permite que a liberação de um pulso relativamente pequeno inicie esse processo; maior afinidade do CL equino pelas moléculas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (aproximadamente 10 vezes mais que nas vacas) (KIMBALL et al., 1977).

Apesar de relatos afirmando que o CL equino é refratário a $\text{PGF}_{2\alpha}$ até o D4 (GINTHER, 1992; PACCAMONTI et al., 1991), alguns autores demonstraram que a funcionalidade do CL recém-formado pode ser comprometida pela administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante a luteogênese (TROEDSSON et al., 2001; NIE et al., 2003a; NIE et al., 2003b; BRENDENMUEHL, 2002). A administração de Cloprostenol nos dias 0, 1 e 2 após a ovulação pode afetar o desenvolvimento do CL e, conseqüentemente, interferir na manutenção da gestação. Entretanto, o tratamento precoce com $\text{PGF}_{2\alpha}$ não resulta necessariamente na regressão completa do CL (TROEDSSON et al., 2001). Bergfelt et al. (2006) avaliaram o perfil plasmático de progesterona e o comprimento do ciclo estral de éguas tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dinoprost Trometamina) em D3 ou D10. Foi detectada a queda abrupta na concentração plasmática de progesterona de éguas tratadas no D3, sendo que em 75% destas as concentrações de progesterona voltaram a aumentar dois a três dias após o tratamento. Mesmo assim, houve redução significativa no intervalo interovulatório nestes animais. Adicionalmente, Nie et al. (2003a) relataram uma diminuição na concentração de P4 entre D2 e D13 de éguas tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos dias 0, 1 e 2 pós-ovulação. Estes achados sugerem que o CL de éguas pode sofrer luteólise parcial devido à ação luteolítica da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Ao comparar o efeito da administração consecutiva de Dinoprost Trometamina (5 mg) e do Cloprostenol (250 μg) nos dias 0, 1 e 2 pós-ovulação sobre as concentrações de progesterona, Mocklin et al. (2006) observaram

concentrações menores no grupo tratado com cloprostenol nos dias 4, 6, 8 e 10 pós-ovulação e no grupo tratado com dinoprost apenas no dia 4. Em ambos os grupos, houve uma retomada nas concentrações de progesterona que se igualaram ao grupo controle nos dias 12 e 14 pós-ovulação. Apesar dessa retomada da progesterona, os autores sugeriram que as baixas concentrações no início do diestro poderiam atrasar o desenvolvimento embrionário e que, por isso, a ocitocina seria um fármaco mais seguro para a limpeza uterina nessa fase.

Em vacas, o início da luteólise é dependente do aumento nas concentrações circulantes de estradiol produzido pelo folículo dominante (ARAUJO et al., 2009). No entanto, em éguas o crescimento folicular e consequente aumento na concentração circulante de estradiol aparentemente não são necessários para desencadear a luteólise funcional, sendo relacionado apenas com a luteólise morfológica (GINTHER et al., 2005). Já a queda na concentração plasmática de progesterona durante a regressão luteal é o principal indicador da luteólise funcional e não está relacionada necessariamente com o início da redução nas dimensões do CL. Durante a luteólise funcional observa-se diminuição na atividade esteroideogênica das células luteais e na vascularidade luteal. Baseado na dosagem de progesterona e avaliação da perfusão sanguínea a cada 12 horas, a detecção da luteólise completa (< 2 ng/mL) ocorre 36h e 24h após o início da diminuição na concentração de progesterona e da perfusão sanguínea, respectivamente. Portanto, a diminuição da progesterona precede a diminuição na perfusão sanguínea (GINTHER et al., 2008).

3. OBJETIVOS

O estudo em questão teve como objetivo principal o avaliar o efeito do tratamento com baixas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre as características funcionais e estruturais de CLs em fases distintas do diestro em éguas, caracterizando o fenômeno da luteólise total e parcial. Os objetivos específicos são:

a. Determinar o perfil plasmático de progesterona de éguas com CLs em desenvolvimento e maduros durante as primeiras 48 horas pós-tratamento com baixas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$;

- b. Avaliar a eficácia do Doppler modo Power-flow para a caracterização ultrassonográfica da luteólise total e parcial em éguas;

4. HIPÓTESE

Testar a hipótese de que a resposta ao tratamento com baixas doses de PGF_{2α} depende da fase de desenvolvimento do CL, podendo ocasionar diminuição transitória na concentração plasmática de progesterona e na perfusão sanguínea luteal quando instituído durante a luteogênese.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 54 ciclos estrais de 18 éguas mestiças com idade entre quatro e 15 anos [características de dentição foram usadas para determinar a idade (American Association of Equine Practitioners Manual 2002)]. O experimento foi conduzido nos meses de agosto a outubro de 2012 e as éguas foram mantidas no CERBEQ, Centro de Reprodução Equina do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP (Latitude 22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 4"). Todas as éguas utilizadas ao longo do experimento estavam em boa condição corporal, ciclando e foram alimentados com feno de Coast-Cross (*Cynodon dactylon*), ração concentrada, sal mineral e água *ad libitum*. Somente éguas com temperamento dócil e ausência de anormalidades uterinas e ovarianas avaliadas por ultrassonografia foram utilizadas neste estudo.

A distribuição das éguas dentro de cada grupo experimental foi realizada de forma aleatória de acordo com o acompanhamento do desenvolvimento folicular (ultrassonografia transretal modo-B uma vez ao dia) e de forma que os grupos fossem avaliados simultaneamente.

Para indução da ovulação, 2.500 UI de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Brasil) foram injetadas por via intravenosa na presença de folículo pré-ovulatório com diâmetro ≥35mm associado a edema uterino (GASTAL et al., 1998). Após o tratamento com hCG, exames ultrassonográficos foram

realizados a cada seis horas para detecção da ovulação e melhor determinação da idade do CL. O dia da ovulação foi considerado D0.

5.1.1. Efeito do tratamento com baixas doses de prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre o CL imaturo equino (fase de luteogênese)

Para estudar o efeito da administração de baixas doses de $PGF_{2\alpha}$ sobre as características funcionais e ultrassonográficas de CLs em desenvolvimento (D2) foram utilizados 27 ciclos estrais distintos. As éguas foram distribuídas aleatoriamente dentro de quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento a ser realizado: a) Grupo D2-NaCl (n=6), controle negativo, administração de 2ml de solução de NaCl à 0,9%, b) Grupo D2-Pgf (n=9), controle positivo, administração de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Pfizer Animal Health, Brasil), c) Grupo D2-1/10Pgf (n=6), administração de 1 mg de Dinoprost Trometamina, e d) Grupo D2-1/20Pgf (n=6), administração de 0,5 mg de Dinoprost Trometamina. Todos os tratamentos foram realizados no D2, 48 horas após a detecção da ovulação, por via intramuscular em aplicação única e o momento da administração da $PGF_{2\alpha}$ foi determinada como hora 0 (H0).

5.1.2. Efeito do tratamento com baixas doses de prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre o CL maduro equino.

Para avaliar a resposta de CLs maduros de éguas tratadas com baixas doses de $PGF_{2\alpha}$, 27 ciclos foram distribuídos em quatro grupos experimentais como descritos a seguir: a) Grupo D8-NaCl (n=7), controle negativo, administração de 2ml de solução NaCl à 0,9%, b) Grupo D8-Pgf (n=6), controle positivo, administração de 10 mg de Dinoprost Trometamina, Grupo D8-1/10Pgf (n=7), administração de 1 mg de Dinoprost Trometamina e Grupo D8-1/20Pgf (n=7), administração de 0,5 mg de Dinoprost Trometamina. Todos os tratamentos foram realizados no D8, por via intramuscular em aplicação única e o momento da administração de $PGF_{2\alpha}$ foi determinada como hora 0 (H0).

5.2. Variáveis experimentais

5.2.1. Avaliação da perfusão sanguínea luteal, área total do CL e área com sinais coloridos.

Foi utilizado o Doppler modo Power-flow como descrito anteriormente por Ginther & Utt (2004). As éguas foram examinadas por meio de ultrassonografia modo B e Power-flow utilizando equipamento Doppler (SONOACE PICO, Medison do Brasil Ltda) equipado com transdutor multi-frequencial (5 a 9 Mhz) linear endocavitário de banda larga (LV5-9CDn, 60mm). A configuração do equipamento foi mantida constante ao longo do estudo.

A perfusão vascular do CL foi inicialmente estimada subjetivamente em tempo real, levando-se em consideração a porcentagem (0 a 100%) de tecido luteal com sinais coloridos visualizados durante exame ultrassonográfico Doppler contínuo de no mínimo um minuto. Para aumentar a confiabilidade da análise, o mesmo avaliador foi mantido e este não tinha conhecimento do tratamento realizado no momento das avaliações.

Para avaliação objetiva, a perfusão vascular luteal foi realizada por meio da contagem de pixels coloridos do vídeo capturado de forma semelhante ao descrito por Ginther et al. (2007). Os exames ultrassonográficos foram gravados diretamente em computador portátil através de uma placa de captura de vídeo e as imagens selecionadas no programa Adobe Premiere Pro 1.5 (TIFF format; Adobe Systems, San Jose, CA).

Em seguida, três imagens de cada exame foram escolhidas seguindo um critério de seleção (maior área de CL com maior número de sinais coloridos captados excluindo a região da base do CL), extraídas e salvas (formato JPEG) utilizando o programa Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems). O número total de pixels coloridos por imagem-JPEG foi calculado pelo programa ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para indicar a área de fluxo sanguíneo.

A partir das imagens selecionadas, foram estimadas a área total do CL (Figura 1A), a área com sinais coloridos (Figura1B) e a perfusão vascular objetiva do CL foi calculada a partir da porcentagem de área total com sinais coloridos.

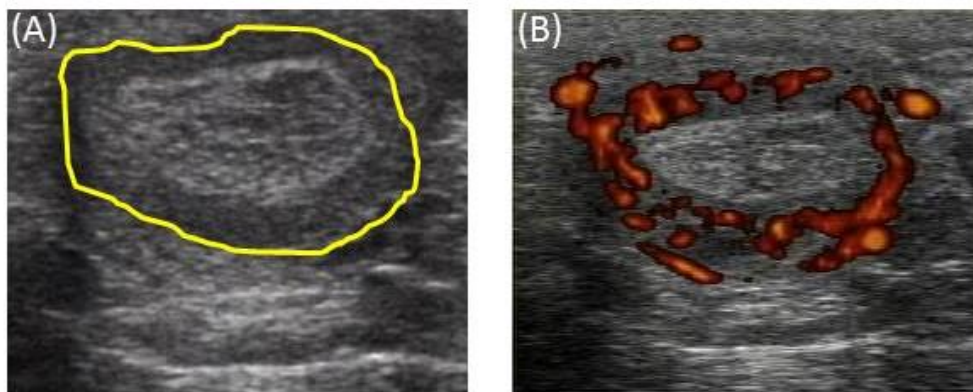


Figura 1 – Corte transversal de um mesmo CL em modo-B (A), com a área total circunscrita pela linha amarela, e modo power-Doppler (B), indicando a área de sinais coloridos.

5.2.2. Perfil plasmático de progesterona

Para determinação do perfil plasmático de progesterona, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados por venopunção da veia jugular. A coleta de sangue foi realizada imediatamente antes da administração do tratamento com a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (H0) e a cada seis horas durante 48 horas. As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do plasma que, em seguida, foi armazenado a -20°C para posterior mensuração da concentração plasmática de progesterona em laboratório por meio de radioimunoensaio (RIA) utilizando-se kits comerciais Coat-a-Count, DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) e seguindo orientação do fabricante para realização do ensaio.

Para determinar a precisão do ensaio foi utilizado um pool de plasmas, o qual foi repetido por 6 vezes e em duplicata. O erro intra ensaio foi de 7,5% e a sensibilidade de 0,01ng/mL.

Foi considerada luteólise total quando as concentrações de P4 alcançaram valores inferiores a 1ng/mL (BARKER et al., 2006), luteólise parcial quando estas encontraram-se entre 1 e 2 ng/mL não alcançando concentrações menores dentro das 48 horas de avaliação e ressurgência do CL quando observou-se redução das concentrações seguida de aumento nas horas subsequentes.

5.3. Análise estatística

Foram realizadas análises entre os grupos tratados no D2 (D2-NaCl, D2-Pgf, D2-1/10Pgf e D2-1/20Pgf), entre os grupos tratados no D8 (D8-NaCl, D8-Pgf, D8-1/10Pgf e D8-1/20Pgf) e entre os dois grupos submetidos aos mesmos tratamentos no D2 e D8 (D2-NaCl x D8-NaCl; D2-Pgf x D8-Pgf; D2-1/10Pgf x D8-1/10Pgf; D2-1/20Pgf x D8-1/20Pgf).

Para realização das análises, os dados de Progesterona plasmática (P4) foram convertidos para log com o objetivo de atingir a normalidade.

Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED; SAS Institute, 2009) foram usados para comparar as médias de P4, área total do CL (AT), perfusão vascular subjetiva do CL (PVS), perfusão vascular objetiva do CL (PVO) e área com sinais coloridos (ASC) entre grupos e dias. Um termo de interação entre grupo e dia foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre grupos era dependente do dia analisado. Uma estrutura de covariância auto-regressiva foi utilizada para modelar as medidas repetidas dentro da mesma égua. O método de Tuckey foi utilizado para ajustar os valores de P resultantes de comparações múltiplas.

Análise de correlação (PROC CORR; SAS Institute, 2011) e regressão linear simples (PROC GLM; SAS Institute, 2011) foram utilizadas para estimar a associação entre as variáveis: perfusão vascular subjetiva do CL x perfusão vascular objetiva do CL, P4 x perfusão vascular subjetiva do CL, P4 x perfusão vascular objetiva do CL, área com sinais coloridos x P4 e área total x P4.

Teste de qui-quadrado foi utilizado para testar a hipótese que o tratamento, seja com solução fisiológica seja com as diferentes doses de PGF_{2α}, depende da fase de desenvolvimento do CL (D2 ou imaturo e D8 ou maduro).

Independente do teste realizado, nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$) foi utilizado para o presente trabalho.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação da área total

Para a área total do CL (mm²), não foram observadas diferenças entre momentos ou interação grupo x momento ($P > 0,05$), mas sim quando as médias gerais dos grupos foram comparadas ($P < 0,05$; Figura 2).

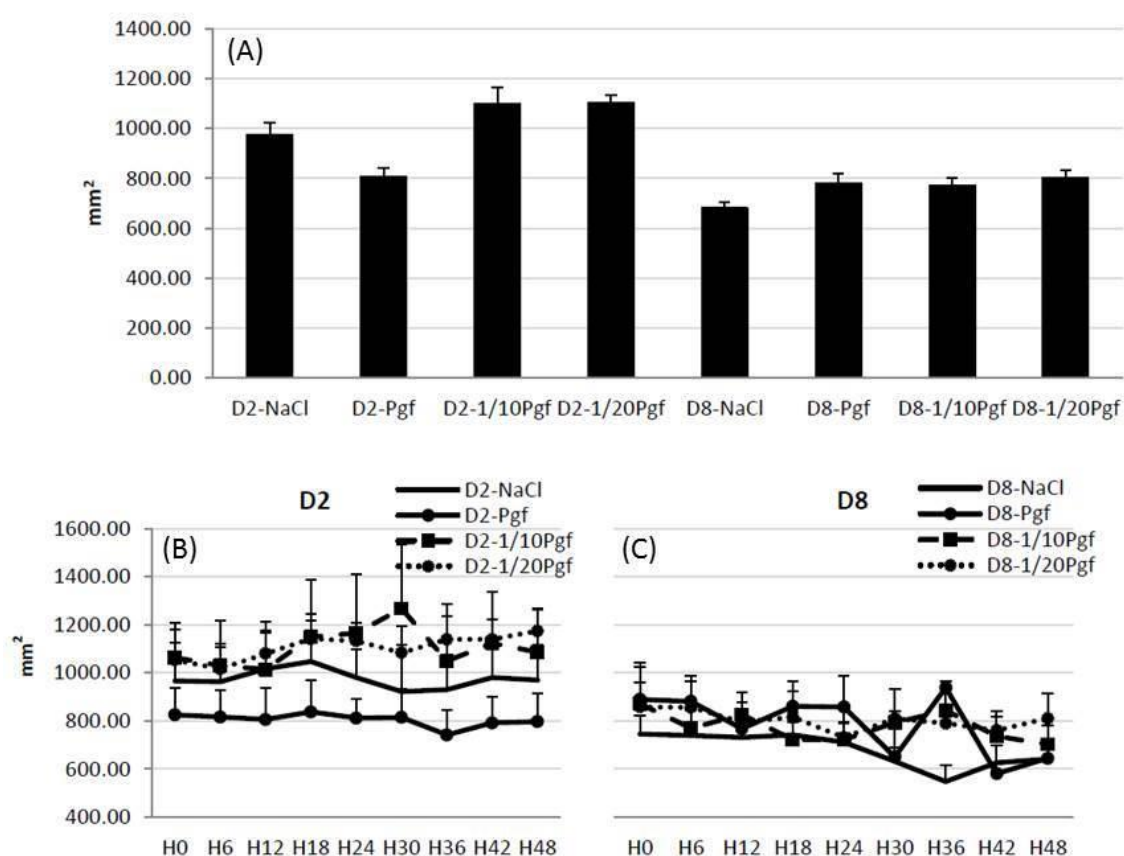


Figura 2 – Média geral da área total do CL (médias $\pm$ EPM; A) para os grupos, área do CL (médias $\pm$ EPM) durante as 48 horas e avaliação após o tratamento no D2 (B; D2-NaCl, D2-Pgf, D2-1/10Pgf e D2-1/20Pgf) e no D8 (C; D8-NaCl, D8-Pgf, D2-1/10Pgf e D8-1/20Pgf).

6.2. Avaliação da área com sinais coloridos no CL

Para ASC captados no CL (mm²) foram detectadas diferenças entre grupos ($P < 0,05$), entre momentos ($P < 0,05$) e as diferenças entre os grupos dependeram do momento avaliado (interação grupo x momento, $P < 0,05$).

Quando comparados diferentes tratamentos realizados no mesmo estágio de desenvolvimento do CL, o grupo D8-NaCl foi maior que o grupo D8-

1/10Pgf em H24 e tendeu a ser maior que o grupo D8-1/20Pgf H18 e H24 (Figura 3).

Quando comparados os mesmos tratamentos em diferentes estágios de desenvolvimento do CL, os grupos D2-NaCl, D2-1/10Pgf e D2-1/20Pgf apresentaram maiores ASC que os grupos D8-NaCl, D8-1/10Pgf e D8-1/20Pgf em H0, respectivamente (Figura 3).

No grupo D8-Pgf, a ASC apresentou-se maior em H0 e H6 quando comparada a H48 e, H12 tendeu a ser maior que H48. Em D8-1/10Pgf, H0 foi maior que os seguintes momentos: H24, H30, H36, H42 e H48. Já no grupo D8-1/20Pgf, apenas em H0 detectou-se valores de ASC maiores que em H48 (Figura 3).

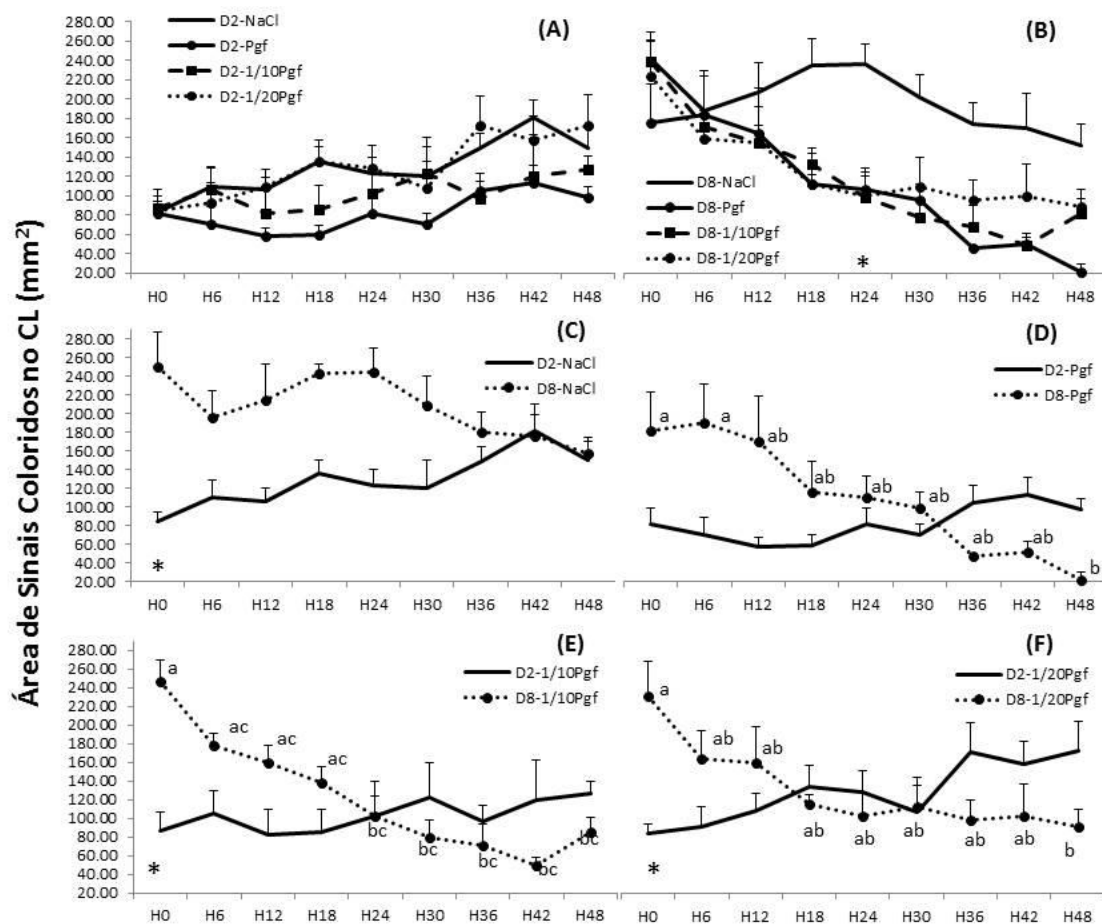


Figura 3 – Área de sinais coloridos captada no CL (médias $\pm$ EPM) dos grupos no D2 (A; D2-NaCl, D2-Pgf, D2-1/10Pgf e D2-1/20Pgf), no D8 (B; D8-NaCl, D8-Pgf, D2-1/10Pgf e D8-1/20Pgf) e dos grupos submetidos aos mesmos tratamentos em CLs imaturos e maduros (C, D, E e F) durante as 48h de avaliação após o tratameto. (*) diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo.

6.3. Avaliação da perfusão vascular do CL

A perfusão vascular (%) foi avaliada objetiva e subjetivamente. Para PVO foram detectadas diferenças entre grupos ($P < 0,05$) e estas dependeram do momento avaliado ($P < 0,05$).

A média geral entre os grupos detectou diferenças entre grupos: D8-NaCl > D8-Pgf, D8-NaCl < D8-1/10Pgf, D8-NaCl < D8-1/20Pgf. Não foram detectadas diferenças entre os grupos tratados no D2.

Quando comparados diferentes tratamentos em um mesmo estágio de desenvolvimento do CL, a PVO foi maior no grupo D8-NaCl quando comparados aos grupos: D8-Pgf em H24 e H48; D8-1/10Pgf em H24, H30, H36 e H42; e D8-1/20Pgf em H24 e H30). O grupo D8-NaCl tendeu a ser maior que os grupos: D8-Pgf em H42; e D8-1/20Pgf em H18 e H36 (Figura 4).

Quando comparados os mesmos tratamentos em diferentes estágios de desenvolvimento do CL, a PVO no grupo D2-NaCl foi menor que no grupo D8-NaCl em H0 e h24 e tendeu a ser menor em H18. No grupo D2-Pgf, PVO foi menor que no grupo D8-Pgf em H0 e tendeu a ser menor em h6. No grupo D2-1/10Pgf foi menor que no grupo D8-1/10Pgf em H0, enquanto que no grupo D2-1/20Pgf tendeu a ser menor que no grupo D8-1/10Pgf em H0 (Figura 4).

No grupo D8-1/10Pgf, H0 apresentou maior PVO que nos momentos H30, H36 e H42 e tendeu a ser maior que no H48 (Figura 4).

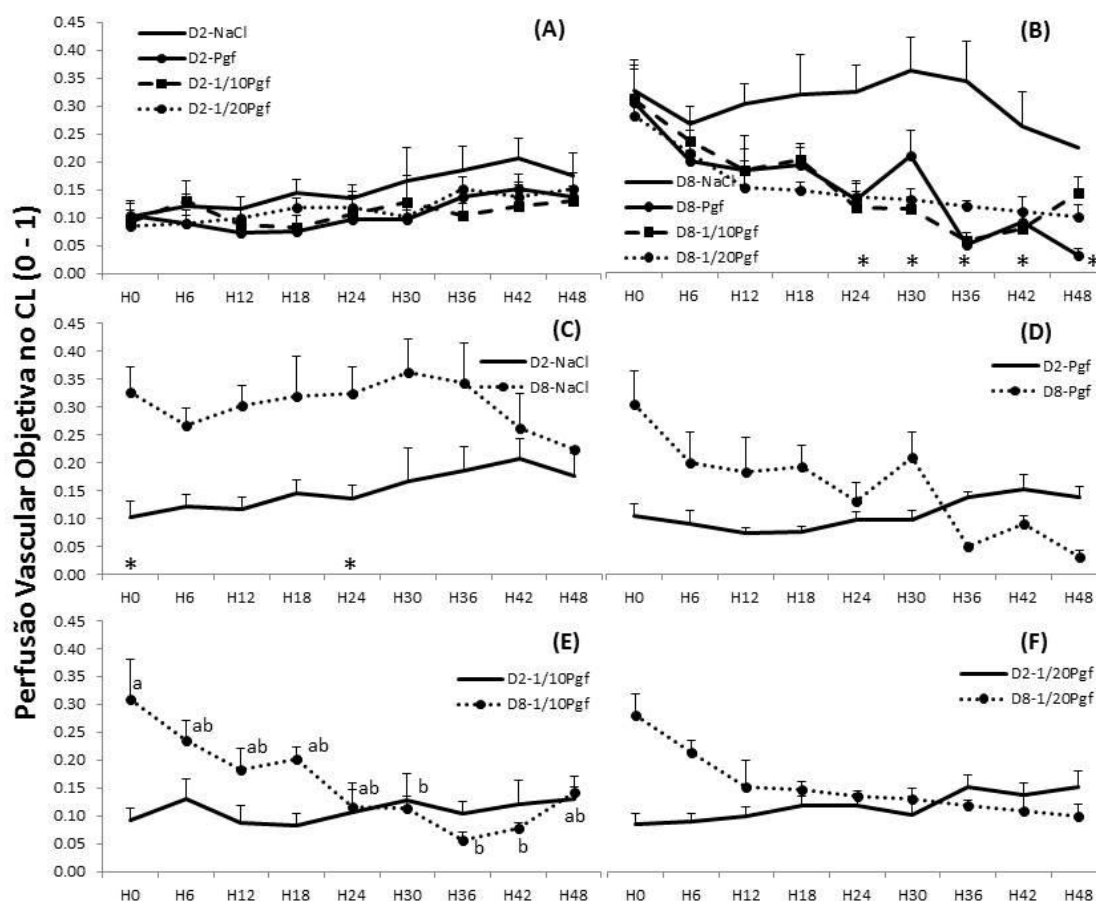


Figura 4 – Perfusão vascular objetiva (médias $\pm$ EPM) no CL avaliadas de 0 – 1 (1 = 100% de perfusão) dos grupos tratados no D2 (A), no D8 (B), e dos grupos submetidos ao mesmo tratamento em CLs imaturo e maduro (C, D, E e F) durante 48h de avaliação pós-tratamento. (*) diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo.

Para PVS foram detectadas diferenças entre grupos ($P < 0,05$), entre momentos ($P < 0,05$) e as diferenças entre grupos dependeram do momento avaliado ($P < 0,05$).

A média geral entre os grupos detectou diferenças entre D2-NaCl e D8-NaCl, e D8-NaCl diferiu dos grupos D8-PgF, D8-1/10PgF e D8-1/20PgF. Não foram detectadas diferenças entre os grupos tratados no D2.

Quando comparados diferentes tratamentos em um mesmo estágio de desenvolvimento do CL, a PVS no grupo D8-NaCl foi maior que nos grupos: D8-PgF em H24, H30, H36, H42 e H48; D8-1/10PgF em H18, H24, H30, H36, H42 e H48; e D8-1/20PgF em H18, H24, H30, H36 e H42. O grupo D8-NaCl tendeu a ser maior que o grupo D8-1/10PgF em H12 (Figura 5).

Quando comparados os mesmos tratamentos em diferentes estágios de desenvolvimento do CL, a PVS no grupo D2-NaCl foi menor que no grupo D8-NaCl em H0, H6, H12, H18, H24 e H30. No grupo D2-Pgf, a PVS foi menor que no grupo D8-Pgf em H0 e H6 e tendeu a ser menor em H 12. No grupo D2-1/10Pgf foi menor que no grupo D8-1/10Pgf em H 0 e tendeu a ser menor em H6. No grupo D2-1/20Pgf, a PVS foi menor que no grupo D8-1/20Pgf em H 0 e H6 e tendeu a ser menor em H18 (Figura 5).

No grupo D2-NaCl, a PVS foi maior em H0 que em H42 (Figura 5).

O grupo D8-Pgf apresentou diferença nos seguintes momentos: H0 maior que H24, H30, H36 e H42; H6 maior que H36, H42 e H48; H12 maior que H36, H42 e H48; e H18 maior que H48. O momento H6 tendeu a ser maior que os momentos H24 e H30 (Figura 5).

No grupo D8-1/10Pgf, a PVS diferiu nos seguintes momentos: H0 maior que H6, H12, H18, H24, H30, H36, H42 e H48; e H6 maior que H42. O momento H6 tendeu a ser maior que os momentos H30, H36 e H48 (Figura 5).

O grupo D8-1/20Pgf diferiu nos seguintes momentos: H0 maior que H12, H18, H24, H30, H36, H42 e H48; e H6 maior que H18, H36, H42 e H48. O momento H6 tendeu a ser maior que os momentos H24 e H30 (Figura 5).

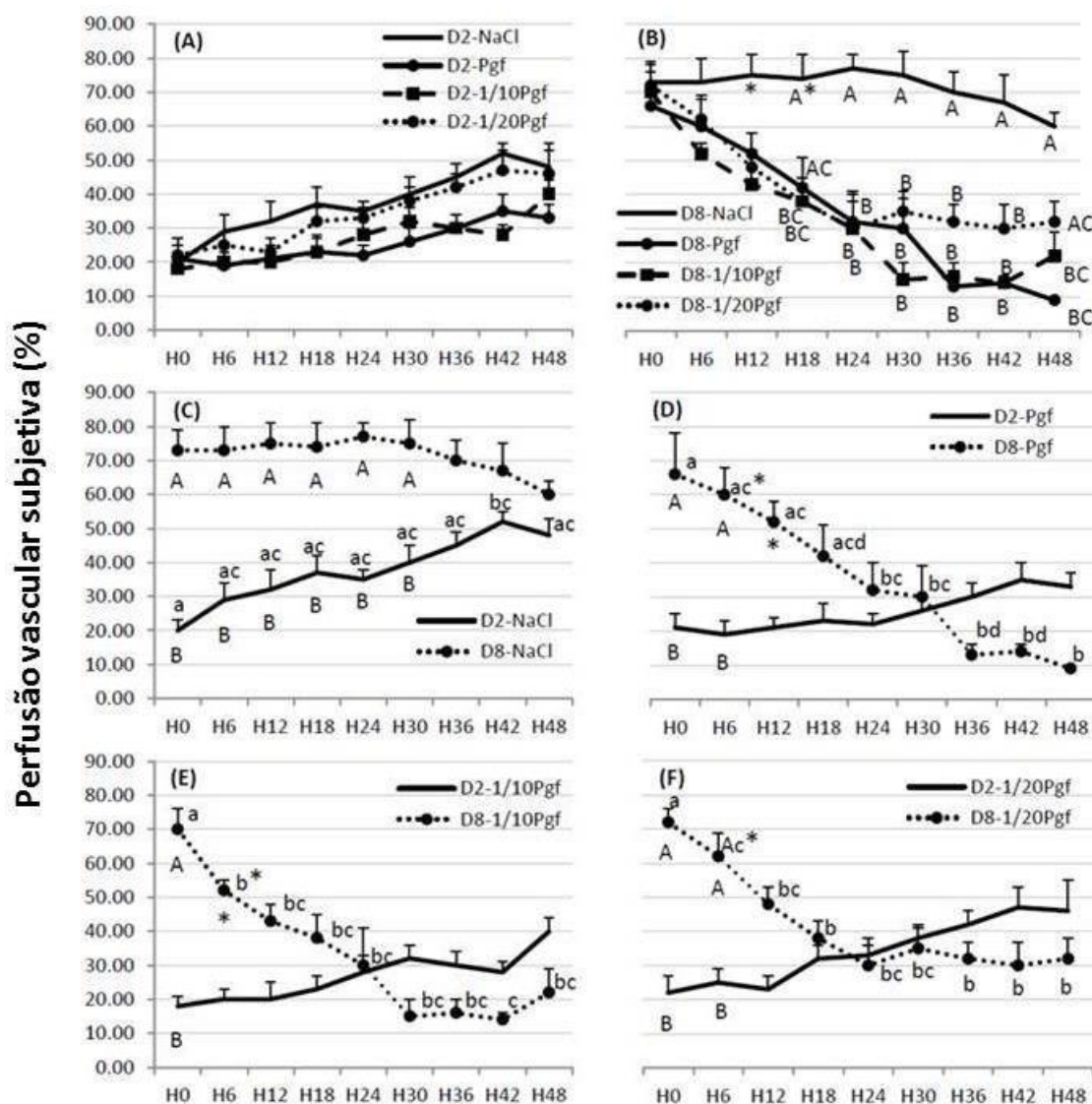


Figura 5 – A perfusão vascular subjetiva (médias $\pm$ EPM) do CL no D2 (A), D8 (B) e entre grupos submetidos aos mesmos tratamentos em CLs imaturo e maduro durante 48h de avaliação após o tratamento: (C) D2-NaCl x D8-NaCl, (D) D2-PgF x D8-PgF, (E) D2-1/10PgF x D8-1/10PgF, (F) D2-1/20PgF x D8-1/20PgF. Letras maiúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre grupos num mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo. (*) indica tendência estatística $0,05 \leq P \leq 0,09$.

6.4. Avaliação da progesterona plasmática

Para a avaliação da P4 (ng / mL) foram detectadas diferenças entre grupos ($P < 0,05$), entre momentos ($P < 0,05$) e as diferenças entre grupos dependeram do momento avaliado ($P < 0,05$).

A média geral entre os grupos detectou diferenças entre os grupos tratados no D2: D2-NaCl > D2-PgF; entre os grupos no D8: D8-NaCl > D8-PgF,

D8-NaCl > D8-1/10Pgf, D8-NaCl > D8-1/20Pgf, D8-Pgf < D8-1/10Pgf, D8-Pgf < D8-1/20Pgf; e entre os mesmos tratamentos nos diferentes momentos: D2-NaCl < D8-NaCl, D2-Pgf < D8-Pgf.

Quando comparados diferentes tratamentos em um mesmo estágio de desenvolvimento do CL, o grupo D8-NaCl apresentou maior P4 que os grupos: D8-Pgf (H18, H24, H30, H36, H42 e H48), D8-1/10Pgf (H24, H30, H36, H42 e H48), D8-1/20Pgf (H30, H36 e H48). O grupo D8-NaCl tendeu a ser maior que o grupo D8-1/20Pgf em H42. Ainda, o grupo D8-Pgf foi menor que o grupo D8-1/10Pgf (H36, H42 e H48) e o grupo D8-1/20Pgf (H30, H36, H42 e H48). O grupo D2-Pgf tendeu a ser menor que o grupo D2-1/20Pgf em H30 (Figura 6).

Quando comparado os mesmos tratamentos em diferentes estágios de desenvolvimento do CL, a P4 no grupo D8-Pgf foi maior que no grupo D2-Pgf em H0 e H6 e menor em H30, H36, H42 e H48. No grupo D8-1/10Pgf foi maior em H0 e menor em H48 quando comparado ao grupo D2-1/10Pgf. Já no grupo D8-1/20Pgf, a P4 foi maior que no grupo D2-1/20Pgf em H0 e H6 e menor em H48 (Figura 6).

Durante as 48h de avaliação pós-tratamento, o grupo D2-NaCl diferiu nos seguintes momentos: H0 menor que H36, H42 e H48. O momento H6 tendeu a ser menor que H36 (Figura 6).

No grupo D2-Pgf, os seguintes momentos diferiram: H0 menor que H6 e H6 menor que H48. O momento H6 tendeu a ser menor que o momento H42 e os momentos H18 e H30 tenderam a ser menores que o momento H48 (Figura 6).

O grupo D2-1/10Pgf diferiu nos seguintes momentos: H6 maior que H36, H42 e H48; e H12 maior que H48. Os momentos H0 e H6 tenderam a ser maiores que os momentos H48 e H30, respectivamente (Figura 6).

O grupo D2-1/20Pgf diferiu nos seguintes momentos: H0 maior que H30, H36, H42 e H48; e H6 maior que H18, H30, H36, H42 e H48. Os momentos H0 e H6 tenderam a ser maiores que o momento H24 (Figura 6).

O grupo D8-Pgf teve diferença nos seguintes momentos: H0 maior que H6, H12, H18, H24, H30, H36, H42 e H48; H6 maior que H12, H18, H24, H30, H36, H42 e H48; H12 maior que H24, H30, H36, H42 e H48; H18 maior que H24, H30, H36, H42 e H48; H24 maior que H30, H36, H42 e H48; e H30 maior que a H48 (Figura 6).

O grupo D8-1/10Pgf teve diferença na P4 nos seguintes momentos: H0 maior que H12, H18, H24, H30, H36, H42 e H48; H6 maior que H24, H30, H36, H42 e H48; e H12 maior que H30, H36 e H48. O momento H12 tendeu a ser maior que o momento H42 (Figura 6).

O grupo D8-1/20Pgf teve diferença nos seguintes momentos: H0 maior que H6, H12, H18, H24, H30, H36, H42 e H48; H6 maior que H18, H24, H30, H36, H42 e H48; e H12 maior que H24, H30, H36, H42 e H48. Os momentos H12 e H18 tenderam a ser maiores que os momentos H18 e H24, respectivamente (Figura 6).

Ainda, as análises demonstraram que a detecção de luteólise total em resposta ao tratamento depende ($P < 0,05$) do dia de administração apenas quando a dose completa de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10mg) foi administrada (D2-Pgf x D8-Pgf). Entre os outros pares de grupos (D2-NaCl x D8-NaCl, D2-1/10Pgf x D8-1/10Pgf e D2-1/20Pgf e D8-1/20Pgf) onde a hipótese foi testada não rejeita-se H_0 ($P > 0,05$), logo a resposta ao tratamento independe da fase de desenvolvimento do CL em que o tratamento foi realizado.

A luteólise total ($P4 < 1 \text{ ng/mL}$) não foi observada em nenhuma égua tratada no D2 enquanto que, no D8, foi observada em 0% das éguas (0 / 6) no grupo D8-NaCl, 100% das éguas (6 / 6) no grupo D8-Pgf, 29% das éguas (2 / 7) no grupo D8-1/10Pgf e 14% das éguas (1 / 7) no grupo D8-1/20Pgf. Ainda, no D8, os tratamentos mantiveram concentrações de progesterona acima de 2 ng/mL em 100% (6 de 6), 0% (0 / 6), 29% (2 / 7) e 57% (4 / 7) das éguas quando tratadas com 0 mg, 10 mg, 1 mg (1/10 da dose total) e 0,5 mg (1/20 da dose total) de dinoprost trometamina, respectivamente.

A luteólise parcial ($1 \text{ ng/mL} < P4 < 2 \text{ ng/mL}$) foi observada em 1 de 9 éguas (11%) no grupo D2-Pgf, 3 de 7 éguas (43%) no grupo D8-1/10Pgf e 2 de 7 éguas (29%) no grupo D8-1/20Pgf.

A concentração de P4 apresentou fraca correlação de Spearman ($P < 0,05$) com ASC (coeficiente = 0,58), PV0 (coeficiente = 0,48) e AT (coeficiente = 0,14), e forte correlação com PVS (coeficiente = 0,71) que pode ser estimada pela avaliação por ultrassonografia Doppler a partir da fórmula: $P4 = 0,71 + 11,49 \text{ (PVS)}$.

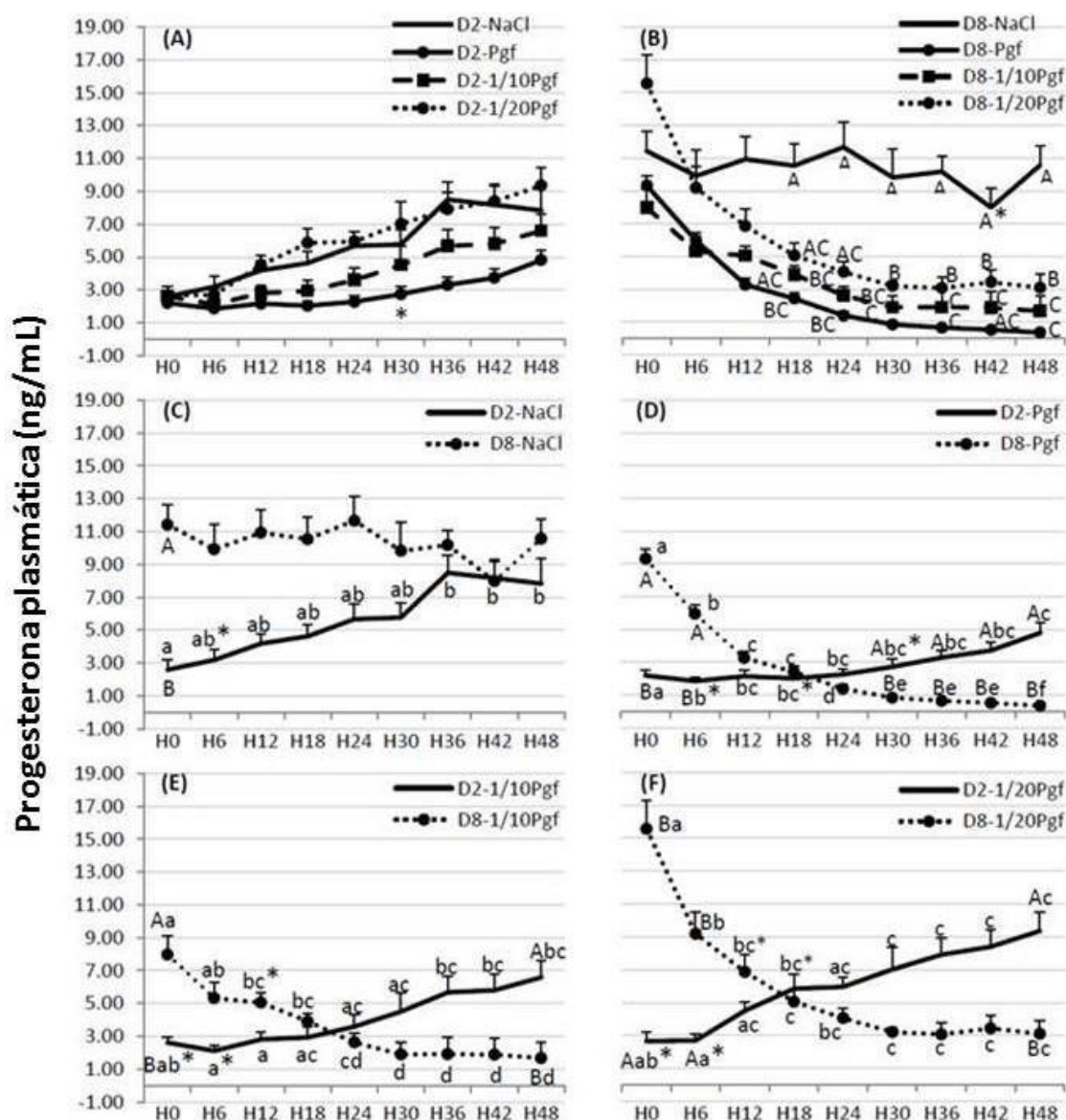


Figura 6 – Concentrações plasmáticas de progesterona (médias $\pm$ EPM) no D2 (A), D8 (B) e dos grupos submetidos aos mesmos tratamentos em CLs imaturo e maduro durante as 48h de avaliação pós-tratamento: (C) D2-NaCl x D8-NaCl, (D) D2-PgF x D8-PgF, (E) D2-1/10PgF x D8-1/10PgF, (F) D2-1/20PgF x D8-1/20PgF. Letras maiúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre grupos num mesmo momento. Letras minúsculas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre momentos de um mesmo grupo. (*) indica tendência estatística $0,05 \leq P \leq 0,09$.

7. DISCUSSÃO

Ao avaliar o efeito da administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em éguas, Ginther et al. (2007a) observaram uma queda lenta e gradual na AT do CL que se iniciou 24h após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$. No presente trabalho, ao longo das 48h de

avaliação, a AT não sofreu interferência da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ independente do dia de tratamento.

Apesar disso, notam-se diferenças entre as médias gerais da AT dos grupos sendo que as maiores áreas foram detectadas nos grupos tratados no D2 (Fig1A). Isto demonstra que CLs imaturos são maiores que CLs maduros, o que se dá porque, apesar das células luteais hipertrofiarem até o D9 (STOCCO et al., 2007), a presença de um coágulo central que contrai e regredi com o decorrer dos dias faz com que os CLs imaturos apresentem maiores áreas. Alterações estas já previamente descritas no CL (BERGFELT et al., 1998).

Para ASC, as maiores áreas foram captadas no momento zero de avaliação dos grupos em D8 quando comparados ao D2, o que se dá devido à maturidade do CL que alcança concentrações máximas de P4 a partir do D8 e que coincidem também com o maior número de sinais coloridos captados pela ultrassonografia Doppler (GINTHER et al., 2007a). Essa maior área de sinais coloridos é decorrente também da extensa angiogênese que ocorre no CL em desenvolvimento que atinge máxima proliferação endotelial entre três e quatro dias pós-ovulação (AL-ZI'ABI et al., 2003).

Os principais fatores responsáveis pela angiogênese já descritos são o VEGF, NO, fator de crescimento fibroblástico e as angiopoietinas. O VEGF parece ser um importante fator de angiogênese na égua por promover a proliferação e migração das células endoteliais, permitindo que ocorra assim, a proliferação endotelial. (TAMANINI & DE AMBROGI, 2004). O óxido nítrico parece desempenhar um importante papel tanto na formação do CL quanto na regressão deste CL. Aparentemente, o NO age junto ao TNF como um fator luteotrópico nas éguas, estimulando tanto a produção de P4 quanto a produção de PGE2, esta última responsável pela atividade angiogênica na luteogênese do CL (FERREIRA-DIAS et al., 2011).

A perfusão vascular está intimamente associada à função luteal uma vez que o número de sinais coloridos captados pelo aparelho ultrassonográfico está relacionado com o número de células sanguíneas em movimento dentro dos vasos por unidade de tempo (BEINDORFF et al., 2009). Cada célula luteal está diretamente em contato com muitos capilares, dando ao CL a característica de ser o tecido com uma das maiores taxas de fluxo sanguíneo no organismo (STOCCO et al., 2007) e a análise da hemodinâmica do CL pode ser

determinante da funcionalidade dessa estrutura em éguas (GINTHER et al., 2007a). Em bovinos, Luttgenau et al. (2011) encontrou que há relação da perfusão e do tamanho do CL com a funcionalidade do CL.

A PVO apresentou o mesmo perfil que ASC e para ambas as variáveis analisadas não foram detectadas alterações em D2, mas sim em D8. Tanto PVO quanto ASC diminuíram ao longo das 48h de avaliação após o tratamento com a $\text{PGF}_{2\alpha}$. Pela avaliação subjetiva da perfusão do CL, nas condições e com o observador do presente trabalho, maiores diferenças entre grupos não tratados com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D2-NaCl, D8-NaCl) foram detectadas bem como esta forma de avaliação se mostrou mais sensível para estimar as concentrações de P4 durante a queda ao longo do processo de luteólise. Isto talvez se deva pela maior facilidade em detectar variações de cores e intensidade delas pela avaliação visual do que apenas pela mensuração da área com sinais coloridos utilizado para calcular a PVO por programas de computador.

A interpretação da imagem obtida quanto a intensidade se refere ao grau de brilho dos pixels coloridos. Cores mais claras e com maior brilho indicam maior velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007). Em um estudo, Silva & Ginther (2010) detectaram que resultados semelhantes foram obtidos entre a avaliação subjetiva da perfusão vascular uterina e a avaliação objetiva da intensidade dos pixels por programa em computador. Os autores concluíram que a avaliação subjetiva é uma técnica útil para avaliação da perfusão uterina. No presente trabalho, resultados semelhantes, porém realizados para avaliação do CL, demonstrou que a PVS em tempo real foi eficiente para avaliar a funcionalidade do CL (medida pela produção de P4) em uma técnica rápida e que causa mínimo desconforto ao animal.

Apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D8, nota-se uma resposta dependente das diferentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ são administradas, ou seja, numericamente, quanto menor a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada menor também são as quedas em PVS e P4. Pela observação das concentrações de P4, a influência da dose sobre a funcionalidade do CL é mais evidente e reafirmam os resultados observados para as outras variáveis analisadas. Os achados aqui presentes estão em de acordo com aqueles descritos por Cuervo-Arango & Newcombe (2012) que observaram o efeito da dose de Cloprostenol. Ao avaliarem o efeito de

diferentes doses de cloprostenol (37,5 d-cloprostenol; 250, 500 e 750 ug d,1-cloprostenol) em diferentes momentos do diestro (80, 88, 96, 104, 112 horas pós ovulação) os autores observaram uma maior porcentagem de éguas que sofreram o processo de luteólise completa nas horas 96 e 104 pós ovulação quando a dose de cloprostenol era aumentada de 250 para 500 ug, ou seja, houve um efeito dose-dependente da indução da luteólise pela administração do Cloprostenol.

A redução na produção de progesterona pelo CL é explicada pela ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na repressão da expressão da Star, a proteína reguladora da estereoidogênese (STOCCO et al., 2007).

Diferente do encontrado em D8, o tratamento no D2 não impediu o aumento das concentrações de P4, porém, nota-se que há um aumento numérico e dependente também da dose, ou seja, quanto maior a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada menor foi o aumento detectado na concentração de progesterona. Utilizando as doses de 250µg e 25µg de cloprostenol no D2, Nie et al. (2003a) também observaram que os tratamentos não impediram o aumento da concentração da progesterona mas, menor aumento foi detectado quando 250 µg de cloprostenol foi aplicada. Quando 10mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram aplicados no D3, o tratamento provocou uma queda acentuada nas concentrações plasmáticas, no entanto nota-se ressurgência das concentrações de P4 (BERGFELT et al., 2006).

Os tratamentos com as diferentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D2 não foram capazes de promover a luteólise total em nenhuma égua durante este estudo e em apenas uma égua tratada com a dose completa de 10 mg de Dinoprost Trometamina foi observado luteólise parcial. Uma vez que a luteogênese é concluída três dias após a ovulação e é seguida pelo crescimento das células luteínicas até o estabelecimento de um CL maduro que finaliza sua vida útil com a luteólise (STOCCO et al., 2007), a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ antes do término da luteogênese é incapaz de provocar morte das células que ainda não finalizaram o processo de diferenciação celular.

Diferente do observado nas éguas tratadas em D2, no D8 o CL apresenta-se maduro e responsivo à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em consequência deste fato, a dose completa provocou luteólise em 100% dos animais avaliados no presente trabalho e as doses parciais provocaram diferentes níveis de resposta

quando aplicadas em éguas com CLs maduros. Nestes casos em que doses parciais foram aplicadas, foi possível observar tanto éguas que mantiveram as concentrações de progesterona acima de 2 ng/mL quanto éguas que sofreram a luteólise total e a parcial.

Porém, pelo presente estudo não foi possível confirmar a hipótese de que a ocorrência da luteólise total após administração de 1/10 e 1/20 da dose completa de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é dependente da fase de desenvolvimento do CL. Apenas quando realizado tratamento com a dose completa que a ocorrência da luteólise total é dependente do dia de tratamento. Estes dados não conferem com o encontrado por Barker et al. (2006) que ao aplicarem 1,25 mg de Dinoprost Trometamina em éguas com CLs maduros (D6 a D12) concluíram que este tratamento foi eficaz em promover a luteólise completa ($\text{P4} < 1$ ng/mL), porém alcançada em uma média de 2,14 dias após a administração única da $\text{PGF}_{2\alpha}$, enquanto que no presente trabalho só foram avaliadas as primeiras 48h.

Dentro das 48h de avaliação não foi possível observar a ressurgência funcional do CL, caracterizada por uma queda nas concentrações de P4 seguida por um aumento dessas concentrações. Ao realizar o acompanhamento diário dos níveis de progesterona, Bergfelt et al., (2006) observaram a ressurgência em 75 % das éguas tratadas com uma dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10mg – Dinoprost Trometamina) três dias após a ovulação. Das éguas que apresentaram ressurgência, 50 % delas tiveram um aumento menor que 1,5 ng/mL de progesterona que durou cerca de dois dias (caracterizado como ressurgência menor) e as outras 50 % tiveram um aumento maior que 3,0 ng/mL, caracterizado por ressurgência maior, e que durou pelo menos 6 dias antes de uma nova queda.

A não observação da ressurgência neste estudo pode ser explicada pelo dia de realização do tratamento. O CL finaliza o processo de diferenciação de células da granulosa em células lúteas no D3 enquanto que a hipertrofia dessas células lúteas se mantém até o D9 (STOCCO et al., 2007). Devido ao estágio imaturo do desenvolvimento dos CLs em D2, estes não responderam ao tratamento promovendo a queda nas concentrações de P4 e apenas um aumento mais lento das concentrações de P4 foram observadas.

Embora o tratamento com a $\text{PGF}_{2\alpha}$ em CLs imaturos (D2) não tenha promovido a luteólise total, esse aumento mais lento nas concentrações de P4 podem atrasar o desenvolvimento embrionário e comprometer o estabelecimento e a manutenção da gestação (MOCKLIN et al., 2006; TROEDSSON et al., 2001).

Ainda, o curto período de avaliação do CL no presente trabalho, ao longo das 48h após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, pode não ter sido suficiente para captar outras alterações no aumento da P4 ao contrário de outros trabalhos que avaliaram o CL por um período maior (TROEDSSON et al., 2001; NIE et al., 2003a, b; BRENDENMUEHL, 2002). Bergfelt et al. (2006) observaram o início da ressurgência funcional dos CLs tratados no D3 a partir do sexto dia do ciclo, ou seja, próximo das 72h após o tratamento com a $\text{PGF}_{2\alpha}$.

8. CONCLUSÕES

- A avaliação subjetiva da perfusão vascular é um método simples, rápido e é uma análise confiável para estimar a funcionalidade do CL.
- A queda das concentrações de progesterona após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D8 é dependente da dose aplicada de hormônio.
- A administração de diferentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em CLs imaturos dois dias após a ovulação não foi suficiente para causar queda nas concentrações de progesterona.
- A avaliação do CL por 48 horas após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não foi eficaz na detecção de possíveis modificações transitórias na concentração plasmática de progesterona e na perfusão vascular.
- A resposta ao tratamento com 10 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é dependente da fase do desenvolvimento do CL, sendo os CLs imaturos menos responsivos aos CLs maduros.

9. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 651-658, 2002.

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

ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17b in determining the time of luteolysis in heifers. **Biol Reprod**, v. 81, p. 426–437, 2009.

BARKER, C.; ECHEVERRIA, K.; DAVIS, M.; WHISNANT, C. S.; PINTO, C. R. F. Effects of different doses of PGF_{2α} on luteal function and on the subsequent estrous cycle. **Animal reproduction science**, v. 94, p. 207-209, 2006.

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.; GINTHER, O. J. Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses and ponies. **J Equine Vet Sci**, v. 16, p. 66–72, 1996.

BERGFELT DR, PIERSON RA, ADAMS GP. Form function of the corpus luteum. In: RantanenNW, McKinnonAO, editors. **Equine diagnostic ultrasonography**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p. 221–32 [Chapter 20].

BERGFELT, D. R.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Regression and resurgence of the CL following PGF_{2α} treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1605-1619, 2006.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 129-138, 2002.

BOURNE GR, 1981: A review of metabolism and clearance studies with ¹⁴C-cloprostenol in the cow. **Acta Vet Scand**, v. 77 (Suppl.), 5–9

BRENDEMUEHL, J. P. Effect of oxytocin and cloprostenol on luteal formation, function and pregnancy rates in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 623–626, 2002.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. Relationship between dose of cloprostenol and age of corpus luteum on the luteolytic response of early dioestrous mares: A field study. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 660-665, 2012.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Route of prostaglandin f2a injection and luteolysis in mares. **Proc soc exp biol med**, v. 148, p. 263–269, 1975.

FERREIRA J. C., GASTAL E. L., GINTHER O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v.135, p. 541-550, 2008.

FERREIRA, J. C.; IGNÁCIO, F. S.; MEIRA, M. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **acta scientiae veterinariae** (ufrgs. impresso), v. 39, p. s105-s111, 2011.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, M. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. **ciência rural** (ufsm. impresso), v. 41, p. 1063-1069, 2011.

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

FRASER, H. M.; BELL, J.; WILSON, H.; TAYLOR, P. D.; MORGAN, K.; ANDERSON, R. A.; DUNCAN, W. C. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, V. 90, P. 427-434, 2005.

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

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

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biol reprod**, v. 73, p. 315–323, 2005.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of equine veterinary science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. second edition. editora cross plains wi:equiservices, 1992.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses**. Ed. 2. cross plains, wi, equiservices publishing, 1995.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography**. Ed. oj ginter,1. ed. cross plains: equiservices publisnig, 2007.

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, 2007a.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-pgf2alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biol reprod**, v. 76, p. 506–513, 2007b.

GINTHER, O. J.; RODRIGUES, B. L.; FERREIRA, J. C.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-pgf2alpha (pgfm) and relationships between pgfm pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reprod fertil dev**, v. 20, p. 684–693, 2008.

GIRSH, E.; WANG, W.; MAMLUK, R.; ARDITI, F.; FRIEDMAN, A.; MILVAE, R. A, MEIDAN, R. Regulation of the endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin f2a. **Endocrinology**, v. 137, p. 5191–5196, 1996.

KINDAHL, H.; EDQVIST, I. F.; BANC, A.; GRANSTRÖM, E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F2α during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. **Acta Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 82, p. 134 –149, 1976.

LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; ROTH, Z.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO, A. Administration of prostaglandin F2a during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its Type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. **Biol Reprod**, v. 63, p. 377–382, 2000.

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

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

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

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2rz in corpus luteum function. **Rev Reprod**, v. 5, p. 1-5, 2000.

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

MOCKLIN, C. M.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E.; LYLE, S. K.; WOUTERS, E. G. H.; GENTRY, L. R.; GODKE, R. A. Effect of post-ovulatory PGF_{2α} or cloprostenol on plasma progesterone concentration in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 220-222, 2006.

NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W.; BRADEN, T. D. Luteal function in mares following administration of oxytocin, cloprostenol or saline on Days 0, 1 or 2 post-ovulation. **Theriogenology**, v. 60, p. 1119–25, 2003a.

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

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

PACCAMONTI, D. L.; RODRIGUEZ, H. F.; MYERS, M. W.; GODKE, R. A. Effect of PGF or hCG administration during the early luteal phase on progesterone secretion in the mare. **Proc Am Assoc Eq Pratt**, v. 37, p. 151-159, 1991.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, v. 23, p. 795–806, 1985.

RICHARDS, J. S.; HEDIN, L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Annu Rev Physio**, v. 50, p. 441–463, 1988.

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

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, p.755-761, 2005.

SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction (Cambridge)**, v. 139, p. 453-463, 2010.

STOCCO, C.; TELLERIA, C; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v.28, p.117-149, 2007. TOWNSON DH, GINTHER OJ. Ultrasonic echogenicity of developing corpora lutea in pony mares. **Anim Reprod Sci**, v. 20, p.143–53, 1989.

TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. **Reprod Domest Anim**, v. 39, p. 206-216, 2004.

TOWNSON, D. H.; GINTHER, O. J. Ultrasonic characterization of follicular evacuation during ovulation and fate of the discharged follicular fluid in mares. **Anim Reprod Science**, v. 20, p. 131–141, 1989.

TROEDSSON, M. H. T.; ABABNEH, M. M.; OHLGREN, A. F.; MADILL, S.; VETSCHER, N.; GREGAS, M. Effect of periovulatory prostaglandin F2a on pregnancy rates and luteal function in the mare. **Theriogenology**, v. 55, p. 1891–1899, 2001.

WUTTKE, W.; PITZEL, L.; KNOKE, I.; THEILING, K.; JARRY, H. Immune-endocrine interactions affecting luteal function in pigs. **J. Reprod. Fertil**, v. 52, p. 19–29, 1997.

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

10. TRABALHO CIENTÍFICO

10.1. Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Equine Veterinary Science

Effect of partial doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on CLs in different phases of development

L.F. Novaes Filho¹, J.C. Ferreira¹, F.S. Ignácio¹, J.C.F. Pantoja¹, H.S. Canesin¹, Y.L. Boakari¹, R.M. Romano¹, C. Meira¹.

¹ School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP 18610-970, Brazil; e-mail address: lfernandonovaes@gmail.com; meira@fmvz.unesp.br

Abstract

Recent studies have demonstrated different response of the CL to different doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on different moments. The present experiment aims to evaluate the effect of treatments with $PGF_{2\alpha}$ low doses over functional and structural characteristics of the CLs at two distinct stages. Mares were randomly assigned into groups: D2-NaCl (n=6; 2 mL of saline solution); D2-Pgf (n=9; 10 mg of Dinoprost Tromethamine); D2-1/10Pgf (n=6; 1 mg of Dinoprost Tromethamine); D2-1/20Pgf (n=6; 0,5 mg of Dinoprost Tromethamine); D8-NaCl (n=7; 2 mL of saline solution); D8-Pgf (n=6; 10 mg of Dinoprost Tromethamine); D8-1/10Pgf (n=7; 1mg of Dinoprost Tromethamine); D8-1/20Pgf (n=7; 0,5 mg of Dinoprost Tromethamine). Total area (AT), objective (PVO) and subjective (PVS) vascular perfusion of the CL and plasmatic progesterone (P4) were evaluated every six hours for 48h after treatment (H0 = immediately before treatment). $PGF_{2\alpha}$ did not influence on AT or day of treatment. P4 showed a positive correlation to PVO and PVS, and PVS was strongly correlated to P4. Treatment on D2 was not able to induce total luteolysis in any mare while treatment on D8 promoted total luteolysis in all mares in group D8-Pgf and 29% and 14% of the mares for the groups D8-1/10Pgf and D8-1/20Pgf, respectively. Partial luteolysis was also detected in groups on D8. The response to $PGF_{2\alpha}$ seems to be dose-dependent, the decrease in $PGF_{2\alpha}$ dose proportionally decreases PVS and P4. It is concluded that CL response to treatment with different doses of $PGF_{2\alpha}$ depends on the CL developmental stage, D2 or D8.

Keywords: corpus luteum, luteolysis, mare, progesterone, prostaglandin $F_{2\alpha}$.

1. Introduction

The CL is a temporary gland which is responsive to determine the estrous cycle length by the progesterone production [1]. Also, because its ecboic function (a drug that tends to increase uterine contractions), prostaglandins $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) may be used during the periovulatory period to facilitate uterine clearance in estrous and after insemination [2,3]. For these reasons, luteolytic agents are widely used to improve reproductive efficiency of mares.

$PGF_{2\alpha}$ doses have been well defined in mares [4], however, recent studies have demonstrated different responses of CL when reduced doses [2] or in different phases of the CL development [5,6] $PGF_{2\alpha}$ were administered. Treatment with low $PGF_{2\alpha}$ doses may lead to a partial regression of the CL (reduction of plasmatic progesterone concentrations without reaching a total luteolysis) and, as seen in immature CLs, followed by a resurgence of progesterone production [2]. But the mechanisms of how it works and what doses are needed have not been well elucidated.

As the CL is one of the most vascularized structures in the organism, and is dependent of the blood flow for keeping it functional, studies have been delined to determine the efficacy of Doppler ultrasonography as a technique to evaluate vascularity and CL function [7,8].

The present study aims to: a) characterize the partial luteolysis phenomenon after administration of low doses of a natural $PGF_{2\alpha}$ in mares, b) determine the plasmatic progesterone profile during the 48h post administration of different doses of $PGF_{2\alpha}$ in mares with immature and mature CLs; c) evaluate the efficiency of power-flow mode of Doppler ultrasonography over the luteolysis process; d) test the hypothesis that the treatment response depends on the CL developmental phase.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and experimental groups

The experiment was conducted from August to October of 2012 in the southern hemisphere in accordance with the principles of ethical animal experimentation which was approved by the Board of Ethics in Animal Experimentation. Fifty four estrous cycles of 18 crossbred mares, 4 to 15 years of age and weighing between 250 and 500 Kg from UNESP School of Veterinary Medicine (Botucatu, Sao Paulo, Brazil, Latitude, -22° 53' 09" and Longitude, 48° 26' 42"). Throughout the course of the experiment, all mares were in good body condition and cycling, confined to paddocks with shelter, and nourished with hay (*Cynodon dactylon*), concentrate, mineral supplement, and water.

Ultrasonography B and power-flow Doppler modes were done transrectally with a linear multifrequencial (5 a 9 Mhz) transducer attached to a Sonoace Pico (Medison do Brasil Ltda) equipment. All settings were kept constant during the whole period of data collection.

Ovulation were induced with an intravenous injection of 2,500 UI of hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Brazil) when a pre-ovulatory follicle ($\geq 35\text{mm}$) and uterine edema were detected [9]. Every six hours after ovulation induction, ultrasonographic exams were done with the objective of a closer detection of ovulation and a better determination of the CL age. Day of ovulation was considered D0.

Mares were randomly assigned into groups making sure that all groups were simultaneously evaluated.

2.1.1. Effect of low doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ over the immature CL in mares

To study the effect of low doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ over the functional and ultrasonographic characteristics of CLs during the luteogenic period (D2), 27 estrous cycles were randomly assigned into groups: a) D2-NaCl (n = 6), negative control, injection of 2 mL of saline solution; b) D2-Pgf (n = 9), positive control, injection of 10 mg of Dinoprost Tromethamine (Lutalyse®, Pfizer Animal Health, Brazil), c) D2-1/10Pgf (n = 6), injection of 1 mg of Dinoprost

Tromethamine; e d) D2-1/20Pgf (n = 6), injection of 0.5 mg of Dinoprost Tromethamine. All treatments were done by a single intramuscular injection 48h after detection of ovulation (H0) to ensure that all CLs were in the luteogenic phase.

2.1.2. Effect of low doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ over the mature CL in mares

To study the effect of low doses of $PGF_{2\alpha}$ over the functional and ultrasonographic characteristics of mature CLs (D8), 27 estrous cycles were randomly assigned into groups: a) D8-NaCl (n = 7), negative control, injection of 2 mL of saline solution; b) D8-Pgf (n = 6), positive control, injection of 10 mg of Dinoprost Tromethamine, c) D8-1/10Pgf (n = 7), injection of 1 mg of Dinoprost Tromethamine; e d) D8-1/20Pgf (n = 7), injection of 0.5 mg of Dinoprost Tromethamine. All treatments were done by a single intramuscular injection eight days after detection of ovulation (H0).

2.2. Experimental parameters

All parameters were evaluated every six hours during 48 hours after treatment and the first evaluation were done just before treatment.

2.2.1. Total area and luteal vascular perfusion

The entire CL was scanned in a slow continuous motion. Real-time B-mode/color-flow images of the continuous scans were captured with a digital video-taping program and stored for evaluation in the laboratory of the CL area and blood-flow area, as described by Ginther et al. [10].

The area with colored signals (ASC) was determined from three still images selected sections that appeared to represent maximum area and optimal area of color-flow signals. The CL total area was determined from the same still images as the area of color-flow signals. Each image was captured from the film clips using Adobe Premiere Pro 1.5 software (JPEG format; Adobe System, San Jose, CA, USA). Colored spots were extracted from the still images using Adobe PhotoShoop 5.5 software (Adobe Systems). The area of

colored signals was determined using the Image J software as described [11]. Total area was also determined by the same software.

Vascular perfusion was defined as the percentage of the total area with colored spots. The subjective vascular perfusion (PVS) was determined by the same technician during the real time video evaluations and was graduated from 0 to 100% of the CL area with colored signals. The objective vascular perfusion (PVO) was determined from the capture images by the following formula: $(ASC/AT)100$.

2.2.2. Plasmatic progesterone profile

Blood samples were collected every six hours from H0 to H48 through jugular venipuncture into heparinised tubes, beginning immediately before treatment. Blood samples were centrifuged and plasma samples were stored at -20°C for P4 radioimmunoassay (RIA) evaluation using commercial kits Coat-a-Count, DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) and following the manufacture's instruction.

To determine the accuracy of the test, a pool of plasma was repeated six times and was used in duplicate. The intra-assay error and the sensitivity of the test were calculated, 7.5% and 0.01 ng / mL, respectively.

Total luteolysis was detected when progesterone concentrations got values below 1 ng / mL [12], we considered as partial luteolysis when progesterone concentrations were between 1 and 2 ng / ml during the 48 hours of evaluations and resurgence when a drop followed by a increase in progesterone were detected during the following hours of evaluation.

2.4. Statistical analysis

Analysis were done among groups on D2 (D2-NaCl, D2-Pgf, D2-1/10Pgf and D2-1/20Pgf), among groups on D8 (D8-NaCl, D8-Pgf, D8-1/10Pgf and D8-1/20Pgf) and between the pair of groups submitted to same treatment on D2 and D8 (D2-NaCl x D8-NaCl, D2-Pgf x D8-Pgf, D2-1/10Pgf x D8-1/10Pgf and D2-1/20Pgf x D8-1/20Pgf).

Before analysis, P4 data were converted to log to achieve normality. A mean of the three capture images of each moment of the CLs were used for the analysis. Models for repeated measures (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) were used to compare means plasma progesterone (P4), CL total area (AT), area of colored signals (ASC), subjective vascular perfusion (PVS) and objective vascular perfusion (PVO). An interaction term between group and day was included in all models to test the hypothesis that the difference between groups was dependent on the day of analysis. An autoregressive covariance structure was used to model repeated measures in the same mare. Tukey's method was used to adjust the values of P resulting from multiple comparisons.

Simple linear regression models (PROC GLM, SAS Institute, 2009) were used to assess associations between PVS x PVO, P4 x PVS, P4 x PVO, ASC x P4 and AT x P4.

A qui square test were done to test the hypothesis that treatment depends on the developmental phase of the CL (D2 or immature CL and D8 or mature CL).

All analyzes were performed at a significance level of 0.05. Statistical trend was defined as ≤ 0.05 $P < 0.10$.

3. Results

Differences among mean AT of groups were detected ($P < 0.05$), but not among moments and interactions. CL AT seems to be larger on D2 than on D8.

For ASC, differences among groups ($P < 0.05$), moments ($P < 0.05$) and an interaction between groups and moments ($P < 0.05$) were detected. When evaluations were done between the pair of groups submitted to the same treatment but administered on different days can be seen in Fig. 1.

The percentage of the area with colored spots is the PVS, when a subjective evaluation is done, and PVO, when an objective evaluation is done. For PVO, differences were detected among groups ($P < 0.05$) which were dependent on the moment of evaluation ($P < 0.05$). The mean of groups detected differences between: D8-NaCl $>$ D8-Pgf, D8-NaCl $<$ D8-1/10Pg, D8-NaCl $<$ D8-1/20Pg. Differences were not detected among groups treated on

D2. Differences between the pair of groups submitted to the same treatments but on different days are seen in Fig. 2.

For PVS (Fig. 3), differences were detected among groups ($P < 0,05$) and moments ($P < 0,05$). Differences among groups were detected on D8 ($P < 0,05$): D2-NaCl < D8-NaCl and D8-NaCl was higher than D8-Pgf, D8-1/10Pgf and D8-1/20Pgf. Differences were not detected among groups treated on D2.

For P4 (Fig. 4), differences were detected among groups ($P < 0,05$), moments ($P < 0,05$) and an interaction between groups and moments ($P < 0,05$). Group means were different when treatments on D8: D8-NaCl > D8-Pgf, D8-NaCl > D8-1/10Pgf, D8-NaCl > D8-1/10pgf, D8-1/10 > D8-Pgf, D8-1/20Pgf > D8-1/10Pgf.

Statistical analysis showed that the total luteolysis detection depended on day of treatment only when the dose of 10 mg of dinoprost tromethamine were administered (D2-Pgf x D8-Pgf). Between the other pair of groups submitted to the same treatment but on different days (D2-NaCl x D8-NaCl, D2-1/10Pgf x D8-1/10Pgf e D2-1/20Pgf e D8-1/20Pgf) the occurrence of total luteolysis did not depend on the age of CL.

Total luteolysis ($P4 < 1$ ng/mL) were not detected in any mare treated on D2 while, on D8, it was observed in 0% (0/6), 100% (6/6), 29% (2/6), 14% (1/7) of the mares in groups D8-NaCl, D8-Pgf, D8-1/10Pgf and D8-1/20Pgf, respectively. On the other hand, 100% (6/6), 0% (0/6), 29% (2/7) and 57% (4/7) of mares P4 did not reached P4 concentrations below 2 ng / mL when mares were treated with 0 mg, 10 mg, 1 mg (1/10 of the dose) and 0.5 mg (1/20 of the dose) of dinopros tromethamine, respectively.

Partial luteolysis ($1 \text{ ng/mL} < P4 < 2 \text{ ng/mL}$) were detected in 11% (1/9), 43% (3/7) and 29% (2/7) of the mares in groups D2-Pgf, D8-1/10pgf and D8-1/20Pgf, respectively.

P4 concentrations showed weak Spearman correlation ($P < 0,05$) with ASC (coefficient = 0.58), PVO (coefficient = 0.48) and AT (coefficient = 0.14), and a strong correlation with PVS (coefficient = 0.71) which can be estimated by Doppler ultrasonographic exam by the formula: $P4 = 0,71 + 11,49 \text{ (PVS)}$.

4. Discussion

Different developmental phase of the CL interfered with the response to treatment. While a drop in P4, ASC, PV0 and PVS can be seen in all groups in which mares were treated with either PGF_{2α} doses administered on D8, the same response can not be seen on D2. These findings are easily explained by the physiological development of CL in mammals. Luteogenesis is completed three days after ovulation and is followed by hypertrophy of luteinic cells until the establishment of a mature CL that ends its function when luteolysis process occurs. PGF_{2α} acts by decreasing Star expression, the steroidogenesis regulatory protein [13]. For this reason a PGF_{2α} is not capable of promoting cell death while cell differentiation is not completed and cells are responsive to it. However, it is interesting to note that the occurrence of total luteolysis was only dependent on the day of treatment when a full dose of PGF_{2α} was administered.

Treatments on D2 did not promote the occurrence of total luteolysis in any of the mares used in this study and only the full dose of PGF_{2α} (10 mg of dinoprost tromethamine) was capable of inducing partial luteolysis in one out of the 9 mares used for this group (D2-Pgf). Independent of dose, PGF_{2α} treatment did not prevent the increase in P4, however, the level of increase seems to depend on PGF_{2α} dose. This same increase in P4 after administration of different doses of a synthetic PGF_{2α} (250 µg and 25 µg of cloprostenol) on D2 has been reported before [2]. However, a different response seems to be detected when PGF_{2α} is administered one day later than chosen for this experiment. When 10 mg of dinoprost tromethamine was administered on D3, treatment led to a sharp drop in the P4 concentrations [5].

When comparing the response to different PGF_{2α} doses on D8, we can see that total luteolysis was detected in 100% of mares treated with the full dose of PGF_{2α} while a decreased percentage of mares with total luteolysis were seen as the dose of PGF_{2α} was also decreased. In contrast of what we expected, partial luteolysis was also induced on D8. Low doses of PGF_{2α} led to the detection of partial luteolysis in 43% and 29% of mares treated

with 1/10 and 1/20 of the full $\text{PGF}_{2\alpha}$ dose, respectively. These findings differ to a previous report where Barker et al. (2006) detected that a low dose such as 1.25 mg of dinoprost tromethamine was able to promote total luteolysis ($\text{P4} < 1 \text{ ng / mL}$) 2.14 days after treatment in mares treated between D6 and D12 of the estrous cycle, while in the present experiment, evaluation of P4 concentrations was only held until the second day after treatment.

The phenomenon of resurgence could not be detected in the present experiment as seen in previous reports [2,3,5]. Bergfelt et al. [5] observed that luteal gland resurgence in P4 was detected in 75% of the mares treated with 10 mg of dinoprost tromethamine on D3. Of these mares, 50% were designated as having a minor resurgence characterized by a relatively small increase in P4 ($< 1.5 \text{ ng / ml}$) that lasted about 2 days before decrease began. The other 50% of the mares were designated with a major resurgence characterized by a relatively large increase in progesterone ($> 3 \text{ ng / mL}$) that lasted about 6 days before a decrease began. When treatments were done with a $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue (cloprostenol) until D2 a delayed increase or a transient cessation or decrease in P4 that was followed by a complete or partial rebound to control concentrations [2,3] which demonstrates the capability of the day 2 CL to resume its function.

Also, a dose dependent response could be detected when treatment where done on D8 over the P4 concentrations and PVS, as a previous study had indicated [14].

Vascular perfusion is closely associated with luteal function. Each luteal cell is in direct contact with many capillaries and the CL is one of the structures with the highest blood-flow in the organism [13]. The CL hemodynamic evaluation determines its function in mares [10]. These statements explain why gradual reductions in P4 after administration of either dose of $\text{PGF}_{2\alpha}$ on D8 could be also detected in ASC, PVO and PVS.

ASC, PVO and PVS had similar profiles and for all of these variables differences were not detected when treatment were done on D2 but at the D8. Within the conditions for the present experiment and with this observer, the subjective evaluation of vascular perfusion was more efficient in detecting

changes in P4 concentrations during luteolysis induction than PVO and ASC. This might be explained by the facility in detection of variation in colors and its intensity by PVS than by pixels count. As Doppler ultrasonography is a simple and quick exam, it can be routinely used for predicting P4 concentrations. For uterine vascular perfusion, Silva & Ginther [15] concluded that the subjective evaluation is an useful technique for vascular perfusion assessment.

Major ASC for H0 on D8 where detected when compared to H0 on D2 which is explained by the higher P4 production by the CL starting at the eighth day after ovulation [10]. On the other hand, major AT is seen on D2 than on D8 because of the presence of a blood clot in the middle of the immature CLs that contracts and regresses during the course of the days [16]

AT reduction, seen in previous studies [1,10], was not detected in the present experiment probably because of the short evaluation period after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection. For the detection of AT reduction, other authors [1,10] evaluated the AT for a longer period of time (D9 to D21).

5. Conclusions

The present study concluded that:

- PVS evaluation is simple, quick and is a reliable analysis for predicting progesterone production by the CL;
- The response to $\text{PGF}_{2\alpha}$ is dose-dependent;
- Different doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in immature CLs was not sufficient to cause a decrease in P4;
- The 48 hours evaluation after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection were not effective in detecting possible transient changes in P4;
- The occurrence of total luteolysis after injection of 10 mg of dinoprost tromethamine is dependent on the stage of CL development, being immature CLs less responsive than mature CLs.

6. References

- [1] GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biol reprod**, v. 73, p. 315–323, 2005.
- [2] NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W.; BRADEN, T. D. Luteal function in mares following administration of oxytocin, cloprostenol or saline on Days 0, 1 or 2 post-ovulation. **Theriogenology**, v. 60, p. 1119–25, 2003a.
- [3] NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W.; BRADEN, T. D. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1111–1118, 2003b.
- [4] McCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.
- [5] BERGFELT, D. R.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Regression and resurgence of the CL following PGF₂ α treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1605-1619, 2006.
- [6] TROEDSSON, M. H. T.; ABABNEH, M. M.; OHLGREN, A. F.; MADILL, S.; VETSCHER, N.; GREGAS, M. Effect of periovulatory prostaglandin F_{2a} on pregnancy rates and luteal function in the mare. **Theriogenology**, v. 55, p. 1891–1899, 2001.
- [7] ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17 β in determining the time of luteolysis in heifers. **Biol Reprod**, v. 81, p. 426–437, 2009.

- [8] GINTHER, O. J.; RODRIGUES, B. L.; FERREIRA, J. C.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-pgf₂α (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, 2008.
- [9] GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, v. 50, p. 1025-1038, 1998.
- [10] 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.
- [11] GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of equine veterinary science**, v. 24, p. 516-526, 2004.
- [12] BARKER, C.; ECHEVERRIA, K.; DAVIS, M.; WHISNANT, C. S.; PINTO, C. R. F. Effects of different doses of PGF_{2α} on luteal function and on the subsequent estrous cycle. **Animal reproduction science**, v. 94, p. 207-209, 2006.
- [13] STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v.28, p.117-149, 2007.
- [14] CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. Relationship between dose of cloprostenol and age of corpus luteum on the luteolytic response of early dioestrous mares: A field study. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 660-665, 2012.

[15] SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction (Cambridge)**, v. 139, p. 453-463, 2010.

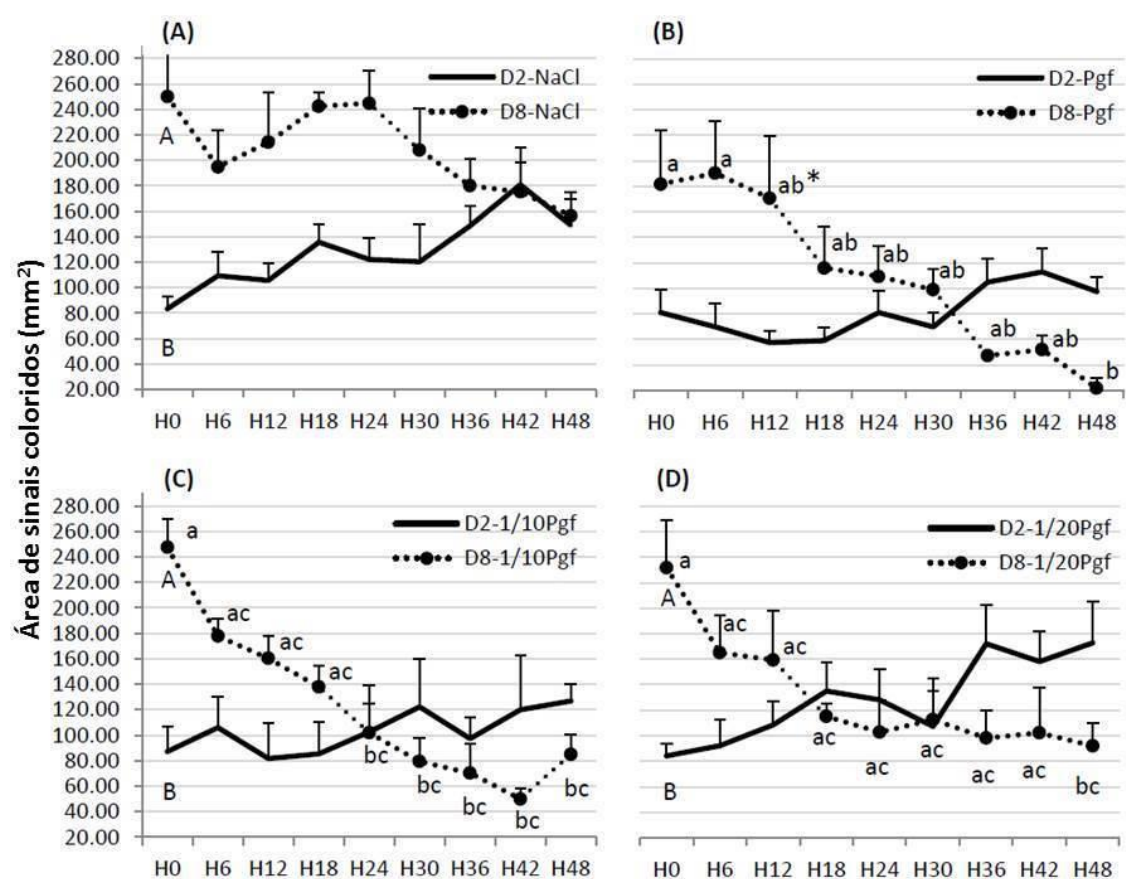


Figure 1. Means $\pm$ SEM of the ASC (mm²) capted into the CL of the pairs of groups submitted to the same treatments on different days during the 48 hours of evaluation. Small letters indicate differences ($P < 0.05$) among moments within the same groups. Uppercase letters indicate differences ($P < 0.05$) between groups within the same moments. * indicates statistical tendencies ($0.05 < P < 0.1$): (B) in group D8-Pgf, H12 tended to be major than H48.

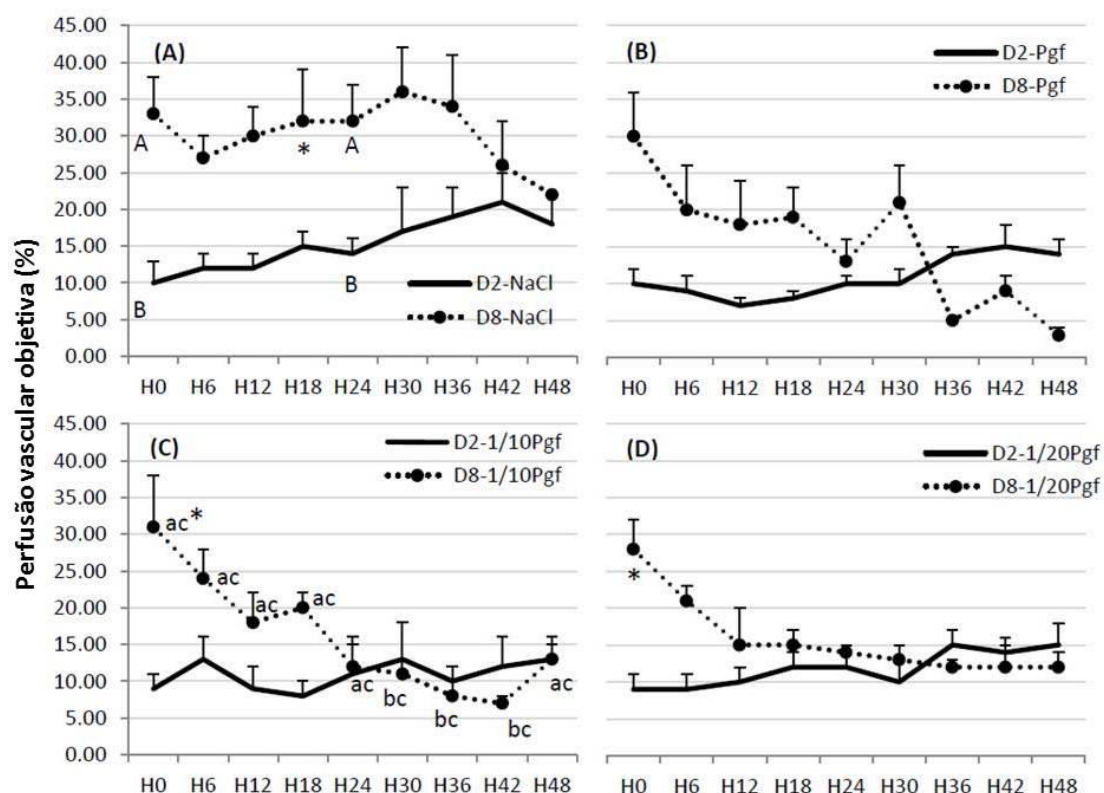


Figura 2. Means $\pm$ SEM of PVO (%) of the pairs of groups submitted to the same treatments on different days during the 48 hours of evaluation. Small letters indicate differences ($P < 0.05$) among moments within the same groups. Uppercase letters indicate differences ($P < 0.05$) between groups within the same moments. * indicates statistical tendencies ($0.05 < P < 0.1$): (A) at H18, D2-NaCl tended to be higher than D8-NaCl; (C) into group D8-1/10PgF, H0 tended to be higher than H48; (D) at H0, D8-1/20PgF tended to be higher than D2-1/20PgF.

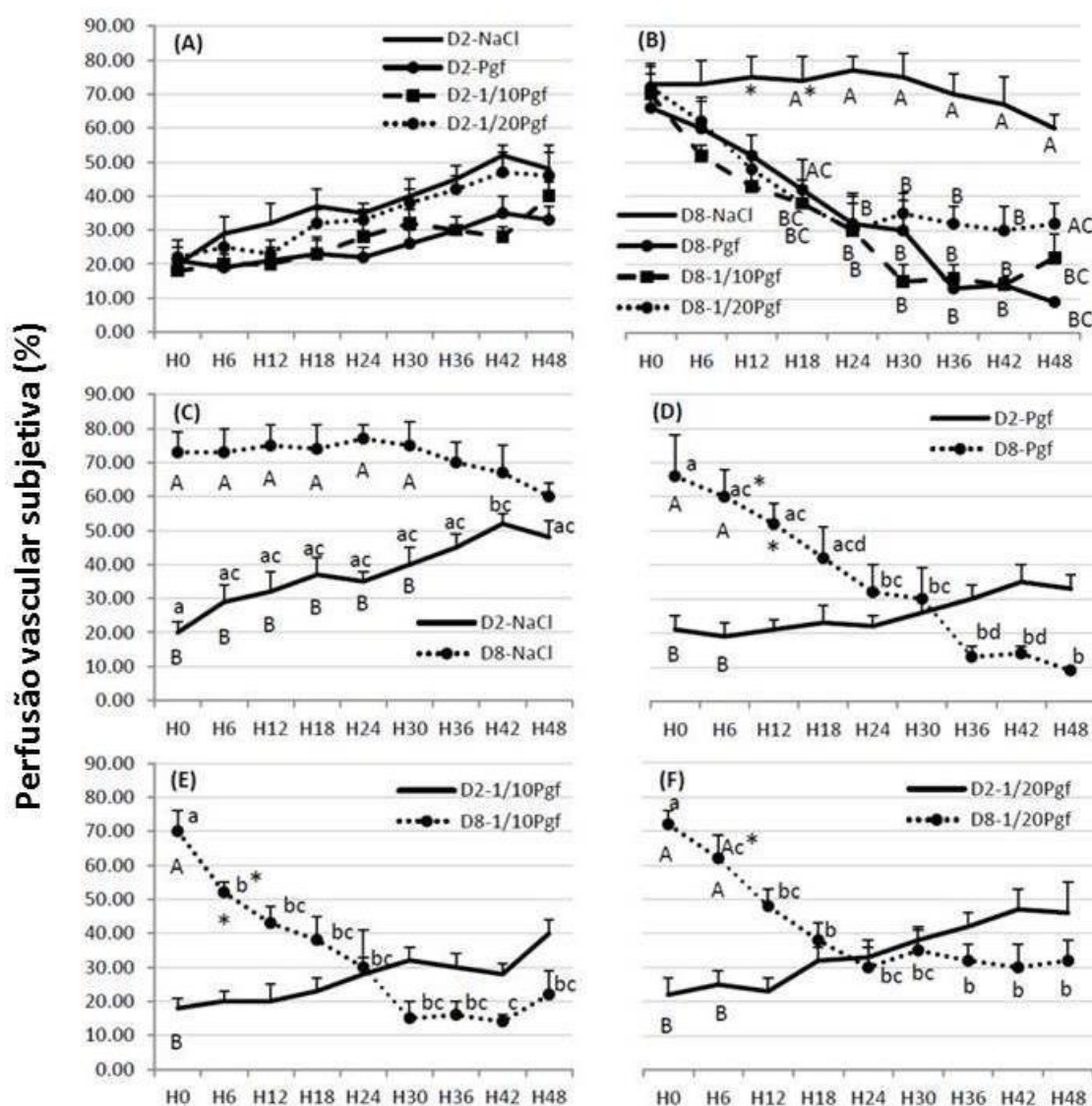


Figure 3. Means $\pm$ SEM of PVO on D2 (A), D8 (B) and between the pair of groups submitted to same treatment on different days (C, D, E and F). Small letters indicate differences ($P < 0.05$) among moments within the same groups. Uppercase letters indicate differences ($P < 0.05$) between groups within the same moments. * indicates statistical tendencies ($0.05 < P < 0.1$): (B) at H12, D8-NaCl tended to be higher than D8-1/10Pgf and, at H18, D8-NaCl tended to be higher than D8-Pgf; (D) into group D8-Pgf, H6 tended to be higher than H24 and, at H12, D8-Pgf tended to be higher than D2-Pgf; (E) into group D8-1/10Pgf, H6 tended to be higher than H30 and, at H6, D8-1/10Pgf tended to be higher than D2-1/10Pgf; (F) into group D8-1/20Pgf, H6 tended to be higher than H24 and H30.

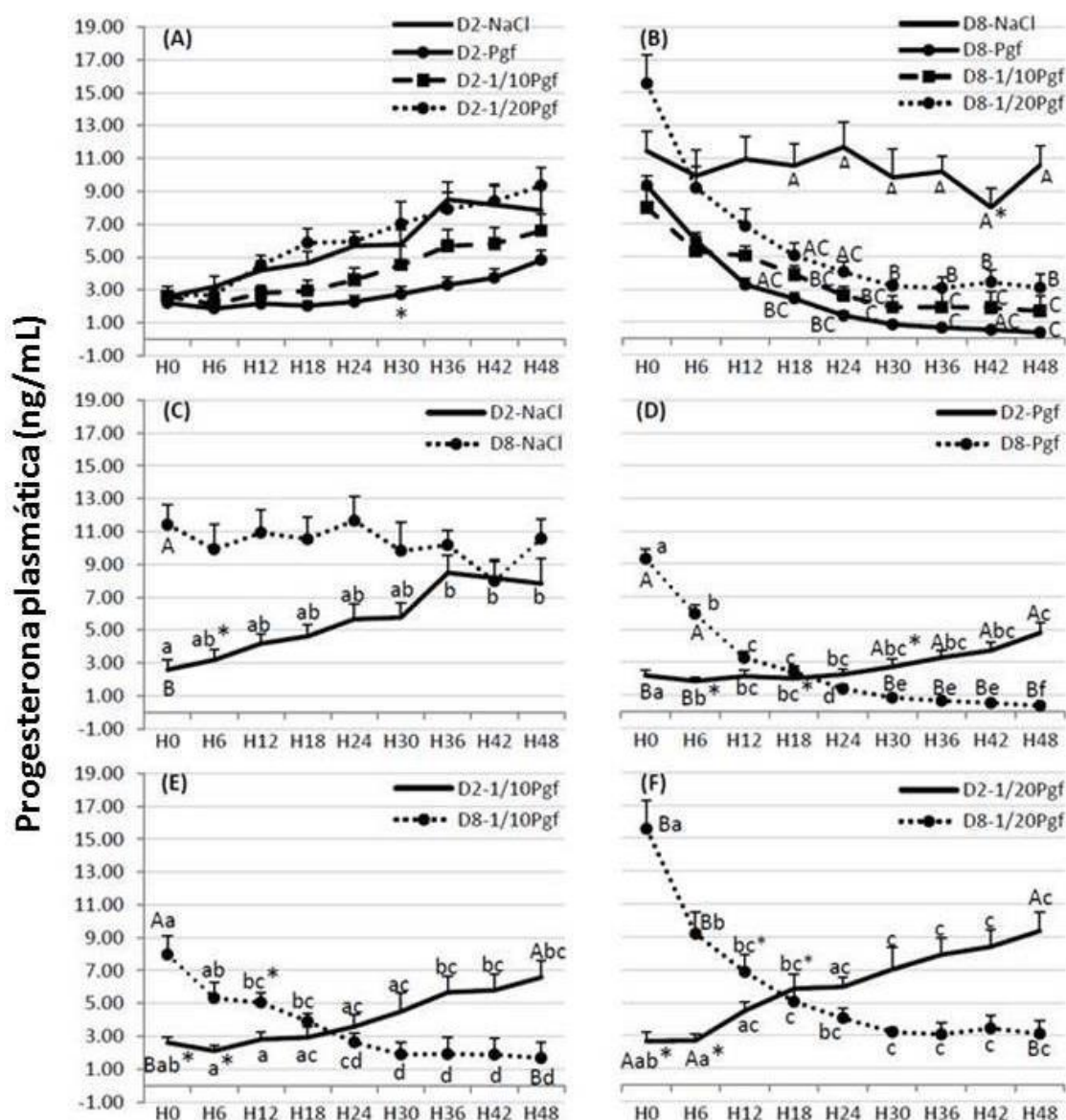


Figure 4. Means $\pm$ SEM of P4 on D2 (A), D8 (B) and of the pair of groups submitted to same treatment on different days (C, D, E and F). Small letters indicate differences ($P < 0.05$) among moments within the same groups. Uppercase letters indicate differences ($P < 0.05$) between groups within the same moments. * indicates statistical tendencies ($0.05 < P < 0.1$): (A) at H30, D2-PgF tended to be less than D2-1/20PgF; (B) at H42, D8-NaCl tended to be higher than D8-1/20PgF; (C) in D8-NaCl, H6 tended to be less than H42, H18 tended to be less than H48 and H30 tended to be less than H48; (E) in D2-1/10PgF, H0 tended to be less than H48 and H6 tended to be less than H30, and in D8-1/10PgF, H12 tended to be higher than H18 and H18 tended to be higher than H24.

10.2. Normas da revista

Journal of Equine Veterinary Science

GUIDE FOR AUTHORS

Subdivision-numbered sections

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

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. In most cases, this section should not exceed approximately 2 double-spaced pages.

Materials and methods

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

Results

Results should be clear and concise, and should correspond to data collection as described in Materials and Methods.

Discussion

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

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions

section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

Title

Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations.

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author.

Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

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, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

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.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

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

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.

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.

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).

Footnotes

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

Table footnotes

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

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure 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

Regardless of the application used, 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: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- 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, EPS 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.

Figure captions

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

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

Tables

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

References***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication

date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

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

References in a special issue

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

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

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

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2010;163:51-9.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

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

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <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>. Files can be stored on diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh).

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

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

AFTER ACCEPTANCE

Use of the digital object identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given

online). The exact system requirements are given at the Adobe site:  <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.