

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

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE ESTRUTURAS LUTEAIS  
FORMADAS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM  
ÉGUAS**

**Fernanda Saules Ignácio**

Orientador: Prof. Adj. Cezinande de Meira

**Botucatu – SP  
2013**

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

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE ESTRUTURAS LUTEAIS  
FORMADAS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM  
ÉGUAS**

FERNANDA SAULES IGNÁCIO

ORIENTADOR: Prof. Adj. Cezinande de Meira

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-  
graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP  
JANEIRO 2013

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

Ignácio, Fernanda Saules.

Avaliação funcional de estruturas luteais formadas após aspiração folicular em éguas / Fernanda Saules Ignácio. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira

Capes: 50504002

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

Palavras-chave: Corpo lúteo; Égua; Estereidogênese; Luteinização; Progesterona.

Nome do Autor: Fernanda Saules Ignácio

Título: AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE ESTRUTURAS LUTEAIS FORMADAS APÓS  
ASPIRAÇÃO FOLICULAR 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. Luciano Andrade Silva

Membro

Laboratório de Teriogenologia

ZAZ, FZEA, USP – Pirassununga/SP

Prof. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi

Membro

FMVA, UNESP – Araçatuba/SP

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Data da Defesa: 08 de Janeiro de 2013.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre me incentivou simplesmente por apoiar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma e de todas as formas ajudaram na elaboração e no bom desenvolvimento deste trabalho.

No entanto, alguns agradecimentos especiais são essenciais:

Ao professor Cezinande de Meira, pela orientação e amizade. Por toda a confiança em mim dedicada e que me fizeram crescer muito, tanto na minha vida profissional quanto pessoal. Sou muito feliz por ter dividido tantos anos de trabalho com o senhor.

A todos os professores, funcionários, residentes, estagiários e colegas de pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo bom convívio e pelo apoio, o que faz nosso departamento sempre forte.

Ao funcionário Miguel Alves pela ajuda e cuidado com os animais usados neste experimento, além do ótimo convívio e amizade. Sempre fez do dia a dia no posto de monta um momento de descontração.

Ao professor Nicolau Puoli Filho pela manutenção de nossos animais na Fazenda Edgárdia durante e fora da estação de monta.

Ao professor José Carlos Figueiredo Pantoja pelas análises estatísticas, pelas horas e horas de dedicação ao meu trabalho e por toda a colaboração no desenvolvimento de outros projetos, como a minha ida e apresentação oral no 8th ISEET, Vanvouver, CA. Meus sinceros agradecimentos.

À FAPESP pelo suporte financeiro fornecido para realização deste projeto.

Aos meus amigos que moram em meu coração, são, definitivamente, a família que me foi permitido escolher. Desde os tempos da faculdade: Andreza, Luciana, Daiane, Carol e Juliana acompanham-me sempre, mesmo de longe. Nossa amizade é eterna!!! Aos amigos que convivem comigo no meu dia a dia em Botucatu e fazem cada momento especial: Gabriel Augusto Monteiro, Yamê Fabres Robaina Sancler Silva, Ana Paula Masseno, Aline Rocha, Heloísa Canesin Siqueira, Rafael Mide Romano e Roberta Pahin Melo. Espero que

estas amizades continuem a crescer independente dos caminhos escolhidos por cada um.

Meu carinho especial para todos os estagiários que passaram pelo posto de monta na época de realização da coleta de dados que foram de suma importância para realização deste projeto. Eles, junto de outros pós-graduandos, principalmente Heloísa Canesin Siqueira, Rafael Mide Romano e Luiz Fernando Novaes Filho, e das alunas de iniciação, Adriana E. Melotto, Aline A.G. Cunha, Natália C. Abreu e Roberta P. Melo ajudaram-me muito e sempre fizeram o nosso ambiente de trabalho eficiente e agradável.

À minha amiga-irmã, com quem dividi os tempos de mestrado e, apesar de distantes, continuamos dividindo nossos momentos de alegrias e tristezas: Daniela Fernandez Montechiesi.

A todas as pessoas que passaram pelo meu caminho em qualquer fase da minha vida... Assim como os lugares... As nossas experiências são o que nos formam e, com certeza, eu não teria desenvolvido este trabalho da mesma maneira se não tivesse passado por TODAS as experiências pelas quais passei... Por isso, também saio agora uma nova pessoa.

Aos animais, principalmente os cavalos, o motivo de tudo isso. Sou apaixonada por eles!

Ao meu namorado e companheiro, Luiz Fernando Novaes Filho, com quem posso contar a qualquer momento. Sempre me dá o suporte que eu preciso, na hora que eu preciso, como eu preciso... obrigada por ter aparecido na minha vida e se manter nela! Amo você!

À minha família... Minha mãe Marcia Conti Saules, meu irmão Carlos Henrique Saules Ignácio, minha irmã Paula Saules Ignácio e minha vó Áurea Conti Saules que mesmo de longe sempre estiveram presentes em cada momento da minha vida, me apoiando e incentivando. Amo muito vocês todos e por incrível que pareça, por mais que nosso amor já seja enorme, sinto como se ele crescesse cada dia mais. Obrigada ao meu avô, Léo Waldimirof Saules, que eu sei que lá de cima também está torcendo por mim.

Obrigada a Deus, a Jesus Cristo e a todos os anjos que me guiam! Sei que sou muito iluminada pelas pessoas maravilhosas com quem convivo e por todas as oportunidades que me são dadas.

*“A força não provém da capacidade física,  
e sim de uma vontade indomável!”*

*(Mahatma Gandhi)*

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Taxa de prenhez (%) e de resposta positiva (% de éguas que atingiram concentração $\geq 2$ ng/mL entre D0 e D15) por grupo controle, aspiração e hCG + aspiração.....	47
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema de sincronização entre éguas doadoras de embriões e receptoras, ovuladas (grupo controle) ou submetidas à aspiração (grupo aspiração e grupo hCG+aspiração). Uma dose de 2500UI de hCG foi aplicada 24h antes da aspiração de folículos  $\geq 25\text{mm}$  no grupo hCG+aspiração (hCG\*)..... 25
- FIGURA 2 - Imagens capturadas para seleção da área total (limitada pela linha vermelha; A), área luteinizada (área total, limitada pela linha vermelha, subtraída da área do coágulo central, limitada pela linha verde; B) e área irrigada (área com sinais coloridos captados dentro da área da estrutura lútea; C)..... 29
- FIGURA 3 - Médias geométricas  $\pm$  SEM da P4 (ng/mL) intrafolicular quando a aplicação do hCG foi comparada: Asp (grupo aspiração; n = 22) e hCG+Asp (hCG + aspiração; n = 21). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre subgrupos ( $P < 0,05$ )..... 32
- FIGURA 4 - Médias geométricas  $\pm$  SEM da concentração de P4 (ng/mL) intrafolicular dos folículos aspirados para cada subgrupo: Aspiração  $\geq 25\text{mm}$  (n=9), Aspiração  $\geq 30\text{mm}$  (n=13), hCG + Aspiração  $\geq 25\text{mm}$  (n=11) e hCG + Aspiração  $\geq 30\text{mm}$  (n=10). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre subgrupos ( $P < 0,05$ )..... 33

- FIGURA 5 - Correlação entre diâmetro folicular (mm) no momento da aspiração e a concentração intrafolicular de P4 (log) para o grupo que não recebeu hCG previamente a aspiração (grupo aspiração)..... 34
- FIGURA 6 - Médias  $\pm$  SEM da vascularização do CL ou estrutura luteinizada formada a partir da aspiração folicular nos diferentes momentos (D0 ao D7; A) e média geral de cada grupo (B): grupo controle (n=6), grupo aspiração (n=6) e grupo hCG + aspiração (n=7). Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre grupos e letras minúsculas dentro de cada grupo ( $P < 0,05$ ). \* indica tendência estatística; grupo controle tendeu ( $P = 0,07$ ) a ser maior que o grupo aspiração..... 36
- FIGURA 7 - Médias  $\pm$  SEM da área total da estrutura lútea (CL ou formada a partir da aspiração folicular; A), porcentagem de área vascularizada sobre a área total (B), área luteinizada (área total – coágulo central; C) e porcentagem de área vascularizada sobre a área luteinizada (D) para cada grupo: grupo controle (n=6), grupo aspiração (n=6) e grupo hCG + aspiração (n=7). \* indica diferenças entre os dias dentro do mesmo grupo ( $P < 0,05$ )..... 37
- FIGURA 8 - Associações contendo valores de  $R^2$  e equações entre área total do CL ou estrutura formada a partir da aspiração folicular e P4 plasmática (A), da área de sinais coloridos e P4 plasmática (B) e porcentagem de sinais coloridos sobre a área total (C)..... 38
- FIGURA 9 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (graduado de 1 a 4) para cada grupo [controle (n=11), aspiração (n=9) e hCG +

- aspiração (n=9)] do D0 ao D7. \* indicam diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo e ao longo dos dias..... 39
- FIGURA 10 - Médias  $\pm$  SEM de RI (A) e PI (B) coletados dos vasos presentes na ligação com o mesométrio para cada grupo [controle (n=11), aspiração (n=9) e aspiração + hCG (n=9)] do D0 ao D7..... 40
- FIGURA 11 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (A), do RI (B) e do PI (C) para cada grupo [controle (n=11), aspiração (n=6) e aspiração + hCG (n=7)] do D0 ao D7 de éguas resposta positiva (P4  $\geq$  2ng/mL). Não foram detectadas diferenças entre os grupos..... 42
- FIGURA 12 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (A), do RI (B) e do PI (C) para éguas que atingiram concentração de P4  $\geq$ 2ng/mL entre D0 e D15 (resposta + ; n = 24) e para éguas que não atingiram (resposta - ; n = 5). Letras minúsculas diferem estatisticamente entre os grupos. Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo estão representadas por (\*). No grupo resposta +, a perfusão vascular uterina foi maior ao D5 quando comparada ao D1 e tendeu (P = 0,06) a ser maior que ao D3..... 44
- FIGURA 13 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (A), do RI (B) e do PI (C) para as éguas prenhes (n=16) versus não prenhes (n=7) entre o D8 e D15 das éguas resposta positiva. Diferenças estatísticas estão representadas por (\*)..... 46
- FIGURA 14 - Mediana da concentração de P4 plasmática ao longo dos dias (D0 à D7) dos grupos controle (n=13), aspiração (n=21) e hCG + aspiração (n=17). Letras minúsculas (a, b) indicam

diferenças entre grupos dentro de cada dia..... 48

FIGURA 15 Mediana da concentração de P4 plasmática ao longo dos dias (D8 à D15) dos grupos controle (n=13), aspiração (n=21) e hCG + aspiração (n=17)..... 48

FIGURA 16 Mediana da concentração de P4 plasmática ao longo dos dias (D0 à D7) dos subgrupos controle (n=13), aspiração  $\geq 25$  (n=8), aspiração  $\geq 30$  (n=13), hCG + aspiração  $\geq 25$  (n=9) e hCG + aspiração  $\geq 30$  (n=8). Letras maiúsculas (A, B, C) na tabela indicam diferenças estatísticas entre os subgrupos dentro de um mesmo dia. Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferenças entre dias dentro do mesmo subgrupo..... 49

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. A transferência de embriões e a qualidade da receptora .....	2
2.2. Maturação folicular .....	4
2.3. Ovulação .....	7
2.4. Luteinização, corpo lúteo e diestro .....	8
2.4.1. <i>Mudança na expressão de receptores</i> .....	11
2.4.2. <i>Fatores liberados pelo oócito</i> .....	12
2.4.3. <i>Hipertrofia das células foliculares</i> .....	15
2.4.4. <i>Inversão da estereidogênese</i> .....	15
2.4.5. <i>Angiogênese</i> .....	16
2.5. Aspiração folicular .....	17
2.6. Hemodinâmica uterina .....	19
3. OBJETIVOS .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1. Geral .....	22
4.1.1. <i>Aspiração folicular</i> .....	26
4.1.2. Obtenção dos embriões .....	26
4.2. Fase 1 .....	27
4.2.1. <i>Dosagem de progesterona intrafoliculares</i> .....	27
4.2.2. <i>Avaliação ultrassonográfica por modo B, Power Doppler e Doppler pulsátil</i> .....	28
4.2.3. <i>Amostra de sangue e dosagem hormonal plasmática</i> .....	30
4.3. Fase 2 (teste de fertilidade) .....	30
4.4. Análise estatística .....	31
5. RESULTADOS .....	32
5.1. Dosagem de P4 intrafolicular .....	32
5.2. Avaliação ultrassonográfica por modo B, Power Doppler e Doppler pulsátil .....	35

5.2.1.	<i>Avaliação do corpo lúteo e da estrutura aspirada</i> .....	35
5.2.2.	<i>Avaliação uterina</i> .....	39
5.3.	Amostra de sangue e dosagem hormonal plasmática .....	47
5.4.	Resposta ao tratamento e teste de fertilidade (fase 2) .....	50
6.	DISCUSSÃO .....	52
7.	CONCLUSÃO .....	61
8.	REFERÊNCIAS .....	63
9.	TRABALHO CIENTÍFICO .....	75
9.1.	Trabalho a ser enviado para a revista <i>Animal Reproduction</i> <i>Science</i> .....	75
9.2.	Normas da revista .....	93

IGNÁCIO, F.S. Avaliação funcional de estruturas luteais formadas após aspiração folicular em éguas. Botucatu. 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## Resumo

Um grande fator limitante dos programas de transferência de embrião é o número de receptoras disponíveis durante a estação de monta. A aspiração de folículos  $\geq 25\text{mm}$  promove a formação de uma estrutura lútea capaz de produzir progesterona em concentrações semelhantes ao diestro ( $>2\text{ng/ml}$ ). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a formação lútea de folículos  $\geq 25\text{mm}$  aspirados, o útero e a taxa de prenhez destes animais após a inovulação. As éguas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: grupo controle (indução da ovulação com 2500 UI de hCG), grupo aspiração (aspiração do folículo  $\geq 25\text{mm}$ ) e hCG+aspiração (aplicação de 2500 UI de hCG 24h antes da aspiração de folículo  $\geq 25\text{mm}$ ). Cada égua foi acompanhada ultrassonograficamente para detecção da ovulação, aplicação de 7,5mg de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  cinco dias após a ovulação para indução da luteólise e para determinação do momento da aspiração. O experimento foi dividido em: fase 1 – dosagens de progesterona intrafoliculares e plasmáticas e avaliação ultrassonográfica por modo B e Power Doppler das estruturas lúteas e útero; fase 2 – teste de fertilidade. As concentrações de P4 intrafoliculares foram maiores para os folículos aspirados com diâmetros maiores e a aplicação prévia do hCG aumentou estas nos folículos entre 25-29mm, bem como, a resposta ao tratamento. A aspiração folicular promoveu aumento nas concentrações de P4 plasmáticas a concentrações semelhantes ao diestro ( $\geq 2\text{ng/mL}$ ), no entanto, as estruturas formadas a partir da aspiração apresentam luteinização mais lenta. O aumento da P4 plasmática foi capaz de promover alterações uterinas semelhantes ao diestro espontâneo e taxa de 43% de prenhez foi atingida com as éguas aspiradas. Conclui-se que a aspiração de folículos  $\geq 25\text{mm}$  pode ser uma opção para os programas de transferência de embriões com escassez de receptoras, porém mais estudos

devem ser conduzidos para melhor avaliar a funcionalidade das estruturas formadas.

**Palavras-chave:** corpo lúteo, luteinização, égua, progesterona, estereidogênese.

IGNÁCIO, F.S. Functional evaluation of luteal structures formed after follicular ablation in mares. Botucatu. 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

### **Abstract**

The major limiting factor of embryo transfer programs is the number of available recipient mares during the breeding season. The aspiration of follicles  $\geq 25$  mm leads to the formation of a structure capable of producing progesterone at concentrations similar to diestrus ( $> 2\text{ng/ml}$ ). The present work aims to evaluate the luteal structure from ablation of follicles  $\geq 25\text{mm}$ , uterine conditions and pregnancy rates after embryo transfer. Mares were randomly assigned into three groups: control group (ovulation induction with 2500 IU hCG), ablation group (follicle  $\geq 25\text{mm}$  ablation) and hCG + ablation (2500 IU of hCG injection 24h before ablation of follicle  $\geq 25\text{mm}$ ). Each mare was monitored by ultrasound for detection of ovulation and the determination of the time of ablation. A 7.5 mg dose of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  was administered five days post ovulation to induce luteolysis. The experiment was divided into: phase 1 - intrafollicular plasma progesterone measurement and ultrasound evaluation by B-mode and power Doppler of luteal structures and uterus; phase 2 - fertility test. Concentrations of intrafollicular P4 were greater for larger follicles and hCG was efficient on increasing these levels on follicles 25-29mm, as well as increasing its response to treatment. Follicular ablation induced an increase in P4 plasma concentrations to values similar to diestrus ( $\geq 2\text{ng/ml}$ ), however, the formed structures showed a delay on the luteinisation process. The increase in plasma P4 was able also to promote changes in the uterus that were similar to diestrus and these mares showed a 43% pregnancy rate. In conclusion, ablation of follicles  $\geq 25\text{mm}$  can be an option for programs with limited number of recipients, however, more studies are still needed to explain the process and to improve the functional evaluation of the structures.

**Keywords:** corpus luteum, luteinisation, mare, progesterone, steroidogenesis.

## 1. INTRODUÇÃO

Salvo para algumas associações que restringem a aplicação de biotecnologias da reprodução, a transferência de embriões em equinos é amplamente desenvolvida e disseminada no Brasil. O Brasil encontra-se atualmente entre os três países com maior número de embriões transferidos por ano junto com Estados Unidos e Argentina e contém o 3º maior rebanho eqüino registrado do mundo (Food and Agriculture Organization-FAO 2002). Em 2010 foram 14.422 embriões transferidos, o que representou 43% da atividade mundial (IETS, 2011).

Um grande fator limitante nos programas de transferência de embriões é o número e a qualidade de receptoras disponíveis durante a estação de monta e a dificuldade de sincronização de ovulações entre doadoras e receptoras. Desta maneira, protocolos de utilização de éguas em anestro com ciclos artificiais têm sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a disponibilidade de receptoras por um maior período ao longo do ano e no dia da transferência (McKINNON et al., 2011). Mas, quando não há disponibilidade de receptoras não ciclantes, os resultados de programas de sincronização de ovulações entre doadoras e receptoras ciclantes utilizando progesterona (HANDLER et al., 2007) ou indução da emergência folicular pela aspiração de todos os folículos (BERGFELT et al., 2007) não têm sido rotineiramente utilizados pela inconsistência de resultados e longo tempo necessário para sincronização.

Desta forma, a aspiração de folículos com diâmetro  $\geq 25\text{mm}$  nas receptoras poderá induzir a formação luteal obtendo-se receptoras viáveis no dia da transferência por promoverem um aumento nas concentrações séricas de progesterona similares ao do diestro (HAYNA et al., 2006; MONTECHIESI, 2009).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A transferência de embriões e a qualidade da receptora

Para maximizar o sucesso de um programa de transferência de embriões os fatores que afetam as taxas de perda embrionária devem ser identificados. Os principais componentes que envolvem um programa de transferência de embriões incluem a receptora, o embrião e o procedimento de transferência (CARNEVALE et al., 2000).

Quanto a avaliação da receptora, Carnevale et al. (2001) encontraram que o tônus uterino reduzido está associado a queda na taxa de gestação e tendeu a estar associado a um aumento na perda embrionária. O tônus reduzido em receptoras pode indicar um ambiente uterino não compatível com o crescimento e desenvolvimento do embrião e parece estar envolvido com baixas concentrações de progesterona.

A dosagem de progesterona foi realizada quando as receptoras foram inovuladas no D5 (D0 = dia da ovulação) e uma maior concentração de progesterona foi encontrada nas éguas que confirmaram a gestação após a inovulação que quando comparadas às éguas que não ficaram gestantes ( $10 \pm 4,2$  e  $6,5 \pm 4,3$  ng/mL, respectivamente). Desta forma, baixas concentrações de progesterona parecem estar correlacionadas com tônus uterino reduzido e/ou tônus cervical (CARNEVALE et al., 2001).

Durante o estro, o estrógeno aumenta a expressão de receptores de progesterona no epitélio endometrial. Estudos em outras espécies mostram que a progesterona age no útero alterando as glândulas e suas secreções. Secreções estas requeridas na implantação, sobrevivência e crescimento do concepto. Também, a progesterona parece estimular o trofoblasto para que este libere fatores envolvidos com o reconhecimento materno-fetal e inibição da luteólise (SPENCE & BAZER, 2002).

O útero de todos os mamíferos contém glândulas endometriais que sintetizam e secretam ou transportam uma complexa gama de proteínas e substâncias relacionadas denominadas de histotróficas. A secreção uterina é particularmente importante para a sobrevivência do concepto e seu desenvolvimento em ovelhas, vacas, porcas e éguas, nos quais um longo

período de desenvolvimento do concepto pré-implantação precede uma ligação superficial e a placentação (SPENCER & BAZER, 2002).

Após a eclosão do blastocisto, uma série de modificações começa a acontecer no útero e no embrião, as quais resultam na implantação. Na égua, a implantação do embrião ocorre entre 30 e 35 dias após a fecundação (PRESTES & LANDIN-ALVARENGA, 2006).

O desenvolvimento do concepto até o estágio de blastocisto não parece requerer a secreção histotrófica pelas glândulas uterinas, no entanto, estudos realizados com ovelhas sem o epitélio glandular mostrou desenvolvimento normal do blastocisto ao nono dia após a cobertura, mas o desenvolvimento do concepto era interrompido durante o período de pré-implantação. Entre as secreções do epitélio glandular provavelmente encontram-se proteínas que permitem a ligação do concepto (GRAY et al., 2002).

Desta forma, a presença de uma estrutura produtora de progesterona (CL) é essencial para o estabelecimento da gestação e para isso, o dia do ciclo estral que a receptora se encontra no dia da inovulação se torna muito importante. No entanto, a concentração de progesterona plasmática mínima necessária para o estabelecimento de uma gestação ainda não é bem esclarecida.

Allen (2001) cita que durante o primeiro terço da gestação em éguas, as concentrações de progesterona circulantes podem chegar a 3 – 5 ng/mL sem provocar danos à gestação. Enquanto que, em um trabalho realizado em vacas usadas como receptoras de embriões foi encontrado que o aumento na concentração de progesterona circulante entre os dias 0 e 14 está associado com a manutenção da gestação após a transferência e que a concentração de progesterona no dia 14 está associada com a manutenção da gestação entre os dias 28 e 63. A gestação pôde ser acompanhada quando os animais apresentavam concentração de progesterona  $\geq 1,48$  ng/mL até o dia 14, no entanto, após este período a manutenção da gestação tinha menores chances de ocorrer quando as concentrações eram  $< 5$  ng/mL (KENYON et al., 2013).

## 2.2. Maturação folicular

A maturação folicular é de suma importância para a formação do corpo lúteo, pois permite que o folículo e suas células sofram alterações essenciais para a resposta das células foliculares aos fatores responsáveis pela luteinização. O desenvolvimento folicular é dividido em fases denominadas como: emergência folicular, crescimento folicular comum, divergência ou desvio e dominância (GINTHER, 1992). Em todas estas fases estão envolvidos processos responsáveis pela seleção do futuro folículo dominante e, conseqüentemente, o decorrer de um ciclo estral normal e viável.

Desde a fase de emergência folicular eventos ocorrem e culminam com a seleção do futuro folículo dominante, o que dará origem a ovulação e formação de um CL. O futuro folículo dominante emerge um dia antes dos demais e por este motivo apresenta diâmetro maior que os outros folículos, mesmo entrando numa fase de crescimento folicular comum, no qual todos crescem em média de 3mm/dia (GASTAL et al., 1997). Durante esta fase, qualquer folículo em crescimento é capaz de se tornar dominante e são responsivos às gonadotrofinas desde que a inibição do crescimento dos demais folículos pelo maior folículo (F1) seja removida, como por exemplo, pela aspiração do F1 (GASTAL et al., 1999).

A diferença na produção de fatores presentes no fluido folicular entre os dois maiores folículos (F1 e F2) próximo ao momento da divergência é associada ao estabelecimento da dominância do F1. Uma das diferenças é a maior responsividade que o futuro folículo dominante, o F1, apresenta ao FSH (FORTUNE et al., 2001) e que permite que ele continue a se desenvolver mesmo num ambiente onde o FSH apresenta baixíssimas concentrações.

A concentração de estradiol começa a aumentar no fluido folicular do F1 numa proporção maior que nos futuros subordinados (F2, F3 etc.). O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) livre aumenta aproximadamente no mesmo momento que o início do aumento do estradiol (GINTHER et al., 2001). A atividade autócrina-parácrina do IGF-1 e 2 inclui aumento do crescimento celular, aumento da produção de estradiol e aumento da sensibilidade das células da granulosa ao FSH em vacas e mulheres (GINTHER et al., 2001) e, conseqüentemente, aumento da estereoidogênese.

O sistema IGF está envolvido com o processo de divergência e consiste do IGF-1 e IGF-2, receptores de IGF, a família das proteínas de ligação (IGFBPs, ligam-se ao IGF reduzindo sua biodisponibilidade) e IGFBP protease (degradam as IGFBPs). Assim, para que o IGF livre esteja em altas concentrações no F1 as IGFBP proteases estão presentes em maiores concentrações, enquanto que no F2 as IGFBPs encontram-se em maiores concentrações e reduzem a biodisponibilidade do IGF (GINTHER et al., 2001). Ginther et al. (2004b) também demonstraram em éguas que o IGF-1 estimula a produção de progesterona, de estradiol, activina-A e inibina-A nos folículos. No entanto, o aumento no estradiol não foi atingido nas primeiras 24h após sua injeção intra-folicular de IGF-1, como detectado em vacas.

Em outro trabalho realizado no mesmo ano, Ginther et al. (2004b) demonstraram que o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um fator angiogênico que parece estar envolvido no aumento de vasos sanguíneos da parede folicular, também aumentou no folículo após injeção intrafolicular de IGF-1 e está normalmente em maiores concentrações um dia após o dia esperado do início do desvio folicular. De acordo com estes achados, Acosta et al. (2004), após avaliação por color-Doppler, encontraram que ocorre um maior aumento no fluxo sanguíneo no futuro folículo dominante quando comparado ao segundo maior folículo um dia antes do início da divergência, aumentando o suporte vascular e sendo mais um fator determinante da seleção folicular.

O sistema vascular de um adulto é geralmente estável com exceção dos ovários onde ocorre intensa angiogênese e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos durante o crescimento folicular, ovulação e subsequente formação do CL. A angiogênese é regulada independentemente em cada folículo dependendo do plexo vascular e necessidade da estrutura. Assim, a permeabilidade dos vasos e a suplementação de moléculas de grande peso molecular, precursores e lipídeos podem ser controlados (FRASER, 2006).

A divergência é o processo pelo qual ocorre a seleção do folículo dominante capaz de ovular e é morfologicamente determinada pela diferença entre a taxa de crescimento diária do maior folículo (futuro dominante) dos demais (futuros subordinados). Esta série de alterações que ocorrem na determinação do futuro folículo dominante, mesmo antes do momento da divergência detectada ultrassonograficamente, são a chave para o

entendimento da divergência e maturação folicular final (GINTHER et al., 2001).

A partir da divergência, o folículo de maior diâmetro torna-se dominante e, provavelmente, o maior responsável pela redução nos níveis de FSH. O hormônio responsável pelo crescimento do folículo dominante passa a ser, principalmente, o LH (GASTAL et al., 1999, 2000; GINTHER et al., 2003). Como demonstrado por Nogueira et al. (2007) em bovinos, a expressão de receptores de LH nas células da granulosa aumenta significativamente a partir da divergência e a indução da expressão de RNAm para receptores de LH é estimulada pelo FSH. Adequados níveis de LH circulantes são necessários para o crescimento do folículo dominante (BERGFELT et al., 2001). Bergfelt et al. (2001) demonstraram também que o LH está positivamente correlacionado com os níveis de estradiol e inibina produzidos pelo folículo durante o desvio, no entanto, não está diretamente relacionado com o desencadeamento do desvio (FORTUNE et al., 2001) e sim necessário para o folículo dominante continuar seu crescimento e ovulação, achados compatíveis com os encontrados por Gastal et al. (2000).

Como consequência do aumento do número de receptores de FSH e LH, uma característica importante do folículo dominante é sua grande capacidade esteroidogênica. Estudos realizados em bovinos (BADINGA et al., 1992; FORTUNE, 1994) e éguas (BELIN et al., 2000) demonstraram que o folículo dominante naturalmente apresenta maior concentração de estradiol no fluido folicular que os demais folículos atrésicos e folículos antes da divergência, devido ao maior número de enzimas esteroidogênicas presentes nos folículos dominantes. Assim, a queda na capacidade esteroidogênica nos folículos subordinados pode ser uma consequência fisiológica inicial de atresia (BELIN et al, 2000).

Quanto maior for o diâmetro do folículo dominante (>30mm) mais baixa é a razão progesterona:estradiol-17B (P:E) e, com a aplicação intravenosa de hCG, ocorre aumento significativo das concentrações de progesterona e redução das concentrações de estradiol no fluido folicular dos folículos dominantes, conseqüentemente, a proporção P:E torna-se maior (BELIN et al., 2000). Fato este que sugere o início da luteinização das células foliculares.

### 2.3. Ovulação

O desenvolvimento folicular pré ovulatório e a ovulação nas éguas apresentam características distintas, como: grande diâmetro do folículo (40-45 mm) e ruptura folicular restrita a fossa da ovulação (GINTHER, 1992).

O aumento do LH desencadeia a ovulação, no entanto, a maior concentração sanguínea deste hormônio é detectada dois dias após a ovulação. Segundo Gastal et al. (2006), alterações nos folículos são detectadas antes da ocorrência da ovulação, ocorrem aumentos na ecogenicidade e na espessura da granulosa (ultrassonografia por modo B) e aumento dos sinais captados por color-Doppler durante o período pré-ovulatório em 95% da circunferência do folículo, caracterizando a banda anecóica. Estas características foram maiores na base do que no ápice do folículo. É no ápice do folículo onde ocorre a ruptura para liberação do oócito durante a ovulação e neste local não foram detectados sinais de color-Doppler. Além disso, há redução dos sinais no folículo como um todo cerca de 4h antes da ovulação (GASTAL et al., 2006).

Durante o processo ovulatório, ocorre uma quebra orquestrada da parede apical do folículo que permite a liberação do oócito. Esta remodelação da matrix extracelular do folículo bem como do complexo cumulus oócito ocorre pela ação de uma variedade de proteinases. A expressão e atividade destas proteinases são marcantes a partir do aumento nas concentrações séricas de LH (CURRY & SMITH, 2006) ou pela aplicação de hCG (McCORD et al., 2011).

Como para qualquer célula em crescimento ou expansão, assim como visto até mesmo nas células tumorais, é necessário que ocorra degradação de componentes da matrix extracelular pela liberação destas metaloproteinases pelas próprias células (WOESSNER, 1991). Para que isto ocorra no folículo, o LH induz a expressão de genes e síntese de proteínas nas células da granulosa e que estão intimamente relacionados tanto com a ovulação quanto com a luteinização. Nesta fase ocorre a expressão de genes relacionados à inflamação e a formação da vascularização do CL (FAN et al., 2011).

Apesar do LH ter um papel importante na iniciação da ovulação e diferenciação das células da granulosa em células lúteas, as moléculas que respondem à ação deste hormônio e são o gatilho nestes processos ainda não

estão bem elucidadas. O LH também induz a expressão de vários fatores como o de crescimento epidermal (EGF) via ativação do receptor EGF, RAS e quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK 1 e 2) e estas últimas parecem estar envolvidas não com o desenvolvimento oocitário mas sim com a maturação final, ovulação e luteinização. Estes fatores parecem ser essenciais no momento de diferenciação das células da granulosa (FAN et al., 2009).

A ovulação ocorre numa região específica do ovário denominada fossa de ovulação, única região do ovário da égua recoberto por epitélio germinativo. Esta é uma das características mais distintas da égua já que em outras espécies a ovulação ocorre em qualquer área da superfície do ovário (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) e as mudanças bioquímicas no folículo após a estimulação do LH são: aumento na produção de progesterona, ativação de enzimas proteolíticas, aumento na síntese de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), aumento na síntese de prostaciclina ( $PGI_2$ ) e diminuição na produção de glicosaminoglicanos (PIERSON, 1992).

#### 2.4. Luteinização, corpo lúteo e diestro

Ativação dos receptores de LH nas células foliculares pelo aumento pré-ovulatório de LH provoca a ovulação e rapidamente inicia um processo de diferenciação terminal das células remanescentes da ovulação em CL por meio de um processo denominado luteinização. A transformação das células da granulosa em células luteais ocorre em poucas horas. Ocorrem mudanças genômicas e estruturais que levam a esta diferenciação em células que não se dividem e passam a ser produtoras de progesterona. As células em luteinização devem parar de dividir e iniciar a expressão de novas moléculas que permitem as células luteais a sobreviverem num ambiente hormonal diferente. Assim, o fenótipo celular luteal final depende de decodificação de genes específicos para a formação da função da célula luteal, genes para proteínas regulatórias como receptores, fatores de transcrição e proteínas sinalizantes. Esta reprogramação celular das células foliculares em células luteais é irreversível (STOCCO et al., 2007).

Em diversas espécies, o CL é derivado de ambos os tipos de células foliculares: células da teca interna e da granulosa. Nos ruminantes, células luteais pequenas são originadas a partir da teca interna, apresentam diâmetro de 12 a 20µm e contêm grande quantidade de mitocôndrias e gotas lipídicas. Essas células têm receptores para LH, os quais ativam a proteína kinase A (PKA) por meio do sistema de segundo mensageiro para estimular a síntese de progesterona. Células luteais grandes (20 a 45µm de diâmetro) são originadas de células da granulosa, responsáveis por 80% da secreção de progesterona *in vivo* também pela ativação da PKA e contêm grande quantidade de mitocôndrias (McKINNON et al., 2011).

Durante a luteogênese (processo de luteinização do CL) também está envolvida a transformação das células foliculares remanescentes em uma estrutura altamente vascularizada (NISWENDER et al., 2000).

E, para que todas as transformações ocorram, vários são os fatores envolvidos na formação lútea, tais como: interrelação das células foliculares somáticas e do oócito; hipertrofia das células foliculares; inversão da estereoidogênese; angiogênese; e mudanças na expressão de receptores (STOCCO et al., 2007).

O LH é um hormônio luteotrófico que além de participar na formação do CL ainda tem grande importância na manutenção dele durante o diestro (WATSON et al., 1995; 2000). Alta amplitude dos pulsos de LH está envolvida com a manutenção da produção de progesterona pelo CL eqüino (WATSON et al., 2000). Além disso, Kiefer et al. (1979), demonstraram que, devido ao estímulo contínuo do LH, após aplicação de prostaglandina exógena é possível que ocorra uma luteólise parcial seguida de aumento na progesterona pela re-luteinização e ressurgimento do CL.

Após a formação do corpo hemorrágico (CH), as células da teca interna e da granulosa se diferenciam em células da granulosa secretoras de estrógeno para células luteais secretoras de progesterona em associação com uma neovascularização intensa (BERGFELT & ADAMS, 2007). Este processo se completa a partir do terceiro dia após a ovulação, sendo caracterizado pelo crescimento das células luteinizadas até o nono dia (NISWENDER & NETT, 1993).

O processo de luteinização das células da granulosa que constituem a parede do folículo pré-ovulatório inicia-se antes da ovulação sendo mediado pelo LH (FERREIRA-DIAS et al., 2006). O aumento incisivo das concentrações de LH inicia-se próximo ao dia 17 do ciclo concomitante com a remoção dos efeitos supressivos da progesterona (devido à luteólise) e do estímulo positivo do estrógeno na frequência de liberação dos hormônios gonadotróficos. O maior aumento nas concentrações de LH ocorre aproximadamente dois dias após a ovulação diminuindo gradualmente, sendo caracterizado por uma meia-vida longa e atingindo concentrações basais 5 a 6 dias após a ovulação (GINTHER, 1992).

A hiperplasia das células da teca, hipertrofia das células da granulosa, proliferação de células fibroblásticas, angiogênese com migração e proliferação de células endoteliais ocorrem durante o processo de luteinização (STOCCO et al., 2007).

Além disso, vários genes são rapidamente induzidos pelo aumento do LH e estão envolvidos na ovulação e luteinização, assim como, a expressão de receptores e, conseqüentemente, a resposta biológica aos hormônios é alterada (STOCCO et al., 2007).

A secreção sérica de progesterona pelas células lúteas ocorre mais marcavelmente a partir da ovulação antes do início da redução pós ovulatória do LH. Com o fim do diestro, a progesterona começa a reduzir cerca de dois dias antes do aumento no LH. Efeito negativo dos hormônios ovarianos sobre as gonadotropinas foram demonstrados (GINTHER et al., 2005; 2007), assim como o uso de progesterona exógena reduziu a liberação de LH (BERGFELT et al., 2001; GASTAL et al., 2000) e a indução da luteólise permitiu o aumento na concentração do LH (GASTAL et al., 2000).

A concentração plasmática de progesterona depende da quantidade de tecido estereidogênico sobre o fluxo de sangue para o corpo lúteo (CL). Por outro lado, a quantidade de tecido estereidogênico depende do número e do tamanho das células lúteas, que aumentam durante o desenvolvimento do CL. A remoção de uma grande quantidade de células foliculares pode resultar na formação de um CL com um baixo número de células lúteas (NISWENDER et al., 2000).

A luteólise ocorre 13 a 16 dias após a ovulação pela liberação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pelo endométrio induzida pela ocitocina (McKINNON et al., 2011). Assim, devido a relação existente entre os hormônios ovarianos e hipofisários e o perfil ovariano no momento da luteólise (GASTAL et al., 2000), é a luteólise que determina o comprimento do ciclo estral.

#### *2.4.1. Mudança na expressão de receptores*

Uma das maiores mudanças durante a luteinização é a alteração na resposta celular aos sinais externos permitindo que as células lúteas respondam a um novo grupo de hormônios. Os receptores mais estudados são os de FSH, LH, Prolactina, estradiol e progesterona. O aumento do LH causa o silenciamento dos receptores de FSH, um declínio transitório nos receptores de LH e uma grande estimulação dos receptores de prolactina. Também promove um rápido, porém de meia-vida curta, aumento na expressão de receptores de progesterona e uma mudança na expressão dos receptores de estradiol (STOCCO et al., 2007).

Os receptores de FSH têm grande importância durante o desenvolvimento folicular, mas perdem função uma vez que as células se diferenciam. A queda na expressão destes receptores parece estar totalmente envolvida com o aumento na concentração de LH uma vez que a aplicação de hCG é capaz de reduzir sua expressão (NAKAMURA et al., 1991).

O aumento pré-ovulatório do LH também causa a ativação seguida da dessensibilização dos receptores de LH nas células luteinizadas. A mudança de um receptor ativo para uma proteína G não ligante parece estar intimamente associada com a formação de um grande agregado protéico que contém receptores de LH que se auto associam. A dessensibilização é seguida pelo “down regulation” dos receptores de LH nas superfícies celulares e seus RNA mensageiros (HUNZICKER-DUNN et al., 2003).

Receptores de prolactina e de progesterona têm suas expressões aumentadas durante a luteinização. A estimulação dos receptores de prolactina durante a luteinização é dependente de LH e sua importância parece estar relacionada à sua função anti-apoptótica que, junto da progesterona, são necessários para manter a vida do corpo lúteo (GROSDEMOUGE et al., 2003).

No entanto, e apesar do estímulo da expressão de receptores de progesterona ocorrer durante um curto período durante a luteinização e desaparecer durante a gestação, sua função e o mecanismo pelo qual este receptor é estimulado continuam não esclarecidos (ASHLEY et al., 2006).

Os receptores de estradiol então alteram sua expressão: ao invés de receptores de estradiol do tipo  $\alpha$  predominarem, como acontece nas células foliculares, receptores de estradiol tipo  $\beta$  passam a ser predominantes nas células luteais. Esta alteração é estimulada pelo LH e pode inclusive ser provocada pela aplicação de hCG. No entanto, ainda não se sabe se essa alteração é necessária para a luteinização e desenvolvimento normal do CL (STOCCO et al., 2007).

#### *2.4.2. Fatores liberados pelo oócito*

Além do nível de maturação folicular e o estímulo do LH, a luteinização das células foliculares também depende da interrupção na interrelação das células foliculares somáticas e do oócito.

Um conceito importante é que o oócito não é uma estrutura passiva no folículo ovariano, mas sim desempenha um papel central na regulação tanto da foliculogênese quanto do seu próprio crescimento, sendo um regulador fundamental de diferenciação e de função de células somáticas (GILCHRIST et al., 2008). A atividade esteroideogênica está correlacionada à capacidade de maturação do oócito (GILCHRIST et al., 2008).

O oócito tem a capacidade de impedir a luteinização folicular (LI et AL., 2000) e seu crescimento ocorre em folículos pré-antrais, em que ele está intimamente associado à células indiferenciadas da granulosa (ALBERTINI et al., 2001). Ele é, de fato, um regulador central da função da célula folicular e, assim, desempenha um papel fundamental na regulação da oogênese, taxa de ovulação e fecundidade (EPPIG, 2001; GILCHRIST et al., 2004; GILCHRIST & THOMPSON, 2007), devido a secreção de fatores de crescimento solúveis que agem por mecanismos parácrinos. Estes fatores são responsáveis pela diferenciação fenotípica entre as células do cúmulus e células murais da granulosa e previnem a luteinização folicular (NEKOLA & NALBANDOV, 1971).

As células do cumulus estão intimamente associadas ao oócito e promovem o seu desenvolvimento por meio de complexas interações bidirecionais com o mesmo, em que a estimulação de funções destas células é um fator crucial para seu próprio desenvolvimento (EPPIG, 2001).

A formação do antro, devido ao estímulo do FSH, separa fisicamente as células pré-antrais da granulosa em um compartimento ao longo da parede do folículo e as células do cumulus em um compartimento de células em torno do oócito. As células murais produzem quantidades crescentes de estrógeno, que promovem o aumento da liberação de hormônio luteinizante (LH) pela hipófise, resultando em maturação de oócitos, expansão do cumulus oophorus e ovulação (EPPIG, 2001; HUSSEIN et al., 2006; SU et al., 2004).

Já os mecanismos responsáveis pela diferenciação das células pré-antrais da granulosa em murais e células do cumulus não são totalmente definidas, mas envolvem fatores secretados pela hipófise (KUMAR et al., 1997).

Além disso, o oócito secreta fatores que podem opor-se à ação do FSH, o que, na ausência do oócito, promove a expressão em células do cumulus de características mais típicas de células murais da granulosa. Estas células murais e do cumulus são originadas de células granulosas pré-antrais e suas funções divergentes (endócrinas e de desenvolvimento) dependem principalmente do microambiente local (GILCHRIST et al., 2006).

Por estarem intimamente associadas ao oócito já se espera que uma baixa transcrição ocorra nas células do cumulus devido à ação supressora de fatores derivados do oócito. Isso ajuda a explicar por que o FSH não promove a expressão de marcadores de transcrição nas células do cumulus, embora estas possuam receptores para FSH (RICHARDS & MIDGLEY, 1976).

Há evidências de que o oócito tenha também um papel de promover a função das células do cumulus antes do pico de LH. Estas são conhecidas por promover a glicólise (SUGIURA et al., 2005), proliferação (GILCHRIST et al., 2006; VANDERHYDEN et al., 1993), transporte de aminoácidos (EPPIG et al., 2005) e sobrevivência celular (HUSSEIN et al., 2005) e podem suprimir expressões inapropriadas de receptores de LH nas células do cumulus (EPPIG et al., 1997).

Os fatores liberados pelo oócito impedem a expressão de RNAm de receptores de LH (EPPIG et al., 1997). Já foi demonstrado *in vitro* que a retirada do oócito de um meio de cultura contendo células da granulosa promove a luteinização enquanto que a manutenção do oócito inibe este processo (LI et al., 2000).

A capacidade que fatores secretados pelo oócito apresentam de evitar a luteinização folicular pode ser demonstrada pela supressão dose- dependente da estimulação do FSH na produção de progesterona pelas células da granulosa murais. Os fatores liberados pelo oócito também estimulam a produção de estradiol, mas por um mecanismo que parece ser independente do processo pelo qual ocorre a supressão da produção de progesterona (VANDERHYDEN et al ., 1993; VANDERHYDEN & TONARY, 1995; VANDERHYDEN & MACDONALD, 1998).

O oócito também regula outra série de funções das células do cumulus, que podem ser classificadas como inibidores de luteinização, porém a função exata nesta regulação ainda não está clara (DIAZ et al ., 2007).

Para melhor entender estes eventos, pesquisas visando identificar quais são estes fatores e como eles agem detectaram dois fatores de crescimento liberados pelo oócito, são eles: o fator de crescimento-diferenciação 9 (GDF9) e a proteína morfogenética de osso 15 (BMP15) (DONG et al., 1996; GALLOWAY et al., 2000). Interesse sobre elas aumentou ainda mais ao descobrir-se que ambas fazem parte da superfamília dos fatores de crescimento e diferenciação  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e além de serem requeridas no início da foliculogênese, também são reguladores centrais da diferenciação das células murais e do cumulus, da fertilidade e podem estar associadas a disfunções ovarianas (GILCHRIST et al., 2004, SHIMASAKI et al., 2004, McNATTY et al., 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre a ação das GDF9 e BMP15, além de sua interação entre elas e entre outros fatores (GILCHRIST et al., 2008).

### 2.4.3. *Hipertrofia das células foliculares*

As células da granulosa, que tem aproximadamente 10 $\mu$ m de diâmetro na ovulação, aumentam para 15 $\mu$ m em 24h após a ovulação. A hipertrofia e luteinização de células da granulosa é intensificada 10h após a ovulação e o tamanho máximo (37 $\mu$ m) é alcançado posteriormente. O tecido luteal aumenta principalmente com a hipertrofia das células luteínicas (GINTHER, 1992). De acordo com Senger (2003), as células da granulosa provenientes do folículo determinam o número de células luteais grandes no CL em formação.

Uma única e marcável modificação celular em folículos equinos durante a indução da ovulação com gonadotrofina é a extensa expansão de toda a camada de células da granulosa. Em contraste com outras espécies nas quais este processo parece estar limitado ao complexo cumulus-oócito, as gonadotrofinas no momento pré-ovulatório em éguas causam a expansão das células da granulosa murais, e este processo é associado com um abundante acúmulo de matriz extracelular (KERBAN et al., 1999). E, como demonstrado por Stock et al. (2002), a indução da ovulação com hCG promove uma expansão significativa da camada das células da granulosa em éguas.

### 2.4.4. *Inversão da esteroidogênese*

Muitas mudanças na expressão das enzimas esteroidogênicas e no tipo de esteróides produzidos ocorre durante e após a luteinização. Ocorrem mudanças estruturais e genômicas que levam a diferenciação final de células foliculares em luteais produtoras de progesterona e incapazes de se dividirem. Assim, o fenótipo final das células luteais depende de uma combinação específica de genes que são decodificados por proteínas regulatórias como os receptores, fatores de transcrição, e proteínas sinalizantes. Estas proteínas regulatórias garantem a expressão somente daqueles genes necessários para a função luteal, ou seja, garante que ao invés de produzirem estradiol as células luteais passem a produzir progesterona (STOCCO et al., 2007).

Em roedores, células luteais continuam a sintetizar androstenediona e estradiol, mas transformam-se em um substancial local de síntese de progesterona. O CL expressa altos níveis de proteínas chaves que envolvem

captação, síntese e transporte de colesterol, e do colesterol até progesterona, andrógenos assim como estrógenos. Estas proteínas são reguladas por ações hormonais (prolactina, LH e estradiol) (STOCCO et al., 2007).

A reorganização celular, objetivando o preparo das células luteais para a síntese crescente de progesterona ao longo do ciclo estral, também foi caracterizada por uma diminuição na expressão das enzimas que convertem progesterona em  $17\beta$ -estradiol (P450  $17\alpha$ -hidroxilase e P450 aromatase), por um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em progesterona (P450 clivadora de cadeia lateral - P450scc e a  $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase -  $3\beta$ -HSD) e aumento da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) na superfície da membrana mitocondrial (FRASER et al., 1986).

Segundo Bruemmer et al. (2006), a expressão gênica de enzimas envolvidas no processo de esteroidogênese foi demonstrada no CL e foi verificada a diminuição da StAR e  $3\beta$ -HSD entre os dias 12 e 14, acompanhada pela diminuição nas concentrações de progesterona a partir dos dias 12 e 13 do ciclo estral. Embora a relação temporal destas enzimas tenha sido descrita durante a regressão do CL, estes autores não atribuem a diminuição das mesmas ao processo de luteólise.

#### *2.4.5. Angiogênese*

O desenvolvimento de capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existent é essencial para a formação e função do CL e, uma extensa angiogênese ocorre no CL (STOCCO et al., 2007). Esta neovascularização é essencial para a suplementação necessária para a biossíntese de progesterona, e para a secreção de outros hormônios esteroidais pelas células luteais (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

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. O desenvolvimento de uma nova microcirculação envolve a degradação da matrix extra-celular, proliferação da célula endotelial, expansão de capilares, e desenvolvimento do lúmen capilar (maturação). A densa rede capilar que é formada supre eficientemente a

necessidade de nutrientes, hormônios e lipoproteínas ligantes de colesterol das células luteais e fornece um mecanismo rápido e eficiente do aumento da progesterona. Logo após o aumento no LH e a ovulação, as primeiras células vasculares invadem o parênquima luteal em desenvolvimento (STOCCO et al., 2007).

A regulação molecular da angiogênese no CL é complexa, com uma crescente lista de reguladores incluindo o VEGF, que é essencial para a angiogênese, fator de crescimento fibroblástico básico e angiopoietinas (STOCCO et al., 2007). O LH/hCG parece estimular a expressão de VEGF e Angiopoietinas e seus receptores (FRASER et al., 2005).

A vascularização pode ser avaliada por meio da utilização do aparelho de ultrassonografia Doppler, principalmente, pelo modo Power Doppler por ser mais sensível e captar mais sinais que o color Doppler (BOLLWEIN et al., 2002). Bollwein et al. (2002) encontraram correlação entre a captação de sinais coloridas de Doppler e a concentração sérica de progesterona que aumentaram significativamente no primeiro dia após a ovulação atingindo a concentração máxima no dia 5 e mantendo-se constante até o dia 7, quando as concentrações de progesterona também estão aumentando progressivamente. Durante este período, a área do CL também aumenta mas não tão marcadamente quanto a área de perfusão sanguínea, sendo a análise da hemodinâmica do CL mais determinante da funcionalidade dessa estrutura (GINTHER et al., 2007).

## 2.5. Aspiração folicular

Vários trabalhos utilizaram a aspiração folicular na espécie eqüina com o objetivo de estudar o desenvolvimento folicular, induzir a emergência de uma nova onda folicular e/ou à elevação dos níveis de FSH devido à inibição da produção da inibina e do estradiol pelo folículo (BERGFELT et al., 2001; GASTAL et al., 1997; GASTAL et al., 1999; GINTHER et al., 2005; HINRICHES et al., 1991).

A aspiração folicular na espécie eqüina tem possibilitado o estudo das diferentes fases do desenvolvimento folicular (recrutamento, seleção, desvio e dominância) (GINTHER et al., 2004a) e os efeitos da aspiração de um ou mais

folículos sobre as concentrações hormonais foram demonstrados por diversos autores (HINRICHS et al., 1991; GASTAL et al., 1997, 1999, 2000).

A aspiração do fluido folicular de folículos pré-ovulatórios foram associados à luteinização significativa, como determinado pelo momento que ocorreu o primeiro aumento nas concentrações da progesterona. A produção de progesterona foi marcadamente consistente entre os dias 4 e 5 nas éguas que tiveram o folículo pré-ovulatório aspirado, enquanto que nas éguas nas quais a aspiração ocorreu em folículos entre 30-34mm esta produção consistente ocorreu entre os dias 5 e 8 (HINRICHS et al., 1991, MONTECHIESI, 2009, MOZZAQUATRO et al., 2010).

Resultados semelhantes foram citados por Hayna et al. (2006) que detectaram a formação de CL tanto nos grupos em que folículos de 26-30mm e de 31-34mm foram aspirados e as concentrações de progesterona foram  $>1\text{ng/ml}$  no dia 5 na maioria das éguas. No entanto, quando folículos  $<25\text{mm}$  foram aspirados os mesmos resultados não foram encontrados.

Os trabalhos indicam que é possível induzir a formação lútea em éguas com folículos  $\geq 25\text{mm}$  aspirados. Outro estudo realizado em nosso departamento (MONTECHIESI, 2009) encontrou que 83% (20/24) dos animais submetidos a aspiração quando apresentavam folículos  $\geq 25\text{mm}$  e receberam uma dose de prostaglandina cinco dias após a ovulação prévia, com o intuito de induzir a lise do CL presente naquele momento, foram capazes de produzir progesterona em concentrações similares ao diestro ( $\geq 2\text{ng/mL}$ ). A aplicação prévia de prostaglandina parece ser muito importante, uma vez que trabalho recentes (MOZZAQUATRO et al., 2010, 2012) mostraram que éguas aspiradas e que apresentavam durante o diestro não formam uma estrutura lútea, semelhante ao CL.

Nos dois trabalhos (HAYNA et al., 2006, HINRICHS et al., 1991) foi detectado aumento do LH após a aspiração folicular de folículos  $\geq 25\text{mm}$ , no entanto, os autores não encontraram causas aparentes para a ocorrência deste fato. Mas suspeita-se que esteja envolvida com a remoção de fatores presentes no fluido folicular.

Ginther et al. (2007) também cita outro achado que talvez esteja envolvido com o fenômeno de luteinização após a remoção do fluido folicular, os autores demonstram que a maior produção de estrógeno (E2) por folículos

dominantes apresenta uma ação inibitória sobre o LH, o que pode ser mais uma hipótese para elevação das concentrações do LH uma vez que o folículo é a principal fonte de E2.

## 2.6. Hemodinâmica uterina

O desenvolvimento de métodos eficazes para avaliação da qualidade do útero é de grande importância para profissionais que trabalham com reprodução eqüina, uma vez que o ambiente uterino é responsável pela manutenção da gestação. Hoje em dia, os métodos de avaliação uterina mais utilizados na rotina dos médicos veterinários são a ultrassonografia modo B, citologia, coleta de material para cultura e biópsia.

A ultrassonografia Doppler é um método não invasivo que traz informações sobre a perfusão sanguínea tecidual em tempo real. Por estes motivos, nota-se um interesse crescente em desenvolver técnicas de avaliação aplicáveis a campo para seleção e detecção de alterações uterinas importantes sobre a fertilidade das éguas.

A avaliação da hemodinâmica do útero pode ser feita por meio da análise espectral coletada de vasos grandes, como a artéria uterina e suas ramificações (BOLLWEIN et al., 1998), ou a partir de avaliações subjetivas e objetivas coletadas do endométrio, miométrio e mesométrio, que oferecem dados referentes a alterações locais e específicas da área a ser avaliada (SILVA et al., 2005).

Em 1998, Bollwein e colaboradores desenvolveram um trabalho com o objetivo de desenvolver uma técnica para medir a perfusão sanguínea a partir de dados de spectral (índice de resistência) obtidos da artéria uterina em éguas. Os autores também avaliaram mudanças na perfusão vascular uterina entre as éguas, ao longo do ciclo estral e entre ciclos subseqüentes.

Sem levar em consideração dados coletados no corno ipsilataeral à ovulação, Bollwein et al. (1998) não encontraram diferenças de perfusão sanguínea entre os cornos direito e esquerdo. Achados posteriores confirmaram que não há diferença de fluxo sanguíneo nas artérias uterinas de grande calibre (BOLLWEIN et al., 2002) e artérias mesometriais (SILVA et al., 2005) dos cornos ipsi e contralateral a ovulação. No entanto, ocorrem sim

diferenças na perfusão sanguínea ao longo do ciclo estral (BOLLWEIN et al., 1998; SILVA et al., 2005). Éguas não inseminadas apresentaram aumento da perfusão vascular (redução do índice de resistência - RI) no D5 (D0 = ovulação) que foi relacionada ao dia de descida do embrião para o útero e à importância de um aumento na perfusão nesta fase (IGNÁCIO et al., 2012).

Entre 2 a 3 dias antes da ovulação foi observado aumento na perfusão sanguínea (redução no RI) seguido de redução (aumento no RI) até a ovulação, provavelmente devido ao aumento e queda de estrógeno (efeito vasodilatatório nos vasos uterinos) que ocorre durante esses dias. Redução na vascularidade uterina também foi detectada no D15 (final de diestro), no entanto, este achado não pode ser atribuído a ação estrogênica devido à fase do ciclo estral e provavelmente outros componentes vasoativos podem estar agindo (BOLLWEIN et al., 1998). Assim, estes achados sugerem que alterações na perfusão vascular uterina estão correlacionadas com as concentrações plasmáticas de estrógeno durante o estro, mas não durante o diestro (BOLLWEIN et al., 2002).

Em 2005, Silva et al. descreveram a avaliação subjetiva de endométrio e miométrio e objetiva a partir de dados de espectral dos vasos da ligação com o mesométrio para avaliar alterações na perfusão vascular uterina, diferente da até então utilizada (BOLLWEIN et al., 1998; BOLLWEIN et al., 2003). Para a realização deste experimento todas as éguas foram inseminadas e a perfusão uterina de éguas prenhes e não prenhes foram comparadas. Não houve diferença detectada entre a perfusão vascular de éguas prenhes e não prenhes até o D11, mas a partir deste dia éguas prenhes mostraram maior perfusão vascular e aumento gradual desta (SILVA et al., 2005).

Um grande número de éguas prenhes e não prenhes com sinais inadequados de espectral foi encontrado entre D4 e D6, o que foi atribuído a um provável baixo RI. No entanto, a partir dos dados do trabalho em questão, este fato não pode ser relacionado à descida do embrião para o útero ou ser definido como uma alteração fisiológica do início do diestro em todas as éguas. Como todas as éguas foram inseminadas, não se sabe se mesmo as éguas não prenhes apresentaram perda embrionária até o D12 (SILVA et al., 2005).

É importante salientar que alterações hemodinâmicas que indicam um aumento na perfusão vascular uterina no início do diestro (D4 a D6) já foram descritas em alguns trabalhos (BOLLWEIN et al., 2002; FERREIRA et al., 2010, IGNÁCIO et al., 2012). Em éguas não prenhes e não inseminadas foi detectada redução do RI por avaliação spectral de vasos calibrosos como artéria uterina e algumas de suas ramificações (BOLLWEIN et al., 2002). Utilizando a mesma técnica de avaliação de Silva et al. (2005), estudos recentes mostram uma gradual redução de RI e índice de pulsatilidade (PI) a partir do D3 em éguas prenhes (FERREIRA et al., 2010) e redução relativa ao D0 do PI e RI no D5 em éguas não inseminadas (IGNÁCIO et al., 2012). Todos estes resultados mostram que há um aumento na perfusão vascular no início do diestro, no entanto, maiores investigações ainda são necessárias para afirmar se este aumento é provocado pela entrada do embrião no útero ou se o aumento ocorre como uma possível preparação uterina para entrada do embrião, como demonstrado por Ignácio et al. (2012).

Alterações hemodinâmicas importantes em éguas com idade avançada, como aumento na resistência vascular (BOLLWEIN et al., 1998; FERREIRA et al., 2008), já foram detectadas. Estas alterações provavelmente resultantes de fibrose (BOLLWEIN et al., 1998) também foram encontradas em mulheres e relacionados com infertilidade (CACCIATORE et al., 1996). A fibrose periglandular do endométrio diagnosticada por biópsia uterina é considerada uma das maiores causas de perdas embrionárias e fetais (KENNEY, 1978). Recentemente, uma comparação entre éguas com e sem cistos uterinos (achados ultrassonográficos frequentes de éguas com endometriose crônica degenerativa) encontrou redução na perfusão vascular uterina em éguas com cistos e uma associação positiva entre área cística e distúrbios da hemodinâmica uterina (FERREIRA et al., 2008).

Pouco se sabe também sobre a resposta na hemodinâmica do útero perante a infusão de substâncias que podem levar a respostas inflamatórias, como inclusive o sêmen. Para avaliar a resposta inflamatória e hemodinâmica do útero, Bollwein et al. (2003) infundiram em dois grupos de éguas sêmen “in natura” ou plasma seminal, respectivamente. A avaliação por citologia demonstrou que a infusão intrauterina de plasma seminal provocou apenas uma endometrite leve, enquanto que o sêmen “in natura” a uma endometrite

severa e ambos promoveram um marcante aumento na perfusão uterina. Durante a inflamação endometrial há liberação de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador (STILL & GREISS, 1978). No entanto, o resultado sugere que não somente a inflamação uterina, mas outros fatores com propriedades vasoativas, como prostaglandinas e estrógenos presentes no plasma (CLAUS et al., 1992), são responsáveis pelo aumento da perfusão. Mais trabalhos são necessários para determinar alterações na perfusão uterina e ovariana após inseminação e a relação destas com a fertilidade.

### 3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- a. Avaliar a formação lútea das estruturas formadas a partir da aspiração de folículos  $\geq 25\text{mm}$ ;
- b. Avaliar a viabilidade da utilização destas éguas aspiradas como receptoras de embriões (teste de fertilidade);
- c. Avaliar o efeito da aplicação prévia de hCG sobre a produção de progesterona plasmática intrafolicular e sobre a formação da estrutura lútea;
- d. Avaliação uterina.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Geral

As éguas foram mantidas no posto de monta da fazenda Lageado da Unesp de Botucatu-SP durante duas estações de monta, entre os meses de julho de 2010 e abril de 2011 e entre julho de 2011 e abril de 2012, foram alimentadas com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*), concentrado, sal mineral e água à vontade.

O experimento foi dividido em fases 1 e 2. Na fase 1 foram avaliadas a capacidade esteroideogênica do folículo aspirado, a formação lútea e o acompanhamento uterino por meio da ultrassonografia modo B e Power Doppler e a progesterona plasmática pós-ovulação/aspiração. Na fase 2 foi

avaliada a viabilidade das éguas aspiradas como receptoras de embriões (teste de fertilidade).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (indução da ovulação com 2500 UI de hCG), grupo aspiração (aspiração do folículo dominante com diâmetro  $\geq 25$ mm) e hCG + aspiração (aplicação de 2500 UI de hCG 24h antes da aspiração de folículo dominante com diâmetro  $\geq 25$ mm).

Para melhor avaliar o efeito da categoria dos folículos aspirados e naquelas situações em que o número de amostras não comprometia as análises, os grupos foram divididos em subgrupos de acordo com o diâmetro do folículo aspirado. Para tanto, além dos grupos controle, aspiração e hCG + aspiração, subgrupos aspiração  $\geq 25$  (folículos de diâmetro entre 25 e 29mm), aspiração  $\geq 30$ , hCG + aspiração  $\geq 25$  (folículos de diâmetro entre 25 e 29mm), hCG + aspiração  $\geq 30$  também foram comparados.

Para a realização de todo o experimento, 54 ciclos de 26 éguas com idade de 4 a 15 anos, em bom estado corporal e boas qualidades uterinas (histológicas e citológicas) foram utilizados. Foram avaliadas as concentrações de progesterona intrafolicular, a avaliação ultrassonográfica (modo B, Power Doppler e Doppler pulsátil) da estrutura lútea e do útero, a concentração plasmática de progesterona e o teste de fertilidade; o número de amostras utilizado para cada avaliação de dados está especificado no quadro 1.

Quadro 1 – Número de ciclos estrais (n) utilizados de 26 éguas para as diferentes avaliações levando em consideração a distribuição em grupos e subgrupos.

<b>Distribuição</b>	<b>Avaliação</b>	<b>N</b>
	<i>Dosagem de progesterona intrafolicular</i>	<b>43</b>
Grupo	Aspiração	22
	hCG+aspiração	21
Subgrupo	Aspiração ≥25	09
	Aspiração ≥30	13
	hCG+aspiração ≥25	11
	hCG+aspiração ≥30	10
	<i>Avaliação da estrutura lútea</i>	<b>19</b>
Grupo	Controle	06
	Aspiração	06
	hCG+aspiração	07
	<i>Avaliação uterina</i>	<b>29</b>
Grupo	Controle	11
	Aspiração	09
	hCG+aspiração	09
	<i>Dosagem de progesterona plasmática</i>	<b>51</b>
Grupo	Controle	13
	Aspiração	21
	hCG+aspiração	17
Subgrupo	Controle	13
	Aspiração ≥25	08
	Aspiração ≥30	13
	hCG+aspiração ≥25	09
	hCG+aspiração ≥30	08
	<i>Teste de fertilidade</i>	<b>40</b>
Grupo	Controle	19
	Aspiração	07
	hCG+aspiração	14

Cada égua foi acompanhada ultrassonograficamente para detecção da ovulação. No quinto dia pós-ovulação uma dose de 7,5mg de PGF<sub>2α</sub> (dinoprost trometamina; lutalyse®) foi administrada para indução da lise do CL. A partir deste momento, o crescimento folicular foi acompanhado para detecção do maior folículo conhecidamente em crescimento. As aspirações foram realizadas a partir do sétimo dia pós-ovulação e na presença de folículo com ≥25mm. No

caso de dois (ou mais) maiores folículos em crescimento apresentarem menos de 5mm de diferença estes foram aspirados para evitar que ovulassem antes do aumento da progesterona produzida pela estrutura formada a partir da aspiração.

As inovulações de embriões de boa qualidade (grau 1 ou 2) coletados no D8 foram realizadas entre os D4 e D7 nas éguas do grupo controle e no D7 (D0 = dia da aspiração ou dia da ovulação) nas éguas dos grupos aspirado e hCG + aspirado; o protocolo de sincronização entre doadoras e receptoras aspiradas ou não está esquematizado na Figura 1. Os embriões foram inovulados independente das éguas terem respondido a aspiração folicular e de suas características no momento da TE. O diagnóstico positivo de prenhez foi determinado pela detecção de vesícula embrionária de até 15 dias.

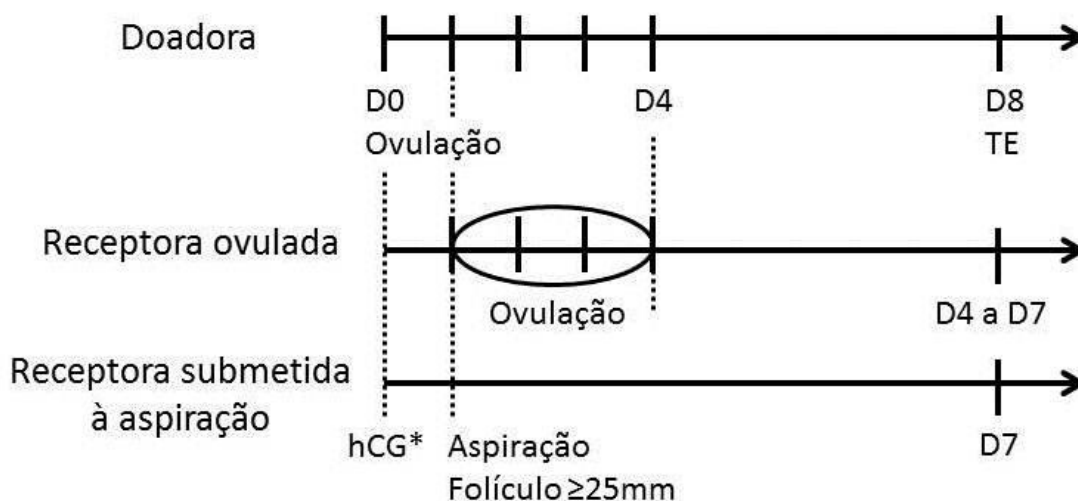


Figura 1 – Esquema de sincronização entre éguas doadoras de embriões e receptoras, ovuladas (grupo controle) ou submetidas à aspiração (grupo aspiração e grupo hCG+aspiração). Uma dose de 2500UI de hCG foi aplicada 24h antes da aspiração de folículos  $\geq 25\text{mm}$  no grupo hCG+aspiração (hCG\*).

Ainda, as coletas de dados sequenciais foram realizadas diariamente do D0 (D0 = ovulação ou aspiração folicular) ao D15 e, para facilitar a análise e compreensão dos achados, os dados foram divididos em dois momentos: o primeiro momento compreendeu do D0 ao D7 e o segundo momento do D8 ao D15. Para a avaliação uterina, no segundo momento foram analisados apenas os dados das éguas resposta positiva (concentração plasmática  $\geq 2 \text{ ng/mL}$ ).

#### 4.1.1. Aspiração Folicular

Para realização do procedimento da aspiração folicular, as éguas foram sedadas com produto de Detomidina na dose de 0,002 mg/kg e Acepromazina na dose de 0,03 mg/kg, i.v.. Hyoscina N-butyl bromide (Butylscopolamina) na dose de 0,2 mg/kg, i.v. foi utilizada para que houvesse relaxamento retal ideal para realização do procedimento. Uma aplicação de Butorfanol na dose de 0,01mg/kg foi realizada com o objetivo de reduzir sensibilidade em víceras.

O maior folículo de diâmetro  $\geq 25$ mm foi aspirado utilizando-se um transdutor convexo de 5 MHz conectado ao aparelho de ultrassom (Mindray DP3300). O transdutor é colocado no guia trans-vaginal contendo agulha de 18G, a qual foi conectada a um sistema de vácuo. A aspiração folicular foi realizada a partir do momento da observação da ponta da agulha no antro folicular e por meio da pressão negativa exercida pela bomba a vácuo (300 mmHg). As éguas receberam uma dose de 1 mg/kg, i.v. de flunixin meglumine (Banamine<sup>®</sup>) imediatamente antes do procedimento de aspiração.

No mínimo três perfurações em cada folículo foram realizadas visando evitar o reenchimento.

#### 4.1.2. Obtenção dos embriões

Para obtenção dos embriões, cinco éguas com idade de quatro a 15 anos, em bom estado corporal e boas qualidades uterinas (histológicas e citológicas) mantidas no mesmo local e condições citados anteriormente foram utilizadas como doadoras. Com o objetivo de minimizar os riscos de coletas de embrião negativas que impediriam a inovulação nas receptoras previamente preparadas, estas cinco éguas foram tratadas hormonalmente com extrato de pituitária eqüina (EPE). O EPE é um hormônio que comprovadamente aumenta as taxas de recuperação embrionária (SCOGGIN et al., 2002) quando comparado a éguas não tratadas.

A luteólise foi induzida por uma única dose de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Lutalyse<sup>®</sup>, 7,5 mg, i.m.) no momento do início do tratamento.

O tratamento com 12,5mg de EPE i.m. a cada 12h teve início entre os D6 e D9 quando no mínimo dois folículos em crescimento apresentavam diâmetro entre 20mm e 23mm e foi interrompido quando a maioria dos folículos atingiram  $\geq 32$ mm. A indução da ovulação foi realizada com a administração de 1600UI de hCG i.v. quando estes atingiram  $\geq 35$ mm.

Após a indução das ovulações, as éguas foram inseminadas utilizando sêmen fresco diluído com extensor a base de leite desnatado e avaliado por microscopia óptica. O sêmen utilizado foi obtido de garanhões de fertilidade conhecida e a dose inseminante foi de  $1 \times 10^9$  espermatozóides móveis. Uma inseminação foi realizada 24 horas após a indução da ovulação.

As éguas foram submetidas à colheita de embriões de sete e oito dias após a detecção da primeira ovulação (D0), recebendo em seguida 7,5 mg de Dinoprost-trometamina ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) por via intramuscular.

## 4.2. Fase 1

### 4.2.1. Dosagem de progesterona intrafolicular

Para avaliação da concentração intrafolicular de progesterona, o fluido folicular de 43 folículos aspirados a partir de 43 ciclos analisados foi coletado em frascos individualizados, armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior dosagem.

A concentração de progesterona foi determinada por 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 8,4% e a sensibilidade de 0,05ng/mL.

#### 4.2.2. Avaliação ultrassonográfica por modo B, Power Doppler e Doppler pulsátil

Em 29 ciclos (controle = 11 ciclos; aspirado = 9 ciclos; hCG + aspirado = 9 ciclos), ultrassonografia por modo B e Power Doppler foram realizadas a cada 24h entre os D0 e D15 para avaliação da estrutura formada a partir da aspiração ou da ovulação espontânea (CL) e avaliação da perfusão vascular uterina.

As éguas foram examinadas por meio de ultrassonografia modo-B e modo Power Doppler (SONOACE PICO, Medison do Brasil Ltda) usando transdutor multi-frequencial (5 a 9 Mhz) linear endocavitário de banda larga (LV5-9CDn, 60mm). As configurações do equipamento foi mantido constante durante todo período de realização do projeto.

As estruturas lúteas foram escaneadas como um todo de forma continua e lentamente. A perfusão sanguínea foi estimada subjetivamente e em tempo real em porcentagem (0 a 100%) de tecido luteal com sinais coloridos durante o exame ultrassonográfico Power Doppler. A avaliação objetiva da perfusão vascular luteal foi realizada no laboratório por meio da contagem de pixels coloridos da imagem capturada 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, uma imagem de cada exame foi escolhida seguindo um critério de seleção (maior área de CL com maior número de sinais coloridos captados excluindo a região da base do CL), extraída e salva (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 da imagem selecionada, foram estimadas a área total da estrutura lútea (Figura 2A), a área luteinizada da estrutura lútea (área total subtraída da área do coágulo central; Figura2B) e área irrigada (área com sinais coloridos captados dentro da área da estrutura lútea, Figura2C).

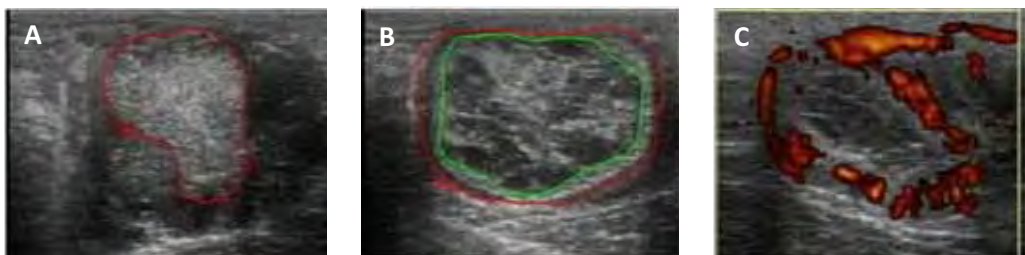


Figura 2 – Imagens capturadas para seleção da área total (limitada pela linha vermelha; A), área luteinizada (área total, limitada pela linha vermelha, subtraída da área do coágulo central, limitada pela linha verde; B) e área irrigada (área com sinais coloridos captados dentro da área da estrutura lútea; C).

A avaliação da perfusão vascular uterina foi realizada usando ultrassonografia modo Power Doppler. O parâmetro foi estimado subjetivamente levando em consideração a intensidade e o número de pontos coloridos captados (graduados de 1 a 4) de tecido uterino (endométrio, miométrio e ligação com o mesométrio) com pontos coloridos durante exame contínuo de 1 minuto na ausência da vesícula embrionária de ambos os cornos uterinos, semelhante ao descrito por Silva et al. (2005).

Para a análise objetiva, dados de espectral (Doppler pulsátil) foram captados a partir do posicionamento do cursor dentro de artérias localizadas na região da ligação com o mesométrio (Silva et al., 2005). O objetivo foi obter no mínimo três ciclos cardíacos gerados para que de um deles fossem obtidos os índices Doppler: Índice de Resistência (RI) e Índice de Pulsatilidade (PI). Para aumentar a acurácia na coleta dos dados, devido ao pequeno calibre dos vasos e grande chance de erros, este procedimento foi repetido de três e a seis vezes para cada um dos cornos esquerdo e direito e a média foi utilizada para obtenção de um valor único para o RI e o PI.

#### 4.2.3. Amostra de sangue e dosagem hormonal plasmática

A punção da veia jugular foi realizada a cada 24h do D0 ao D15 em 51 ciclos (controle n = 13 ciclos; aspirado n = 21 ciclos; hCG + aspirado n = 17 ciclos). As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e centrifugadas para obtenção de plasma que foram armazenados a -20°C até a dosagem de progesterona.

Assim como para a dosagem de progesterona intrafolicular, a concentração de progesterona plasmática foi determinada por 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 8,4% e a sensibilidade de 0,05ng/mL.

As éguas que alcançaram concentração plasmática de progesterona  $\geq 2$ ng/mL entre os dias 0 e 15 de avaliação foram consideradas resposta positiva, por terem respondido ao tratamento, enquanto que as que não alcançaram esta concentração durante este período foram consideradas resposta negativa.

#### 4.3. Fase 2 (teste de fertilidade)

Para analisar a viabilidade destes protocolos de preparação de receptoras, foi realizado o teste de fertilidade em 40 ciclos de 26 éguas (controle = 19 ciclos; aspiração = 7 ciclos; hCG + aspiração = 14 ciclos).

Para a realização do teste de fertilidade, além de ciclos utilizados para coleta de dados por ultrassonografia Doppler outros ciclos foram obtidos para que o número de éguas por grupo fosse alcançado.

Destes ciclos adicionais, o crescimento folicular foi acompanhado por ultrassonografia modo B para determinação do momento da aspiração ou aplicação do hCG, detecção da ovulação ou realização da aspiração, inovulação e diagnóstico de gestação até o D15.

#### 4.4. Análise estatística

Para realização das análises, os dados de Progesterona (P4) intrafolicular e plasmática foram convertidos para log com o objetivo de atingir a normalidade. As variáveis de áreas de CL ( $\text{mm}^2$ ) foram convertidas para raiz quadrada e as variáveis expressas em proporção (área sinais coloridos pela área total e áreas de sinais coloridos pela área luteinizada) foram convertidas para arco-seno para atingirem a normalidade.

Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED; SAS Institute, 2009) foram usados para comparar as médias de P4 plasmáticas, perfusão vascular uterina, RI e PI uterinos, área total de CL, área luteinizada de CL, área com sinais coloridos, e proporções de áreas com sinais coloridos 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.

O teste de Fisher (PROC FREQ; SAS Institute, 2009) foi utilizado para comparar a proporção de animais resposta positiva ou gestação positiva entre os grupos e subgrupos.

Teste de Wilcoxon (PROC FREQ; SAS Institute, 2009) foi utilizado para comparar a mediana da P4 máx, P4 intrafolicular, P4D7 entre os grupos ou subgrupos e entre o status de prenhez e resposta.

Antes do início das análises das variáveis obtidas a partir das médias entre dados de cornos esquerdo e direito do útero, o teste T pareado foi utilizado para comparar a perfusão vascular entre os cornos.

Modelos de regressão linear simples (PROC GLM; SAS Institute, 2009) foram usados para avaliar as associações entre diâmetro folicular aspirado e concentração intrafolicular de P4, P4 intrafolicular e p4 plasmática máxima, área total do CL / estrutura formada a partir da aspiração e P4 plasmática, área de sinais coloridos e P4 plasmática e porcentagem da área com sinais coloridos pela área total e P4 plasmática.

Todas as análises foram realizadas em nível de significância = 0,05. Tendência estatística foi definida quando  $0,05 \leq P < 0,10$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Dosagem de P4 intrafolicular

A concentração de P4 (ng/mL) intrafolicular referente ao grupo aspiração foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) quando comparada ao grupo hCG + aspiração (Figura 3). Bem como, diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) também foram detectadas quando os subgrupos aspiração  $\geq 25$ , aspiração  $\geq 30$ , hCG + aspiração  $\geq 25$  e hCG + aspiração  $\geq 30$  foram analisados separadamente (Figura 4).

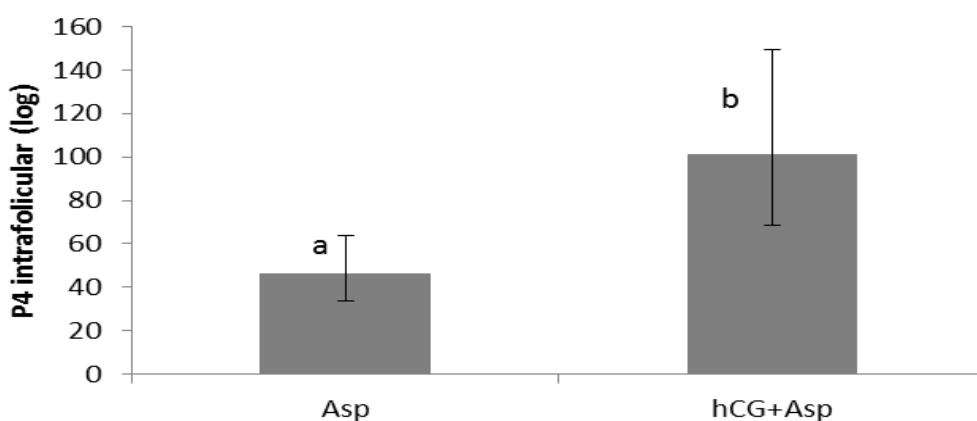


Figura 3 - Médias geométricas  $\pm$  SEM da P4 (ng/mL) intrafolicular quando a aplicação do hCG foi comparada: Asp (grupo aspiração;  $n = 22$ ) e hCG+Asp (hCG + aspiração;  $n = 21$ ). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre subgrupos ( $P < 0,05$ ).

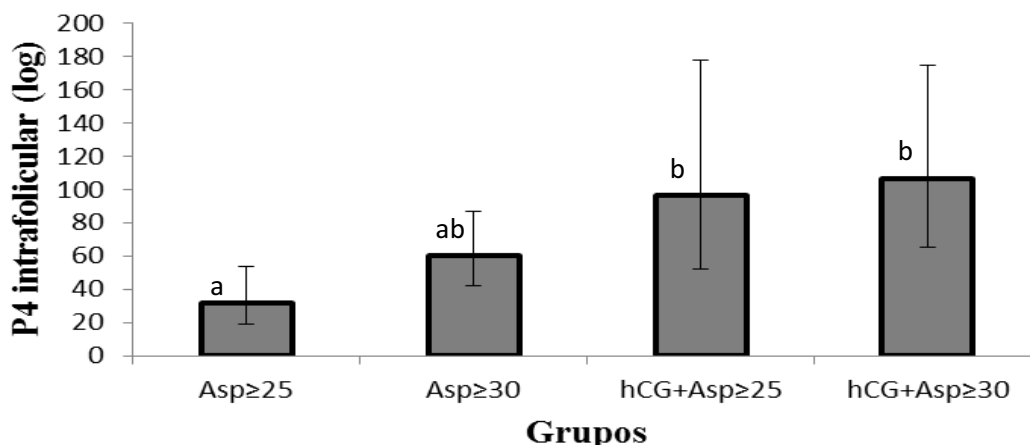


Figura 4 – Médias geométricas  $\pm$  SEM da concentração de P4 (ng/mL) intrafolicular dos folículos aspirados para cada subgrupo: Aspiração  $\geq 25$ mm (n=9), Aspiração  $\geq 30$ mm (n=13), hCG + Aspiração  $\geq 25$ mm (n=11) e hCG + Aspiração  $\geq 30$ mm (n=10). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre subgrupos ( $P < 0,05$ ).

Quando analisados independente de grupo, o diâmetro do folículo no momento da aspiração não correlacionou com a concentração de P4 intrafolicular ( $P=0,10$  e  $R^2=0,11$ ). Para o grupo em que o hCG não foi administrado 24 horas antes da aspiração (grupo aspiração) houve uma tendência a relação entre diâmetro folicular e concentração intrafolicular de P4 ( $P=0,09$ ) e uma fraca correlação biológica ( $R^2=0,43$ ) que parece ser maior até os folículos atingirem próximo a 33mm de diâmetro (Figura 5). Para o grupo em que o hCG foi aplicado previamente a aspiração (grupo hCG + aspiração), não foi detectada nenhuma relação ( $P=0,28$  e  $R^2=0,76$ ).

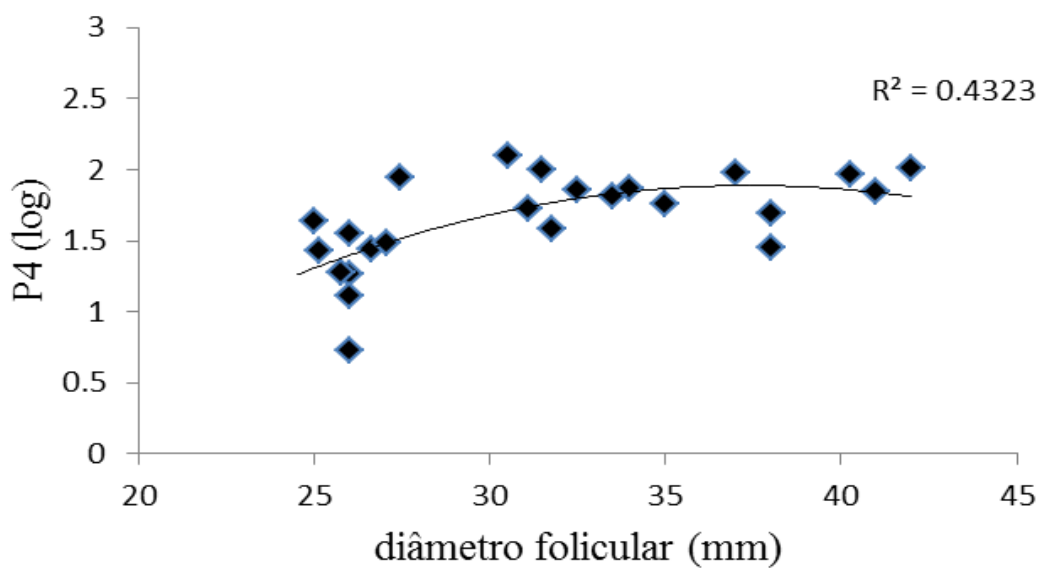


Figura 5 – Correlação entre diâmetro folicular (mm) no momento da aspiração e a concentração intrafolicular de P4 (log) para o grupo que não recebeu hCG previamente a aspiração (grupo aspiração).

Também foi detectada uma correlação positiva, porém muito fraca (0,13), entre P4 intrafolicular e a P4 plasmática máxima atingida após a aspiração, independente do grupo.

## 5.2. Avaliação ultrassonográfica por modo B, Power Doppler e Doppler pulsátil

Para facilitar a análise e compreensão dos achados, os dados foram divididos em dois momentos: o primeiro momento compreendeu do D0 ao D7; e o segundo momento compreendeu do D8 ao D15.

### 5.2.1. Avaliação do corpo lúteo e da estrutura aspirada

Apenas foi possível avaliar a área do CL e/ou estrutura formada a partir da aspiração e sua irrigação nas éguas que responderam à aspiração alcançando concentração plasmática  $\geq 2\text{ng/mL}$  durante o período de avaliação (D0 ao D15). Isto ocorreu uma vez que todas as éguas que não responderam à aspiração não formaram uma estrutura semelhante a um CL e nem sinais coloridos foram detectados.

A área total ( $\text{mm}^2$ ) ou a área luteinizada (área total – coágulo central;  $\text{mm}^3$ ) da estrutura formada pelo CL ou a partir da aspiração folicular não diferiu entre os grupos, mas sim ao longo dos dias dentro de cada grupo (Figura 7). A análise por meio da ultrassonografia modo Doppler permitiu a detecção de diferenças da vascularidade entre os grupos, porém, estas diferenças não dependeram do momento analisado. O grupo controle tendeu a ser maior do que o grupo aspiração ( $P=0,07$ ) e foi maior que o grupo hCG + aspiração ( $P<0,05$ ), mas diferenças entre os grupos aspirados não foram detectadas (Figura 6). Quando a área vascularizada foi avaliada levando em consideração a área total ou luteinizada das estruturas, a porcentagem da área vascularizada sobre a área total variou entre os grupos e entre os dias, enquanto que a porcentagem de vascularidade sobre a área luteinizada apenas variou ao longo dos dias (Figura 7).

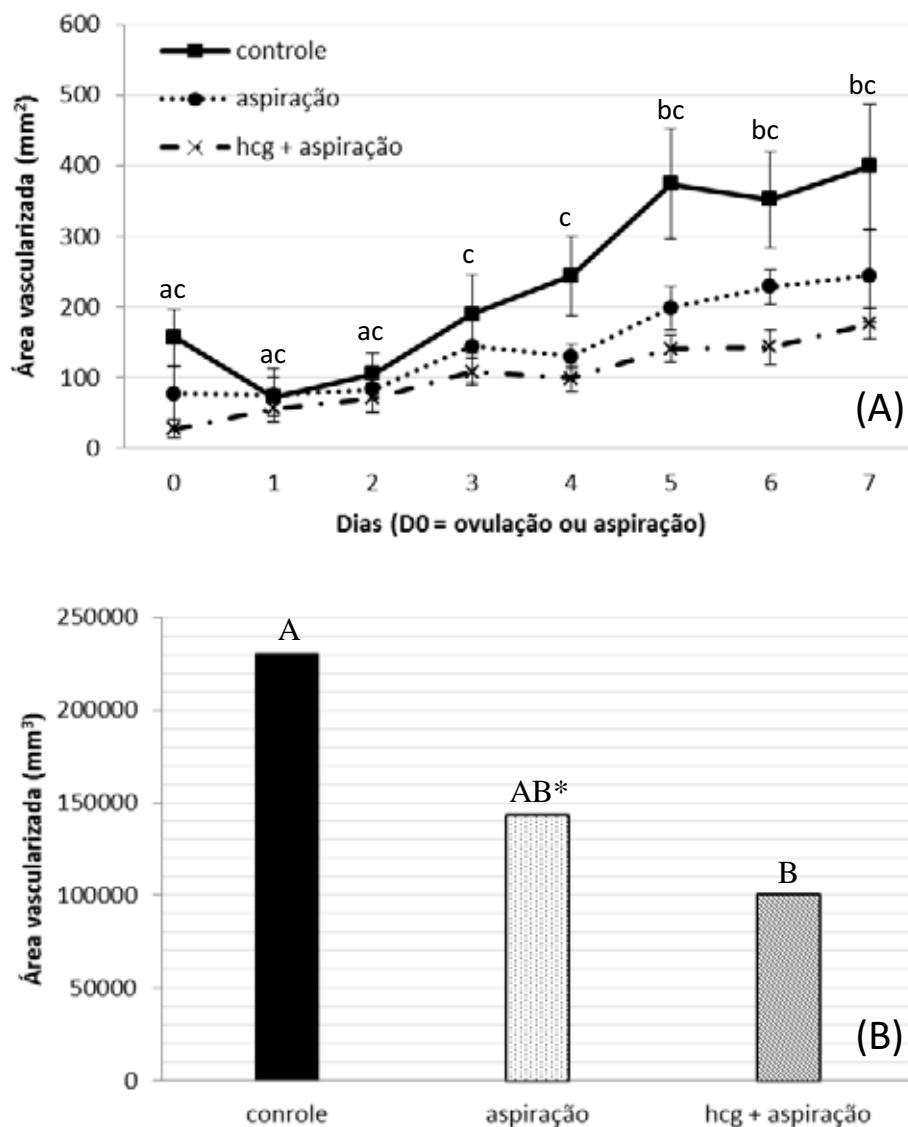


Figura 6 – Médias  $\pm$  SEM da vascularização do CL ou estrutura luteinizada formada a partir da aspiração folicular nos diferentes momentos (D0 ao D7; A) e média geral de cada grupo (B): grupo controle (n=6), grupo aspiração (n=6) e grupo hCG + aspiração (n=7). Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre grupos e letras minúsculas dentro de cada grupo ( $P < 0,05$ ). \* indica tendência estatística; grupo controle tendeu ( $P = 0,07$ ) a ser maior que o grupo aspiração.

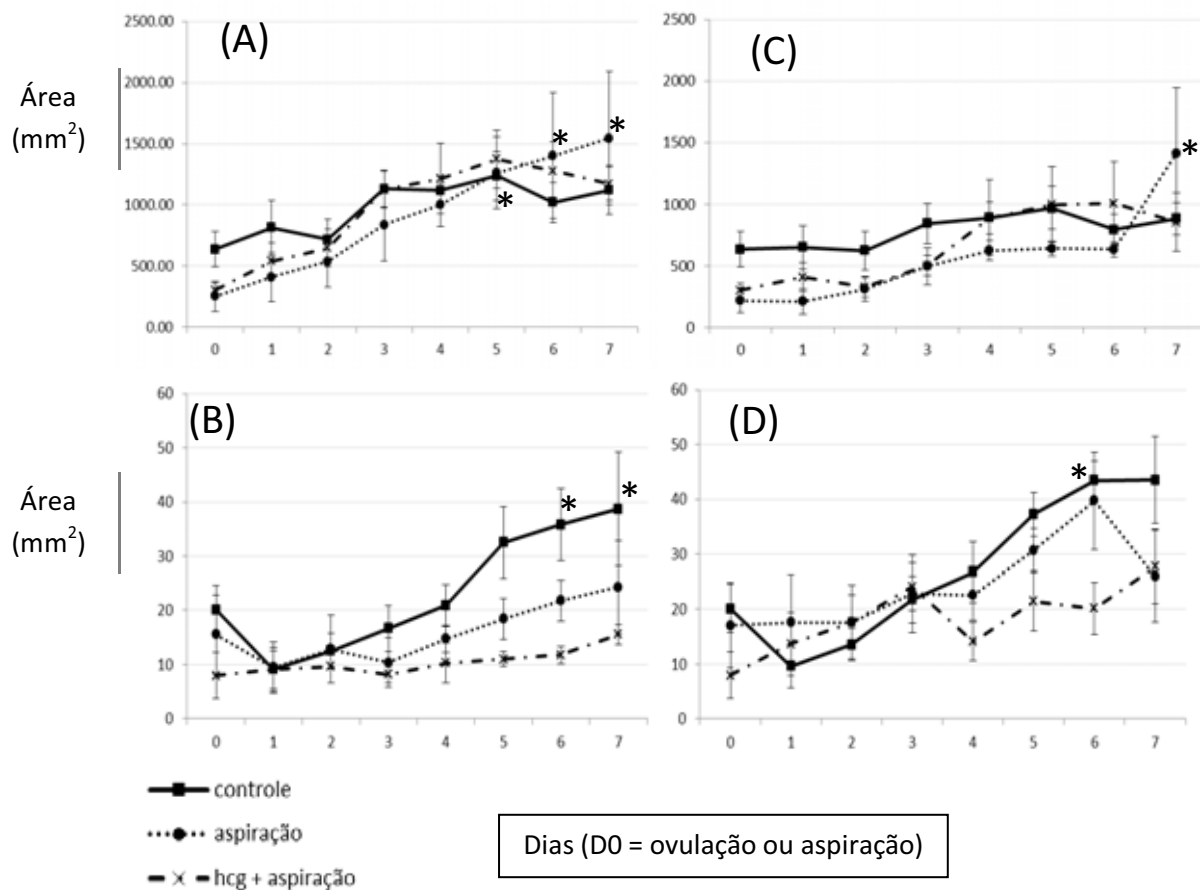


Figura 7 – Médias  $\pm$  SEM da área total da estrutura lútea (CL ou formada a partir da aspiração folicular; A), porcentagem de área vascularizada sobre a área total (B), área luteinizada (área total – coágulo central; C) e porcentagem de área vascularizada sobre a área luteinizada (D) para cada grupo: grupo controle (n=6), grupo aspiração (n=6) e grupo hCG + aspiração (n=7). \* indica diferenças entre os dias dentro do mesmo grupo (P < 0,05).

A avaliação das associações demonstraram que existe uma fraca relação linear entre área total do CL ou estrutura formada a partir da aspiração folicular e a P4 plasmática, uma vez que a P4 continua a aumentar enquanto que a área se mantém mais estável, como demonstrado no gráfico de dispersão (Figura 8A). Já para associação entre área de sinais coloridos (área vascularizada do CL / estrutura), uma relação positiva foi detectada, correlação de Pearson foi de 0,72, de Spearman (coeficiente de relação linear) foi de 0,65 (ambos com P<0.001) e a regressão linear indica que 52% da vascularização influencia na P4 (Figura 8B). Como consequência dos dois resultados, a associação entre porcentagem de área com sinais coloridos pela área total detectou uma correlação moderada ( $R^2=0,36$ ; Figura 8C).

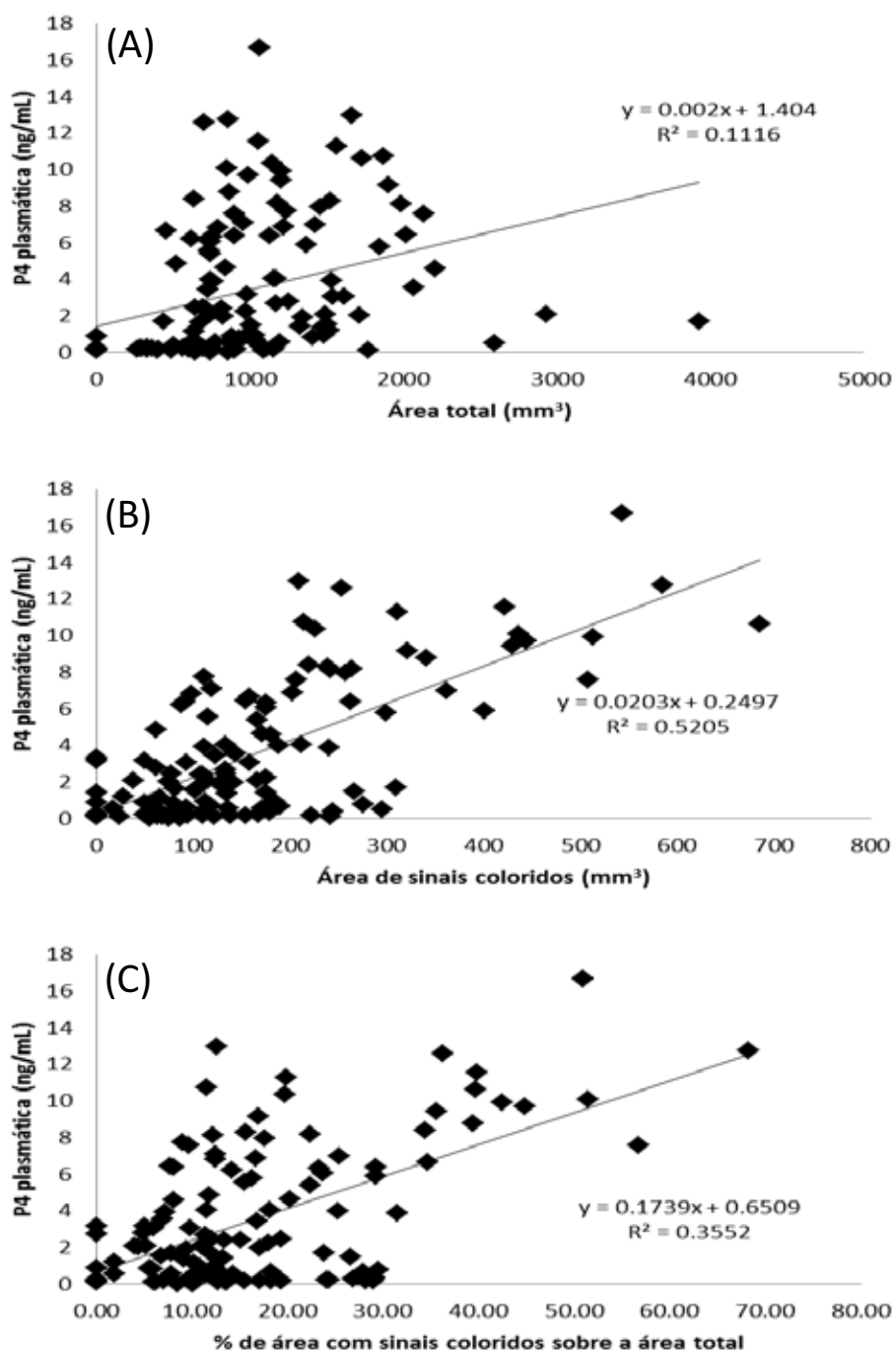


Figura 8 – Associações contendo valores de  $R^2$  e equações entre área total do CL ou estrutura formada a partir da aspiração folicular e P4 plasmática (A), da área de sinais coloridos e P4 plasmática (B) e porcentagem de sinais coloridos sobre a área total (C).

### 5.2.2. Avaliação uterina

Quando comparada entre os diferentes grupos, foram detectadas interações entre grupo e dia para perfusão vascular e PI ( $P < 0,05$ ), e tendência à interação para RI ( $P = 0,06$ ) entre D0 e D7. Porém, quando os dados foram analisados separadamente, a perfusão vascular não variou entre os grupos ao longo dos dias, apenas uma tendência entre o D0 do grupo controle e o D0 do grupo hCG + aspiração ( $P = 0,08$ ) foi observada. Diferenças ao longo dos dias dentro de cada grupo foram apenas detectadas no grupo controle, como representado na Figura 9. No entanto, as mesmas diferenças não foram encontradas para os dados de RI e PI (Figura 10).

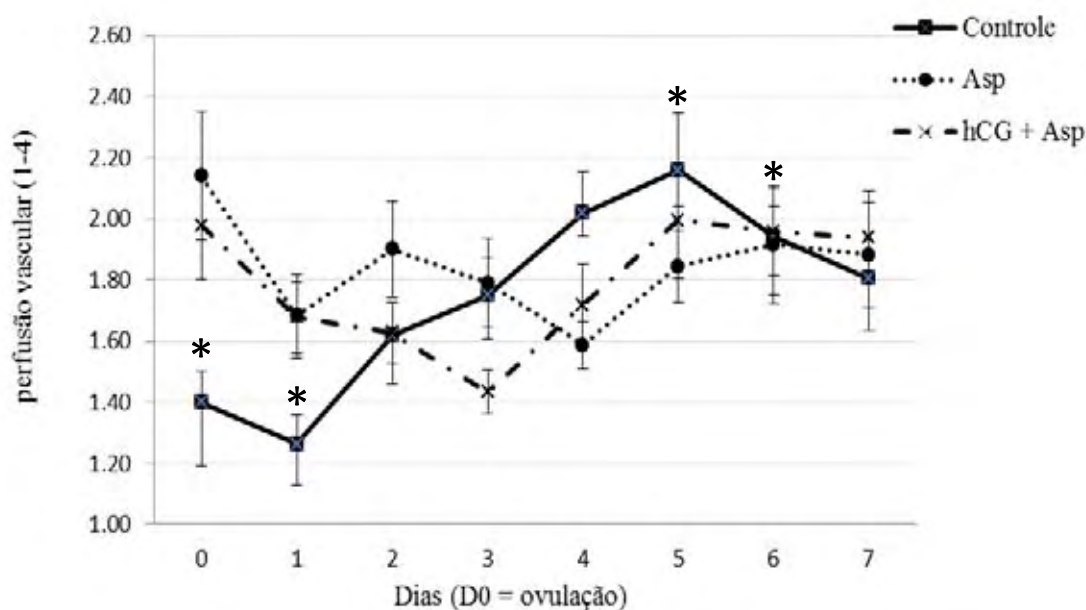


Figura 9 – Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (graduado de 1 a 4) para cada grupo [controle (n=11), aspiração (n=9) e hCG + aspiração (n=9)] do D0 ao D7. \* indicam diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo e ao longo dos dias.

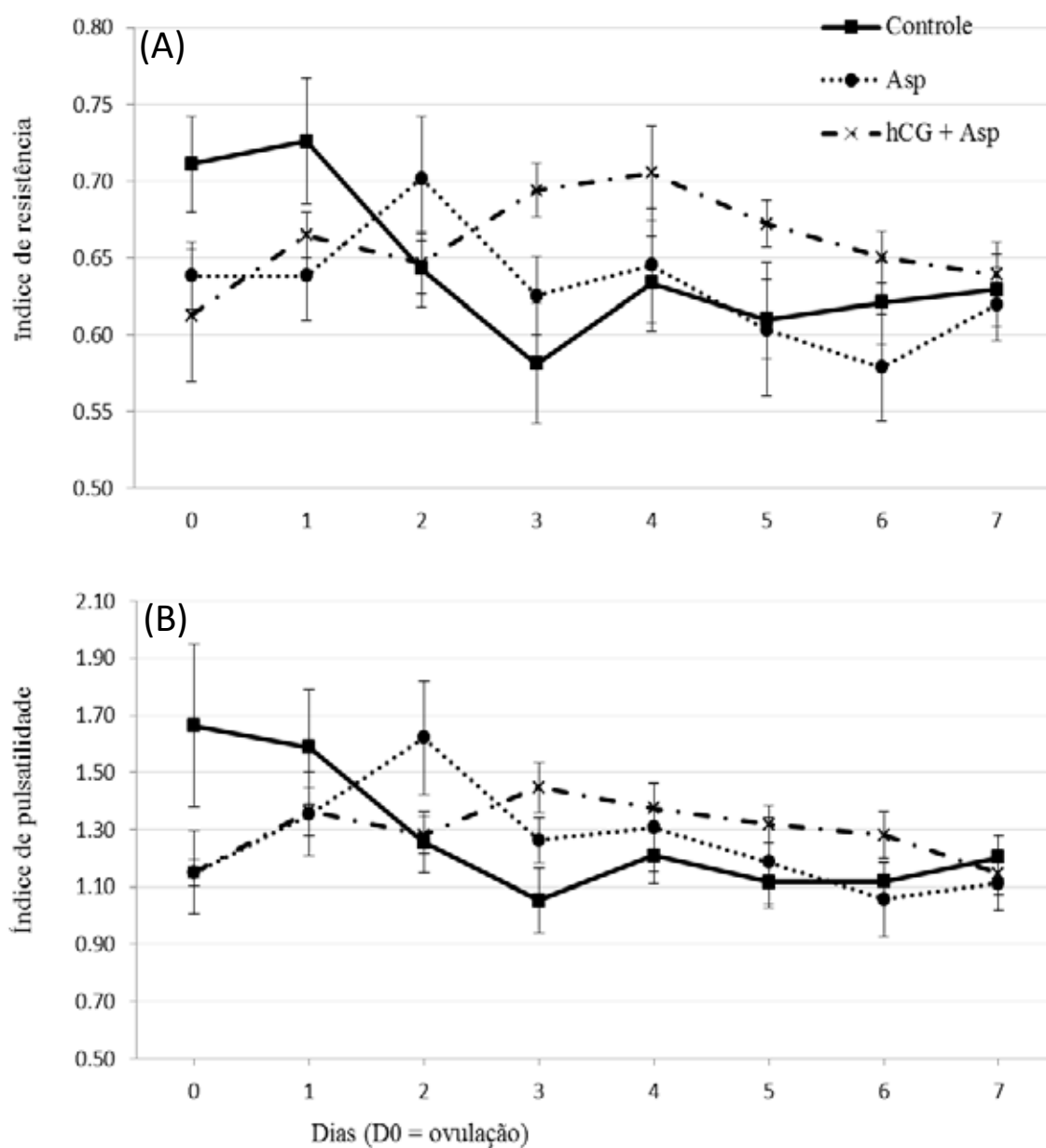


Figura 10 - Médias  $\pm$  SEM de RI (A) e PI (B) coletados dos vasos presentes na ligação com o mesométrio para cada grupo [controle (n=11), aspiração (n=9) e aspiração + hCG (n=9)] do D0 ao D7.

Para uma melhor avaliação das éguas que responderam à aspiração, outra análise foi realizada usando apenas as éguas resposta positiva. Foram detectadas efeito do dia e interação entre grupo e dia para a perfusão vascular ( $P < 0,05$ ), e interação entre grupo e dia para o RI e PI ( $P < 0,05$ ). Porém, quando os dados foram analisados separadamente, nenhuma diferença foi detectada na perfusão vascular, RI e PI entre os grupos do D0 ao D7 (Figura 11).

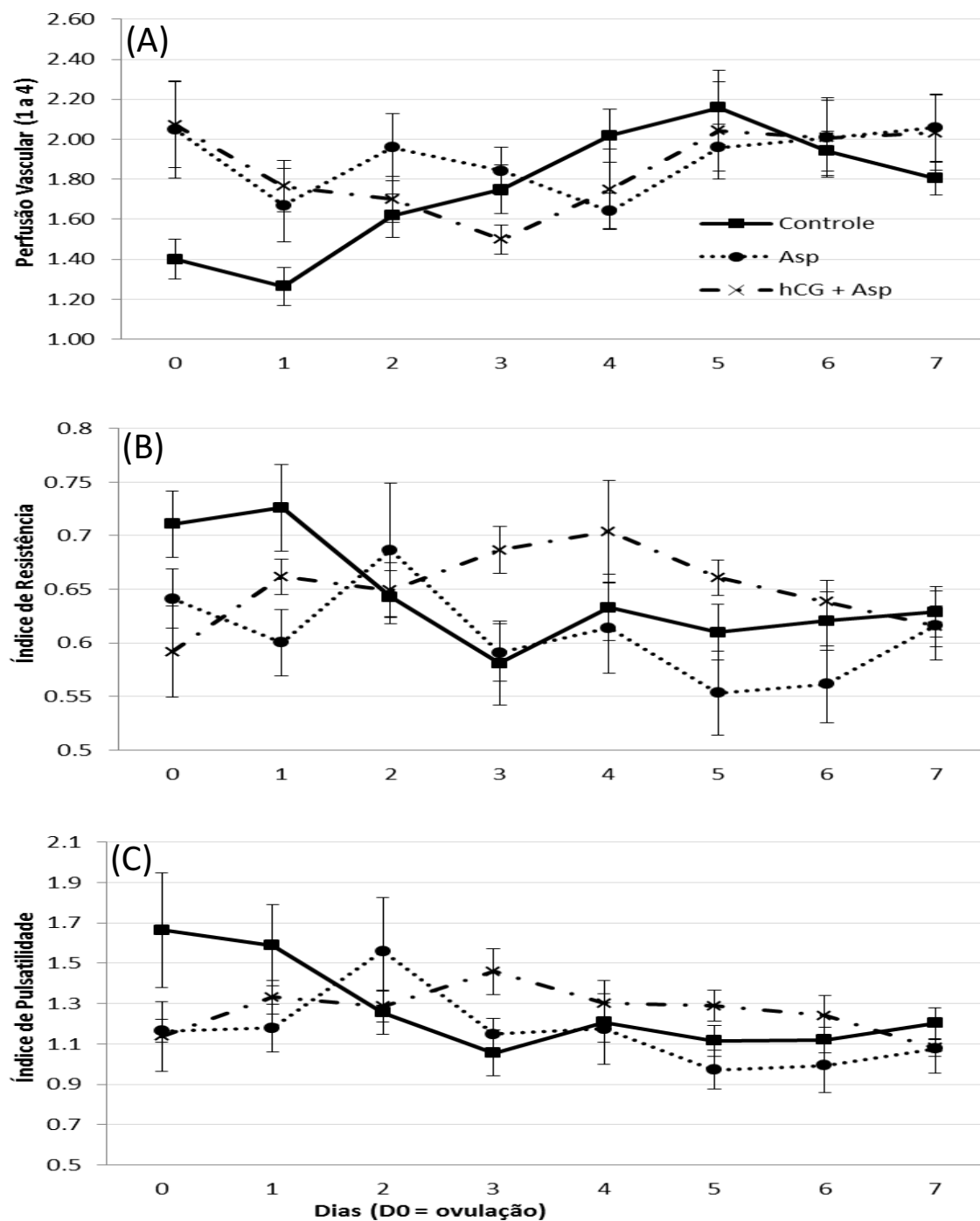


Figura 11 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (A), do RI (B) e do PI (C) para cada grupo [controle (n=11), aspiração (n=6) e aspiração + hCG (n=7)] do D0 ao D7 de éguas resposta positiva ( $P4 \geq 2\text{ng/mL}$ ). Não foram detectadas diferenças entre os grupos.

Quando as éguas que responderam foram comparadas às éguas que não responderam, a perfusão vascular e os índices Doppler foram analisados. Para perfusão vascular, diferenças entre grupos, dias e interação entre grupos e dias não foram detectadas. Porém, quando os momentos foram analisados separadamente, dentro do grupo resposta + (éguas que atingiram concentração plasmática de P4  $\geq 2$ ng/mL) a perfusão vascular foi maior para o D5 do que para o D1 ( $P < 0,05$ ) e tendeu a ser maior que o D3 ( $P = 0,06$ ). Para o índice de resistência foi detectada diferença entre grupos ( $P < 0,05$ ) e para o índice de pulsatilidade foram detectadas diferenças entre grupos ( $P < 0,05$ ), uma tendência a diferença entre dias ( $P = 0,08$ ) e interação entre grupos e dias ( $P < 0,05$ ) (Figura 12). É interessante salientar que não foram detectadas associações entre a P4 plasmática e o RI uterino e entre P4 plasmática e o PI uterino, ambas as relações com  $R^2 = 0,07$ .

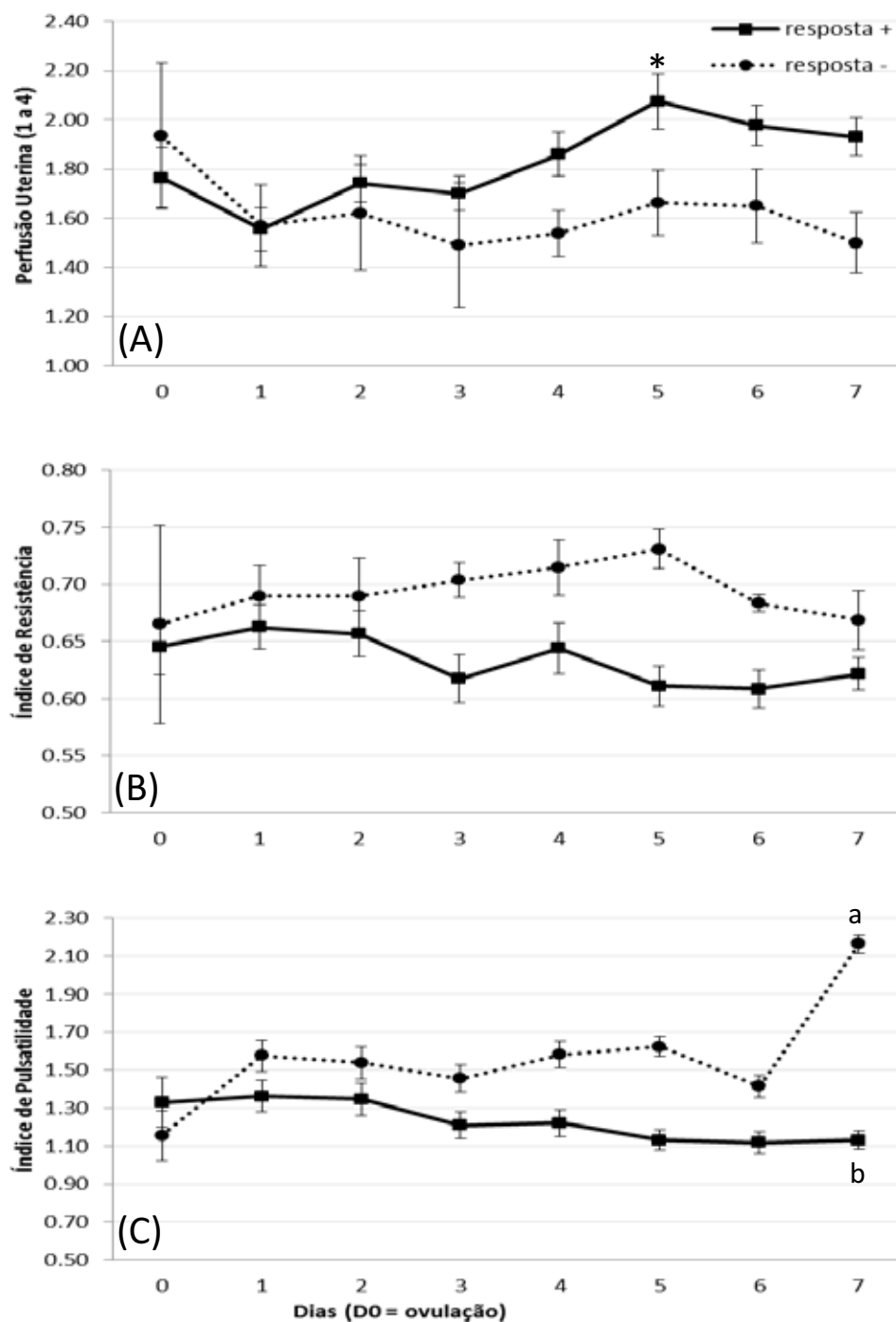


Figura 12 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (A), do RI (B) e do PI (C) para éguas que atingiram concentração de P4  $\geq$ 2ng/mL entre D0 e D15 (resposta + ; n = 24) e para éguas que não atingiram (resposta - ; n = 5). Letras minúsculas diferem estatisticamente entre os grupos. Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo estão representadas por (\*). No grupo resposta +, a perfusão vascular uterina foi maior ao D5 quando comparada ao D1 e tendeu (P = 0,06) a ser maior que ao D3.

Para o segundo momento, de D8 à D15, a avaliação da perfusão vascular, RI e PI das éguas resposta positiva e as éguas que emprenharam foram comparadas às que não emprenharam, independente do grupo (Figura 13).

A análise demonstrou que não há efeito na perfusão vascular, mas há efeito de grupo para o RI e PI ( $P < 0,05$ ). Para o PI, também foi detectada a interação entre grupo e dia ( $P < 0,05$ ) e uma tendência a efeito de dia ( $P = 0,08$ ). Porém, quando os dados foram analisados separadamente, apenas para a perfusão vascular uterina foi possível detectar diferenças entre os dias dentro do grupo de éguas prenhes. Nas éguas prenhes, a perfusão vascular aumenta progressivamente a partir de D12, enquanto que nas éguas não prenhes não houve alteração. Além disso, no D15, a perfusão vascular detectada tendeu a ser menor nas éguas não prenhes quando comparadas às éguas prenhes.

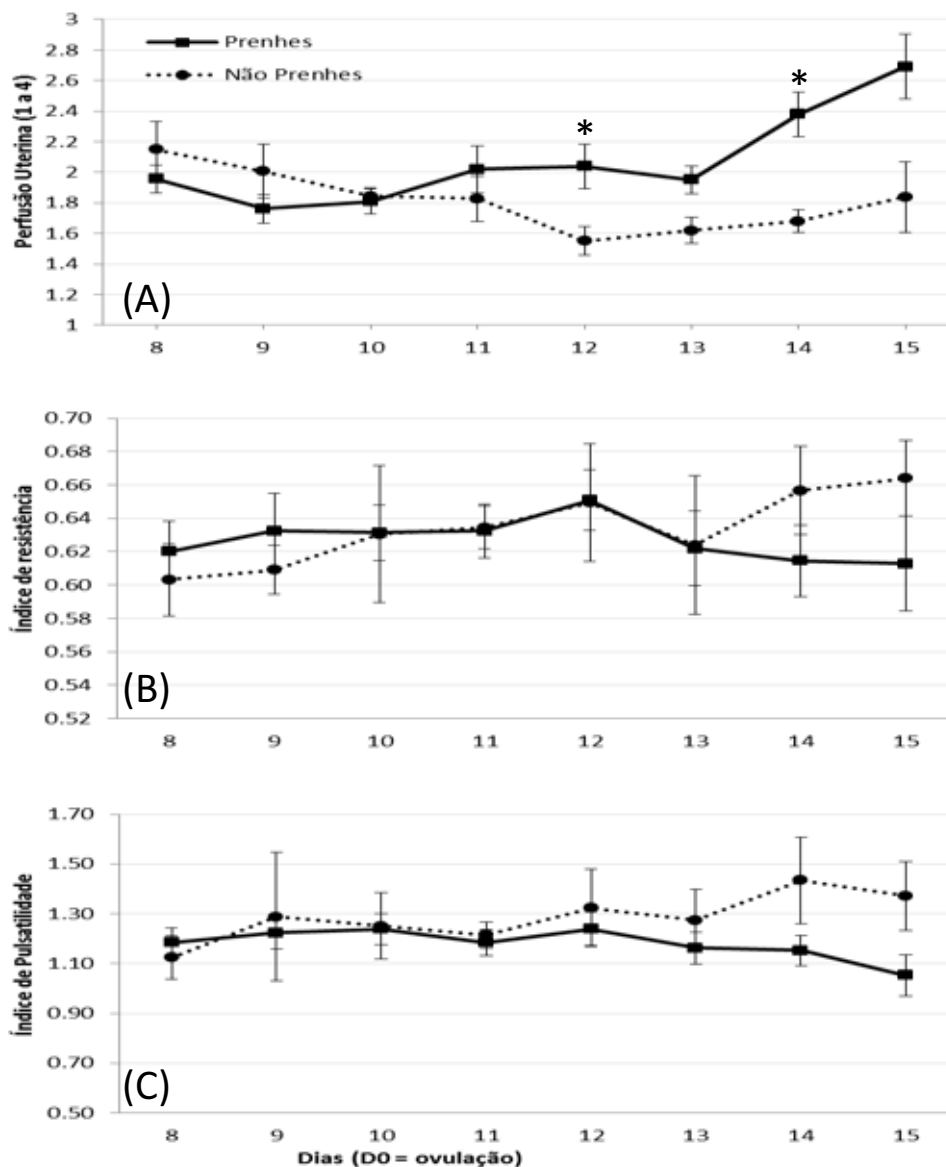


Figura 13 - Médias  $\pm$  SEM da perfusão vascular (A), do RI (B) e do PI (C) para as éguas prenhes (n=16) versus não prenhes (n=7) entre o D8 e D15 das éguas resposta positiva. Diferenças estatísticas estão representadas por (\*).

### 5.3. Amostra de sangue e dosagem hormonal plasmática

Da mesma forma como feito para os dados da vascularização uterina e do CL / estrutura formada, para facilitar a análise e compreensão dos achados, os dados foram divididos em dois momentos: do D0 ao D7 e do D8 ao D15.

Para a P4, tanto comparações entre os grupos [controle (n=13), aspiração (n=21) e hCG + aspiração (n=17)] quanto entre subgrupos [controle (n=13), aspiração  $\geq 25$  (n=8), aspiração  $\geq 30$  (n=13), hCG + aspiração  $\geq 25$  (n=9), hCG + aspiração  $\geq 30$  (n=8)] foram realizadas.

A comparação entre grupos demonstrou que existem efeitos do grupo, dia e interação de grupo e dia para a P4 no intervalo de D0 ao D7 ( $P < 0,05$ ), porém, no intervalo compreendido de D8 a D15 apenas uma tendência de efeito do grupo foi observada ( $P = 0,07$ ). No grupo controle, a concentração de P4 plasmática foi menor para o D0 quando comparado a todos os demais dias ( $P < 0,05$ ), e para D1 quando comparado aos dias de D2 ao D7 ( $P < 0,05$ ), enquanto que entre estes últimos não houve diferença. Para os grupos aspiração e hCG + aspiração, não houve diferença de D0 a D3 e estes diferiram de D5, D6 e D7 ( $P < 0,05$ ), que não diferiram entre si. Porém, no grupo hCG + aspiração a partir de D4 uma semelhança ao D5, D6 e D7 já passa a existir. Também foi detectada diferença entre grupos dentro de cada grupo, como demonstrado na Figura 12. Já para o segundo momento, de D8 a D15, nenhuma diferença foi detectada entre grupos nem ao longo dos dias (Figura 15).

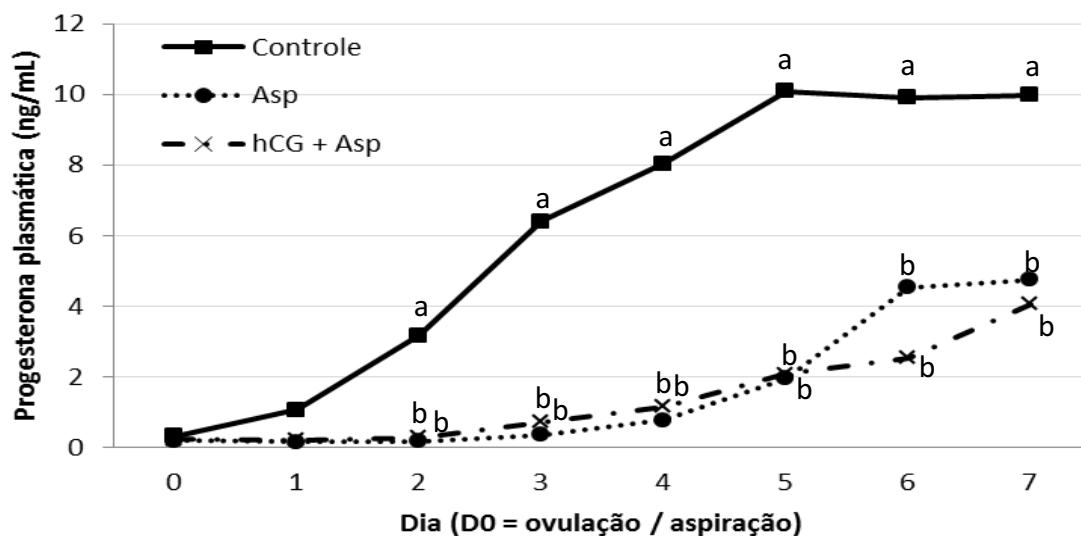


Figura 14 – Mediana da concentração de P4 plasmática ao longo dos dias (D0 à D7) dos grupos controle (n=13), aspiração (n=21) e hCG + aspiração (n=17). Letras minúsculas (a, b) indicam diferenças entre grupos dentro de cada dia.

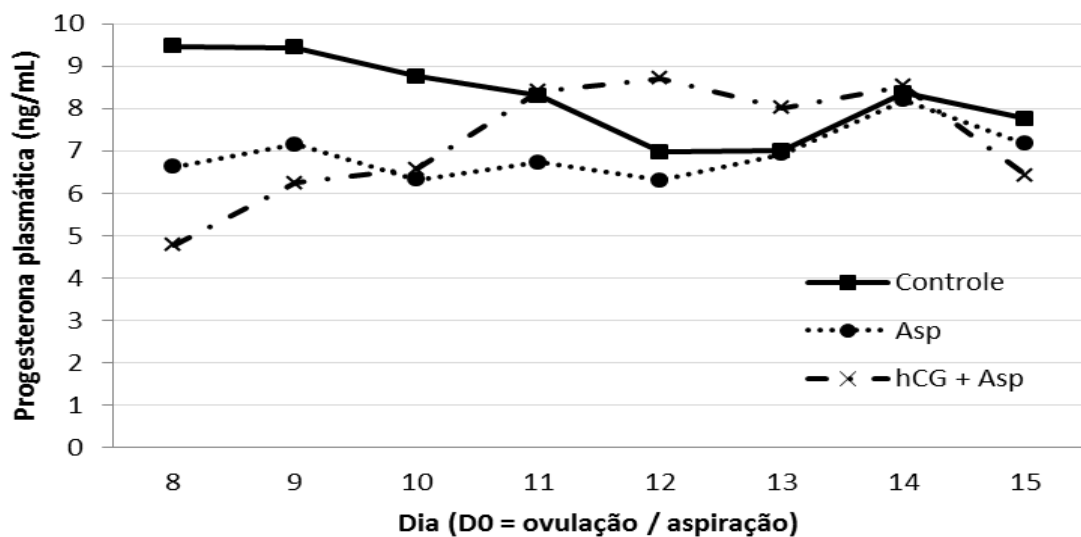
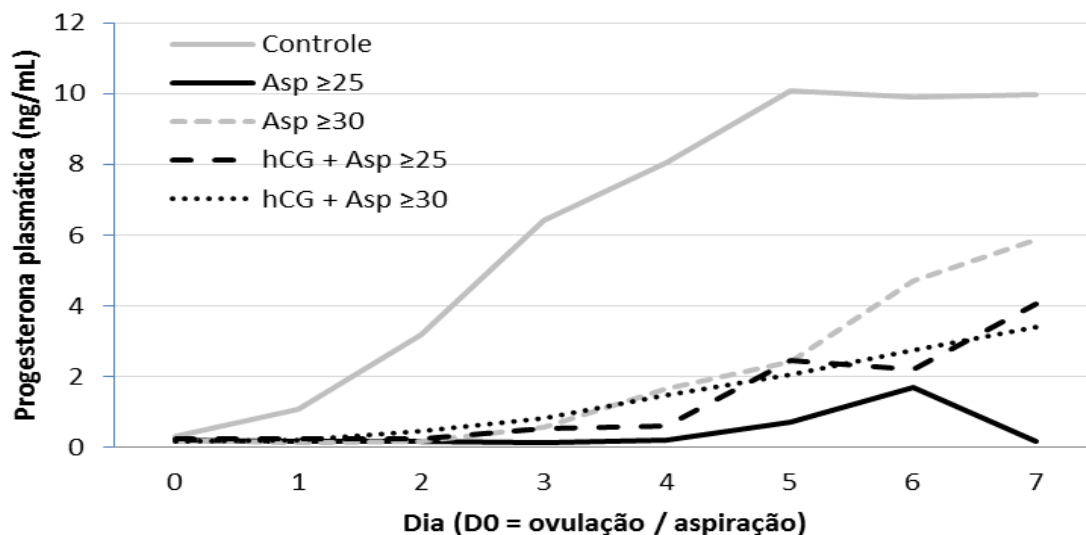


Figura 15 – Mediana da concentração de P4 plasmática ao longo dos dias (D8 à D15) dos grupos controle (n=13), aspiração (n=21) e hCG + aspiração (n=17).

Quando divididos em subgrupos, efeitos de tratamento, dia e interação tratamento e dia foram detectados ( $P < 0,05$ ) e as diferenças entre subgrupos dentro de cada dia bem como entre dias dentro de um mesmo subgrupo estão demonstrados na Figura 16.



	0	1	2	3	4	5	6	7
Controle	0,3Aa	1,1Ab	3,2Ac	6,4Ad	8,0Ae	10,1Ae	9,9Ae	10,0Ae
Asp ≥25	0,2Aa	0,2Aa	0,2BCa	0,1Ba	0,2BCa	0,7Ba	1,7BCa	0,2BCa
Asp ≥30	0,2Aa	0,1Aa	0,2BCa	0,6Bb	1,7ABCc	2,4Bc	4,7ACc	5,9ACc
hCG + Asp ≥25	0,3Aa	0,2Aa	0,2BCa	0,5Ba	0,6ABCac	2,5ABbc	2,2ACb	4,1ACb
hCG + Asp ≥30	0,2Aa	0,2Aa	0,5ACa	0,8Ba	1,5ACa	2,0Ba	2,7BCa	3,4ACa

Figura 16 – Mediana da concentração de P4 plasmática ao longo dos dias (D0 à D7) dos subgrupos controle (n=13), aspiração  $\geq 25$  (n=8), aspiração  $\geq 30$  (n=13), hCG + aspiração  $\geq 25$  (n=9) e hCG + aspiração  $\geq 30$  (n=8). Letras maiúsculas (A, B, C) na tabela indicam diferenças estatísticas entre os subgrupos dentro de um mesmo dia. Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferenças entre dias dentro do mesmo subgrupo.

Quando as éguas que responderam foram analisadas separadamente, ou seja, apenas aquelas que atingiram concentração plasmática de P4 acima de 2ng/mL entre D0 e D15, os grupos em que as éguas foram submetidas à aspiração não diferiram do grupo controle (ovulação espontânea). Porém, foram detectadas diferenças entre subgrupos na P4 plasmática ( $P < 0,05$ ) ao dia 7 (dia da involução para os grupos aspirados): grupo controle (n=13; P4

média = 14,15 ng/mL) apresentou maior ( $P < 0,05$ ) concentração plasmática que subgrupo aspiração  $\geq 30$  ( $n=9$ ; P4 média = 7,66 ng/mL) e grupo hCG + aspiração  $\geq 25$  ( $n=6$ ; P4 média = 5,50 ng/mL). Grupo controle tendeu a apresentar maior ( $P=0,06$ ) concentração de P4 plasmática que o subgrupo hCG + aspiração  $\geq 30$  ( $n=6$ ; P4 média = 7ng/mL). O subgrupo aspiração  $\geq 25$  não foi usado nesta análise uma vez que o número de amostras era muito pequeno ( $n=3$ ).

#### 5.4. Resposta ao tratamento e teste de fertilidade (fase 2)

Quanto à funcionalidade da estrutura formada a partir da aspiração, as diferenças entre grupos estão representados na Tabela 1. Para os subgrupos, 43% (3/7) das éguas do subgrupo aspiração  $\geq 25$ , 77% (10/13) das éguas do subgrupo aspiração  $\geq 30$ , 75% (6/8) das éguas do subgrupo hCG + aspiração  $\geq 25$  e 67% (6/9) das éguas do subgrupo hCG + aspiração  $\geq 30$  alcançaram concentração plasmática  $\geq 2$ ng/mL. Quando comparados ao grupo controle, apenas o subgrupo aspiração  $\geq 25$  apresentou menor ( $P < 0,05$ ) número de éguas que responderam à aspiração atingindo concentração de P4 acima de 2ng/mL, enquanto que não foram detectadas diferenças entre os subgrupos aspirados com folículos de diâmetro  $\geq 25$  e  $\geq 30$ , nem entre os grupos em que o hCG foi aplicado 24h antes da aspiração com folículos de diâmetro  $\geq 25$  e  $\geq 30$ .

A resposta à aspiração interferiu na prenhez, ou seja, apenas éguas que atingiram concentração plasmática acima de 2ng/mL engravidaram, porém, a concentração máxima de P4 plasmática atingida não interferiu na fertilidade. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos, provavelmente devido ao baixo número de amostras (Tabela 1). É interessante salientar que no grupo aspiração as quatro éguas inovuladas que não engravidaram não responderam à aspiração folicular e mantiveram concentrações plasmáticas de P4 abaixo de 2ng/mL durante todo o período de avaliação, enquanto que, para o grupo hCG + aspiração, das oito éguas que não engravidaram cinco delas também não responderam à aspiração.

Também não foram detectadas diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) entre P4 plasmática máxima e P4 ao D7 entre as éguas que engravidaram e que não engravidaram, independente do grupo.

Quando os grupos aspirados foram associados (aspiração e hCG + aspiração), a taxa de prenhez para o grupo controle (74%; 14:19) tendeu a ser maior ( $P=0,05$ ) que os grupos aspirados associados (43%; 9:21). Interessante salientar, que quando levando em consideração a resposta à aspiração, das 12 éguas aspiradas resposta positiva (3 éguas do grupo aspiração e 9 éguas do grupo hCG + aspiração) 9 delas engravidaram (75% de prenhez).

Tabela 1 – Taxa de prenhez (%) e de resposta positiva (% de éguas que atingiram concentração  $\geq 2\text{ng/mL}$  entre D0 e D15) por grupo controle, aspiração e hCG + aspiração.

Grupo	Resposta + (%)	Prenhez (%)
Controle	100 (13:13)a	74% (14:19)a
Aspiração	65 (13:20)b	43% (3:7)a
hCG + Aspiração	71 (12:17)ab*	43% (6:14)a

Letras iguais indicam semelhança estatística. \* indica tendência estatística: grupo controle tendeu a ser maior que grupo hCG + aspiração ( $P = 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Conforme já relatado por outros autores (HINRICHS et al., 1991; HAYNA et al., 2006; MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010; 2012) e encontrado no presente trabalho, a aspiração de folículos com diâmetro  $\geq 25$ mm promove a luteinização das células foliculares levando a um aumento na concentração plasmática de P4 a níveis compatíveis ao diestro ( $\geq 2$ ng/mL).

As taxas de resposta positiva encontradas (65% para o grupo aspiração e 71% para o grupo hCG + aspiração) foram superiores aos relatados por Mozzaquatro et al. (2010) que, ao aspirarem folículos em diestro, encontraram que apenas um de seis folículos (17%) com diâmetro entre 25 e 29mm, um de quatro (25%) entre 30 e 35mm e nenhum de cinco (0%)  $\geq 35$ mm luteinizaram quando a P4 circulante apresentava-se em altas concentrações no momento da aspiração. Este fato mostra a importância da aplicação da prostaglandina previamente à aspiração. Por promover a luteólise de CLs de ciclos anteriores reduz a concentração circulante de P4 e permite o aumento do LH endógeno, como sugerido por Gastal et al. (2000).

Uma das alterações ocorridas durante o processo de luteinização é a mudança na resposta celular aos sinais externos permitindo que as células lúteas respondam a um novo grupo de hormônios. Um dos principais sinais externos é o aumento do LH que promove a alteração na expressão de vários receptores (STOCCO et al., 2007) e está diretamente envolvido no processo de luteogênese.

Entretanto, além das características hormonais, a categoria dos folículos aspirados parece ser importante para a resposta. Os achados do presente trabalho demonstram que folículos aspirados com diâmetro entre 25 e 29mm e sem aplicação prévia de 2500 UI de hCG (subgrupo aspiração  $\geq 25$ ) apresentam menor capacidade de se tornarem funcionais quando comparados aos CLs formados a partir de ovulações espontâneas. Apenas 43% (3/7) dos animais avaliados no subgrupo aspiração  $\geq 25$ mm atingiram concentração plasmática de P4  $\geq 2$ ng/mL. Possivelmente, o nível de maturação ou a viabilidade do folículo deve estar interferindo na sua competência em luteinizar. Achados prévios (BELIN et al., 2000) indicam que folículos com diâmetro próximo a 25mm, apesar de já dominantes, ainda apresentam uma capacidade

esteroidogênica reduzida quando comparados a folículos de diâmetros maiores. Além disso, a razão P4:E2 pode ser um importante indicativo para avaliação da viabilidade do folículo.

Outro fator importante e que pode justificar a alta taxa de folículos aspirados que responderam positivamente ao procedimento no presente trabalho, foi a não retirada das células da granulosa pela escarificação da parede no momento da aspiração. A remoção das células foliculares pode induzir a formação de um CL com baixo número de células lúteas (NISWENDER et al., 2000) e baixa qualidade, uma vez que as células luteais grandes (20 a 45µm de diâmetro) são originadas de células da granulosa e são responsáveis por 80% da secreção de progesterona *in vivo* (McKINNON et al., 2011).

Como esperado, a resposta à aspiração folicular interferiu na taxa de prenhez e apenas as éguas que atingiram concentrações de P4 acima de 2ng/mL até o dia da inovulação foram capazes de se tornarem prenhes. Apesar das diferenças nas concentrações de P4 entre os subgrupos no dia 7 (dia de inovulação nos subgrupos / grupos aspirados) e menores concentrações detectadas nas éguas submetidas à aspiração, estas diferenças não interferiram nas taxas de prenhez uma vez que bastava as éguas terem respondido (>2ng/mL) para que a gestação pudesse ocorrer. As prenhezes ocorreram independente das concentrações plasmáticas máximas de P4 alcançadas ao longo das avaliações. Isto demonstra que a P4 é sim essencial para o estabelecimento da gestação, porém, uma vez atingida a concentração mínima necessária, valores muito elevados não interferem no resultado. No entanto, ainda não é possível afirmar qual é este mínimo necessário.

Os achados concordam com o relato de Allen (2001) que mostra que o CL primário, responsável pela produção de P4 e manutenção do primeiro terço da gestação, pode levar a P4 a atingir concentrações circulantes tão baixas quanto 3 – 5 ng/mL sem provocar danos à gestação até que as concentrações aumentam incisivamente entre 38 – 40 dias. Para vacas, foi observado que concentrações de P4 circulantes  $\geq 1,48$  ng/mL são suficientes para manter a gestação durante estas duas primeiras semanas, porém, concentração < 5 ng/mL ao D14 interferem nas taxas de gestação provocando redução no número de prenhezes entre 28 e 63 dias.

Os resultados da P4 plasmática mostram que enquanto no grupo controle a partir do D2 e até o D7 estes valores são superiores a 2ng/mL e não diferem entre si, para os demais grupos aspirados, com ou sem a aplicação prévia do hCG, concentrações superiores a 2ng/mL só foram alcançadas a partir de D5. Apesar de não terem sido detectadas diferenças entre os grupos quando as éguas que não responderam (P4 plasmática <2ng/mL) foram excluídas das análises, as éguas que formaram estruturas lúteas mantiveram o mesmo padrão e só atingindo concentrações superiores a 2ng/mL a partir do D5.

Interessante notar que, mesmo com diferenças detectadas na concentração plasmática de P4 entre os grupos ao longo dos dias zero e sete e mesmo que o grupo controle tenha apresentado concentrações superiores aos detectados para todos os subgrupos aspirados durante os três primeiros dias após a ovulação ou a aspiração, resultados semelhantes não foram encontrados entre os dias oito e 15. Isto indica que, como já observado em estudos anteriores (MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010), as estruturas luteinizadas formadas a partir da aspiração de folículos  $\geq 25$ mm necessitam de um período maior para concluírem a luteinização, o que pode ser observado pelos longos 4 a 7 dias até que atinjam concentrações semelhantes as do grupo controle.

Estudos demonstram que a transformação das células da granulosa em células luteais ocorre em poucas horas (STOCCO et al., 2007) e a luteinização é completa até o terceiro dia após a ovulação (NISWENDER & NETT, 1993), o que condiz com o encontrado para o grupo controle. Segundo Niswender (2000), as concentrações séricas de P4 dependem da quantidade de tecido esteroideogênico, perfusão sanguínea e capacidade do tecido esteroideogênico em sintetizar P4. A quantidade de tecido esteroideogênico é dependente do número e tamanho das células luteais, as quais aumentam durante o desenvolvimento luteal.

O retardo no processo de luteinização observado nos folículos aspirados, tanto no presente trabalho quanto em trabalhos anteriores (MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010), levanta a questão sobre o quanto a interrupção do processo de maturação e desenvolvimento final do folículo pode estar envolvido no processo de luteinização. Como já citado, a

ovulação é um processo complexo que envolve inúmeras etapas como a remodelação da matrix extracelular (CURRY & SMITH, 2006), liberação de metaloproteinases (WOESSNER, 1991), expressão de genes e síntese de proteínas importantes tanto para a ovulação quanto para a luteinização (FAN et al., 2011), mudanças na vascularização da parede folicular (GASTAL et al., 2006) dentre outros. Todos estes eventos são dependentes do aumento do LH endógeno e que com a aspiração não ocorrem ou sofrem alguma alteração. Pode ser que a aplicação prévia de hCG esteja agindo mimetizando a onda de LH e induzindo parcialmente estes eventos, principalmente em folículos de diâmetro de 25-29mm.

A ultrassonografia modo B e Doppler é uma ferramenta interessante na avaliação do desenvolvimento da estrutura luteinizada e sua funcionalidade. Nas éguas que não responderam à aspiração, não foi observada a formação de estruturas semelhantes a um CL quando a ultrassonografia modo B foi utilizada, tão pouco foi observado aumento na vascularização e formação de uma área irrigada ao modo Doppler.

Nota-se que há aumento tanto na área quanto na vascularização do CL e das estruturas lúteas formadas. Porém no CL formado a partir da ovulação espontânea observa-se um maior aumento na vascularização e, provavelmente, menor alteração na área ao longo dos dias. Em geral, a vascularização dos CLs é maior que dos grupos onde os animais foram submetidos à aspiração, enquanto que o mesmo não pôde ser observado para a área total ou luteinizada. Como reflexo deste achado, a porcentagem de área vascularizada pela área total ou luteinizada apresentou um aumento significativo no grupo controle, não observado nos demais grupos. Mesmo assim, a vascularização observada nos grupos aspirados mostra que o procedimento também influenciou em um dos importantes fatores envolvidos na luteogênese: a angiogênese.

Como já citado anteriormente, a neovascularização é essencial para a suplementação necessária para a biossíntese de P4, e para a secreção de outros hormônios esteroidais pelas células luteais (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). 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).

Os grupos aspirados, por outro lado, demonstraram uma maior variação entre D0 e D7 tanto da área total quanto da área luteinizada, isso se deve ao grande coágulo central que era normalmente formado nas estruturas luteinizadas a partir da aspiração e aumentava as dimensões. Por este motivo e devido a dificuldade de determinar o coágulo central em muitos momentos, a avaliação da área luteinizada foi mais difícil. Porém, mesmo com os dados obtidos, foi possível detectar aumento nas áreas luteinizadas ao longo do período de avaliação. Isto se deve a hipertrofia e luteinização das células da granulosa que podem chegar a triplicar de tamanho durante o processo de luteogênese (GINTHER, 1992).

A avaliação da área total da estrutura por ultrassonografia modo B não demonstrou ser uma eficiente técnica para determinação da sua funcionalidade, ou seja, da produção de P4. Porém, é possível detectar a presença de uma estrutura com característica morfoecogênicas semelhantes a de um CL quando estas estruturas se tornaram funcionais, tal como relatado por Mozzaquatro et al. (2012).

A análise da área vascularizada pela ultrassonografia modo color-Doppler se mostrou mais eficiente na avaliação da funcionalidade da estrutura. Por meio desta técnica foi possível detectar os animais que não responderam e não produziram P4 mesmo antes de submetidos às dosagens hormonais uma vez que não houve a formação de novos vasos. Ainda, existe uma relação positiva entre área vascularizada e P4 plasmática que mostrou que 52% da área vascularizada observada influenciou na P4 circulante nas éguas que responderam.

Os resultados e relações apresentados para as mudanças na área e na vascularização tanto do CL quanto das estruturas luteinizadas a partir da aspiração no presente estudo vão de acordo com os achados previamente descritos por Ginther et al. (2007) ao analisar a hemodinâmica do CL durante o ciclo estral. Os autores encontraram que a área do CL também aumentou mas não tão marcadamente quanto a área de perfusão sanguínea, sendo a análise da hemodinâmica do CL mais determinante da funcionalidade dessa estrutura (GINTHER et al., 2007).

Duas diferentes hipóteses podem explicar o estímulo à incisa luteinização das células da granulosa após a aspiração do folículo dominante: 1) levando em consideração os achados de Ginther et al. (2007) que mostram o efeito negativo dos hormônios esteroidais sobre a liberação das gonadotrofinas, a remoção mecânica do fluido folicular levaria a uma brusca redução nas concentrações de E2 que poderiam ser relevantes na queda da concentração plasmática e, conseqüentemente, induziriam o aumento na liberação do LH pela hipófise; ou ainda, 2) a aspiração do fluido folicular, segundo NEKOLA e NALBANDOV (1971), promoveria a retirada mecânica dos fatores produzidos pelo oócito e solúveis neste fluido que atuam prevenindo a luteinização folicular. Sabe-se que os fatores liberados pelo oócito impedem a expressão de RNAm de receptores de LH (EPPIG et al., 1997). Inclusive, já foi demonstrado *in vitro* que a retirada do oócito de um meio de cultura contendo células da granulosa promove a luteinização enquanto que a manutenção do oócito inibe este processo (LI et al., 2000). No entanto, para que o processo seja totalmente elucidado, mais estudos necessitam ser realizados.

A aplicação do hCG foi importante na luteinização das células da granulosa e nas alterações no fluido folicular principalmente nos folículos aspirados com diâmetro entre 25 e 29mm. Enquanto que as éguas em que as 2500UI de hCG foram administradas 24h antes da aspiração dos folículos que apresentavam diâmetro entre 25 e 29mm alcançaram concentrações de P4 plasmáticas similares as detectadas para o grupo controle ao D4, as éguas que não foram submetidas à administração prévia de hCG e apresentavam a mesma categoria de folículos aspirados ainda não haviam atingido a semelhança no D7.

Uma correlação positiva, porém fraca, entre P4 intrafolicular e P4 plasmática máxima atingida após a aspiração foi detectada independente do grupo, ou seja, a concentração intrafolicular de P4 dos folículos aspirados pode indicar uma maior concentração plasmática de P4 produzida pela estrutura lútea formada a partir da aspiração. Logo, a concentração intrafolicular de P4 demonstra o início da luteinização das células foliculares mesmo antes da ovulação e, conforme já demonstrado anteriormente (Belin et al., 2000), indica maturação folicular e influência numa melhor luteinização.

A aplicação da dose de 2500UI de hCG 24 horas antes da aspiração do folículo com diâmetro  $\geq 25$ mm promove aumento das concentrações intrafoliculares de P4 uma vez que este hormônio age no folículo de forma análoga ao LH. Como já relatado (FERREIRA-DIAS et al., 2006), é o LH o hormônio responsável por mediar o processo de luteinização das células da granulosa que constituem a parede do folículo pré-ovulatório mesmo antes da ovulação.

Quanto às concentrações intrafoliculares de P4, nos animais em que o hCG não foi aplicado previamente à aspiração, a tendência a relação entre diâmetro folicular e concentração de P4 intrafolicular e a correlação biológica positiva encontradas principalmente até os folículos atingirem diâmetro próximo a 33 mm indicam que o tamanho do folículo aspirado interfere nas concentrações intrafoliculares de P4, ou seja, quanto maior o diâmetro folicular, maior a quantidade de P4 produzida no folículo. Estes achados fortalecem os previamente encontrados por Belin et al. (2000) que demonstraram que as concentrações de P4 aumentam significativamente no fluido do folículo dominante durante seu crescimento, ou seja, a estereidogênese é maior nos folículos dominantes ( $> 30$  mm) quando comparados a folículos no momento da divergência (20 a 24 mm).

A aplicação da dose de 2500 UI de hCG i.v. 24h antes da aspiração folicular promoveu aumento da concentração intrafolicular de P4 e, quando os quatro grupos foram analisados separadamente, nota-se que este aumento elevou as concentrações de P4 intrafolicular dos folículos com diâmetro  $\geq 25$  mm a concentrações similares aos encontrados no fluido dos folículos com diâmetro  $\geq 30$  mm. Além disso, nestes animais em que o hCG foi aplicado não foi detectada nenhuma relação entre diâmetro folicular e concentração intrafolicular de P4, provavelmente devido ao aumento promovido pelo tratamento nestas concentrações de P4 em todos os folículos, inclusive os com diâmetros a partir de 25 mm.

Segundo BELIN et al. (2000), a aplicação intravenosa de hCG promove aumento significativo das concentrações de P4 e redução das concentrações de estradiol no fluido de folículos dominantes, conseqüentemente, a proporção P4:estradiol-17B (P4:E2) é significativamente maior após a aplicação da

gonadotrofina devido a uma diminuição na produção de E2 seguida de um aumento na produção de P4.

O hCG promove uma expansão significativa da camada das células da granulosa em éguas (STOCK et al., 2002); estimula a expressão de VEGF e Angiopietinas e seus receptores (FRASER et al., 2005); e altera a expressão de receptores (STOCCO et al., 2007). Alterações estas similares as provocadas pelo aumento pré-ovulatório de LH que, somadas a interrupção, devido a aspiração, do contato das células foliculares somáticas com os fatores liberados pelo oócito diluídos no fluido folicular, foram provavelmente os responsáveis pela indução do início do processo de luteinização das células da granulosa murais remanescentes da aspiração dos folículos principalmente de diâmetro entre 25 e 29mm.

Os resultados mostram que o aumento nas concentrações plasmáticas de P4 devido a formação de estruturas luteais a partir da aspiração foram capazes de promover mudanças uterinas compatíveis ao diestro e suficientes para permitirem a formação de um ambiente uterino ideal para recebimento do embrião e estabelecimento da gestação até o último dia de avaliação (D15), embora as concentrações de P4 plasmática não tenham correlacionado com as alterações uterinas. As modificações uterinas provocadas pelo aumento da P4 plasmática foram bem observadas quando éguas que apresentaram resposta positiva foram comparadas as que apresentaram resposta negativa. Menores valores de índices Doppler (RI e PI) foram detectados nas éguas com resposta positiva, o que indica que durante este período estas éguas apresentaram aumento na perfusão uterina.

Diferenças na perfusão vascular não foram detectadas no útero das éguas submetidas à aspiração ao longo dos dias quando estes foram analisados separadamente. É provável que a demora na formação da estrutura lútea e até diferenças individuais ou entre as categorias de folículos aspirados tenham interferido na perfusão. Porém, é importante observar que os índices Doppler não variaram entre grupos principalmente quando éguas que não responderam a aspiração foram excluídas da análise, o que fortalece o indício de que quando a estrutura formada a partir da aspiração se torna funcional esta também é eficiente na preparação de um ambiente uterino semelhante ao diestro espontâneo (Figura 9).

Embora não tenha sido detectada diferença estatística, é interessante notar os pontos de onde partiram os valores de perfusão vascular, RI e PI no útero dos grupos controle, aspiração e hCG+aspiração mesmo quando só consideradas as éguas que apresentaram resposta + (Figura 9). Nos grupos nos quais os animais foram submetidos à aspiração folicular, maiores valores de perfusão vascular e menores valores de RI e PI, que confirmam a alta perfusão vascular, foram detectados ao D0. Isto indica que no dia da aspiração folicular o útero das éguas aspiradas apresentavam, numericamente, uma maior perfusão vascular do que no dia da ovulação das éguas no grupo controle. A alta perfusão uterina provavelmente é justificada pela fase de estro que todas elas se encontravam no momento da aspiração, conseqüentemente maiores concentrações de E2 circulantes também estavam presentes nestes momentos. Bollwein et al. (2002) demonstrou que as concentrações de estradiol estão correlacionadas positivamente com a perfusão vascular durante o estro, mas não durante o diestro.

A perfusão uterina foi modificada ao longo dos sete primeiros dias após a ovulação e os maiores valores foram atingidos no quarto e quinto dia após a ovulação no grupo controle, o que condiz com achados preliminares (BOLLWEIN et al., 1998; SILVA et al., 2005; IGNÁCIO et al., 2012). Este aumento coincide com a descida do embrião uterino e, segundo achados recentes (IGNÁCIO et al., 2012), provavelmente é resultado de uma preparação uterina para o recebimento do embrião, uma vez que ocorre mesmo em éguas não inseminadas e não inovuladas. Estas informações podem vir a ser importantes para a avaliação do ambiente uterino de éguas que serão utilizadas como receptoras de embrião.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas nas taxas de prenhez entre os grupos, a variação numérica indica uma diferença biológica (74% para o grupo controle, 43% para o grupo aspiração e 43% para o grupo hCG + aspiração) que pode representar uma importante redução econômica nos resultados a campo. É importante salientar que os embriões foram inovulados nas éguas submetidas à aspiração independente da observação da resposta positiva ou negativa, logo, é possível melhorar estas taxas de prenhez com a utilização das informações uterinas e de vascularização da estrutura lútea antes da inovulação.

Os índices de pulsatilidade alteram nas éguas prenhes sendo menores nestes animais quando comparados às éguas não prenhes. Os achados da perfusão vascular reafirmam estes achados uma vez que demonstram um aumento crescente a partir do D12 nas éguas prenhes e que são semelhantes a dados já publicados (SILVA et al., 2005).

## 7. CONCLUSÕES

- A aspiração de folículos dominantes com diâmetro  $\geq 25$ mm para retirada do fluido folicular dias após aplicação de prostaglandina, principalmente nas éguas que se encontram em diestro, é eficaz na indução da luteinização destas células da granulosa remanescentes. A aspiração permite a formação de estruturas lúteas capazes de produzir P4 em concentrações compatíveis ao diestro ( $\geq 2$ ng/mL), porém, estas estruturas necessitam um maior tempo para que ocorra a luteinização do que CLs formados a partir da ovulação.
- A categoria de folículos aspirados interfere na resposta à aspiração, principalmente quando folículos com diâmetro entre 25 e 30mm são aspirados. Nestes casos, o hCG 24h antes da aspiração pode ser um importante recurso para promover aumento na taxa de resposta desta categoria de folículos. Além disso, o hCG também pode ser utilizado visando proporcionar aumento nas concentrações plasmáticas máximas de P4 no período pós-aspiração e aumento das concentrações intrafoliculares de P4.
- Éguas submetidas à aspiração podem ser utilizadas como receptoras de embrião e a prenhez depende de concentrações plasmáticas de P4 acima de 2ng/mL até o momento da inovulação são capazes de se tornar gestantes. No entanto, é importante salientar que altas concentrações de P4 circulante não são necessárias para o estabelecimento da gestação até o D15.
- A avaliação da hemodinâmica pela ultrassonografia modo Doppler é uma eficiente ferramenta para detectar a funcionalidade da estrutura e prever, de forma razoável, a P4 produzida.

- O ambiente uterino pós-aspiração é alterado e a aspiração folicular também se mostra eficiente na preparação uterina para o recebimento do embrião por promover o desenvolvimento de características uterinas compatíveis com o diestro espontâneo.
- A aspiração de folículos  $\geq 25\text{mm}$  pode ser um eficiente procedimento alternativo para a preparação de receptoras de embriões principalmente naqueles programas de transferência de embriões que sofrem com a escassez de receptoras e, conseqüentemente, dificuldade em sincronizá-las. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o processo de luteinização pós-aspiração folicular e melhorar a avaliação da funcionalidade da estrutura lútea e mudanças uterinas antes da inovulação do embrião.

## 8. REFERÊNCIAS

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

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

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.

ALLEN, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction in Domestic Animal**, v.36, p.121-123, 2001.

ASHLEY, R.L.; CLAY, C.M.; FARMERIE, T.A.; NISWENDER, G.D.; NETT, T.M. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven trans-membrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. **Endocrinology**, v.147, p.4151-4159, 2006.

BADINGA, L., DRIANCOURT, M.A., SAVIO, J.D., WOLFENSON, D., DROST, M. DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.47, p.871-883, 1992.

BELIN, F.; COUDET, G.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1335-1343, 2000.

BERGFELT, D.R., MEIRA, C., FLEURY, J.J., FLEURY, P.D.C., DELL'AQUA, J.A., ADAMS, G.P. Ovulation synchronization following commercial application

of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v.68, p.1183-91, 2007.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovulation and corpus luteum development. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. Hardcover: Sanders Elsevier, 2007, p. 1-13.

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

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

BOLLWEIN, H., SOWADE, C., STOLLA, R. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. **Theriogenology**. v.60, p.607-616, 2003.

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

BRUEMMER, J. E.; SLOUGH, T.; CARNEVALE, E. M.; NISWENDER, G. D. Temporal in vivo gene expression in the developing and regressing equine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.226-227, 2006.

CACCIATORE, B.N., SIMBER, B.N., FUSARO, P., TIITINEN, A. Transvaginal Doppler study of uterine artery blood flow in in vitro fertilization – embryo transfer cycles. **Fertility and Sterility**, v.66, p.130-134, 1996.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and

early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

CLAUS, R., DIMMICK, M.A., GIMENEZ, T., HUDSON, L.W. Estrogens and prostaglandin F2a in the semen and blood plasma of stallions. **Theriogenology**, v.38, p.687-693, 1992.

CURRY, T.E.Jr.; SMITH, M.F. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.24, p.228-241, 2006.

DIAZ, F.J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of Cell Science**, v.120, p.1330-1340, 2007.

DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v.383, p.531–535, 1996.

Eppig, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v.122, p.829-838, 2001.

EPPIG, J.J.; PENDOLA, F.L.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, J.K. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. **Biology of Reproduction**, v.73, p.351–357, 2005.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.56, p.976-984, 1997.

FAN, H. Y.; LIU, Z.; JOHNSON, P. F.; RICHARDS, J. S. CCAAT/Enhancer-binding proteins (C/EBP)- $\alpha$  and  $-\beta$  are essential for ovulation, luteinization and the expression of key target genes. **Molecular Endocrinology**, v.25(2), p.253-268, 2011.

FAN, H.Y.; LIU, Z.; SHIMADA, M.; STEMECK, E.; JOHNSON, P.F., HEDRICK, S.M., RICHARDS, J.S. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. **Science**, v.324 (5929), p.938-941, 2009.

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, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during early gestation in mares: new concepts of evaluation. **Animal Reproduction Science**, v.121s, p.281-283, 2010.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A. S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; REDMER, D. A.; SKARZYNSKI, D. J. Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.57, suppl.8, p.139-151, 2006.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225–232, 1994.

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

FRASER, H. M.; ABBOTT, M.; LAIRD, N. C. Effects of LH-releasing hormone antagonist on the secretion of LH, FSH, prolactin and ovarian steroids at different stages of the luteal phase in the stump-tailed macaque (*Macaca arctoides*). **Journal of Endocrinology**, v.111(1), p.83-90, 1986.

FRASER, H.M. Regulation of the ovarian follicular vasculature. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4(18), p.1-9, 2006.

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 Metabolites**, v.90, p.427-434, 2005.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v.25, p.279–283, 2000.

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

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

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

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.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14(2), p.159-177, 2008.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R.A.; HICKEY, T.E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D.G. Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v.119, p.3811–3821, 2006.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GINTHER, O. J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v.71, p.45-63, 2004a.

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

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the mare**. Cross Plaines, WI: Equiserves Publishing, 1992. 642p.

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

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

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

GINTHER, O.J.; WOODS, B.G.; MEIRA, C.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v.126, p.653-660, 2003.

GRAY, C.A.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v. 124, p. 289-300, 2002.

GROSDEMOUGE, I.; BACHELOT, A.; LUCAS, A.; BARAN, N.; KELLY, P.A.; BINART, N. Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.1, p.12, 2003.

HAYNA, J.T., MADILL, S., ROSER, J.F., TROEDSSON, M.H.T. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.355-6, 2006.

HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentration in the mare. **Biology of Reproduction**, v.44, p.292-298, 1991.

HUNZICKER-DUNN, M.; BARISAS, G.; SONG, J.; ROESS, D. A. Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors. **Journal of Biology and Chemistry**, v.278, p.42744-42749, 2003.

HUSSEIN, T.S.; FROILAND, D.A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic influenced by oocytes. **Biology of Reproduction**, v.4, p.154-160, 2005.

HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v.296, p.514-521, 2006.

IGNÁCIO, F.S.; CANESIN, H.S.; PANTOJA, J.C.F.; ROMANO, R.M.; NOVAES-FILHO, L.F.; FERREIRA, J.C.; MEIRA, C. Uterine hemodynamic evaluation of the beginning of diestrus in mares. **8<sup>th</sup> ISEET Abstract / Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.397-422, 2012.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.172, p.241-226, 1978.

KENYON, A.G.; MENDONÇA, L.G.D.; LOPES Jr, G.; LIMA, J.R.; SANTOS, J.E.P.; CHEBEL, R.C. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. **Animal Reproduction Science**. v. 136, p. 223-30, 2013.

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

KIEFER, B.L.; ROSER, J.F.; EVANS, J.W.; NEELY, D.P.; PACHECO, C.A. Progesterone patterns observed with multiple injections of a PGF2a analogue in the cyclic mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27(Suppl.), p.237-44, 1979.

KUMAR, T.R., WANG, Y., LU, N.F. AND MATZUK, M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature and Genetic**, v.15, p.201-204, 1997.

LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, p.839–845, 2000.

McCORD, L.A.; ROSEWELL, K.L.; BRANNSTROM, M.; CURRY, T.E. Ovarian expression and regulation of the stromelysins during the periovulatory period in the human and the rat. **Biology of Reproduction**, v.86(3), p.1-9, 2011.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER D.D. **Equine Reproduction**. 2.ed. Oxford:Wiley-Blackwell, 2011. 3132p.

MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; WHITING, L.; READER, K.L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; JUENGEL, J.L. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v.76, p.552–560, 2007.

MONTECHIESI, D.F. **Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de P4 plasmática em éguas cíclicas**. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Mozzaquatro, F.D., Verstegen, J.P., Douglas, R.H., Troedsson, M.H.T., DeLaCorte, F.D., Silva, C.A.M., Rubin, M.I.B. Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.56-62, 2010.

Mozzaquatro, F.D.; VERSTEGE, J.P.; DOUGLAS, R.H.; TROEDSSON, M.H.T., DeLaCORTE, F.D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Progesterone production in mares and echographic evaluation of the corpora formed after follicular aspiration. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.288-92, 2012.

NAKAMURA, K.; MINEGISHI, T.; TAKAKURA, Y.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, Y.; IBUKI, Y.; IGARASHI, M. Hormonal regulation of gonadotropin receptor mRSN in rat ovary during follicular growth and luteinization. **Molecular Cell Endocrinology**, v.82, p.259-263, 1991.

NEKOLA, M.V.; NALBANDOV, A.V. Morphological changes of rat follicular cells as paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v.118, p.5257-5268, 2005.

NISWENDER, D.; NETT, T.M. Luteal phase. In: VOSS, J.L.; McKINNON, A.O. (Eds.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 172-5.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.JJ; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Hystology Reviews**, v.80, p.1–29, 2000.

NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI, J. R.; PRICE, C. A.; CASTILHO, A. C. S.; PINTO, M. G. L.; BARROS, C. M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680-686, 2007.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKINNON, A.L.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Williams & Wilkins, 1992. P. 172-174.

Prestes, N.C. & Landim-Alvarenga, F.C. **Obstetrícia Veterinária: Fecundação e Clivagem**. Guanabara Koogan., 2006, p.1-21.

RICHARDS, J.S.; MIDGLEY, J.A.R. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. **Biology of Reproduction**, v.14, p.82-94, 1976.

SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCOGGIN C.F.; MEIRA C.; McCUE P.M.; CARNAVALE E.M.; NETT T.M.; SQUIRES E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v.58, p.151-164, 2002.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2 ed. Washington: Current Conceptions Inc., 2003. 368p.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G.F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v.25, p.72–101, 2004.

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.755-61, 2005.

SPENCER, T.E. & BAZER, F.W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p.1879-98, 2002.

STILL, J.G., GREISS, F. Effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.130, p.1-8, 1978.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v.28, p.117-149, 2007.

STOCK, A.E.; BOUCHARD, N.; BROWN, K.; SPICER, A.P.; UNDERHILL, C. B.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Induction of Hyaluronan synthase 2 by human chorionic gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v.143(11), p.4375-4384, 2002.

SU, Y.Q.; WU, X.; O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, F.L.; DENEGRE, J.N.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. **Developmental Biology**, v.276, p.64-73, 2004.

SUGIURA, K.; PENDOLA, F.L.; EPPIG, J.J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Developmental Biology**, v.279, p.20-30, 2005.

VANDERHYDEN, B.C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.219-227, 1993.

VANDERHYDEN, B.C.; MACDONALD, E.A. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1296–1301, 1998.

VANDERHYDEN, B.C.; TONARY, A.M. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. **Biology of Reproduction**, v.53, p.1243-1250, 1995.

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

WATSON, E.D.; PEDERSEN, H.G.; THOMSON, S.R.M.; FRASER, H.M. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. **Theriogenology**, v.54, p.599-609, 2000.

WOESSNER, J.F.Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v.5, p.2145-2154, 1991.

## 9. TRABALHO CIENTÍFICO

### 9.1. Trabalho a ser enviado para a revista *Animal Reproduction Science*

Evaluation of plasmatic progesterone concentration and luteal formation after ablation of follicles  $\geq 25$ mm, with or without previous hCG injection, in cycling mares post luteolysis induction

F.S. Ignácio<sup>1</sup>, L.F. Novaes-Filho<sup>1</sup>, J.C.F. Pantoja<sup>1</sup>, H.S. Canesin<sup>1</sup>, R.M. Romano<sup>1</sup>, C. Meira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP 18610-970, Brazil; e-mail address: [meira@fmvz.unesp.br](mailto:meira@fmvz.unesp.br); [nandasaules@gmail.com](mailto:nandasaules@gmail.com)

## Abstract

One of the biggest barriers for an embryo transfer (ET) program in mares is the absence of a good synchronization protocol between recipients and donors and because of the potential to become luteinized, ablation of follicles  $\geq 25$ mm might be a potential protocol for recipient preparation. The present study aimed to determine the plasmatic P4 production by the structures formed from follicle  $\geq 25$ mm aspiration, as well as its hemodynamic characteristics and the hCG action influence over this process. On the day five after ovulation, a prostaglandin injection where administered and cycles (n=51) of 16 crossbred mares where randomly distributed into five experimental groups: control (n=13; spontaneous ovulation), ABL-F $\geq 25$ mm (n=8; ablation of largest follicle between 25 and 29mm), ABL-F $\geq 30$ mm (n=13; ablation of largest follicle  $\geq 30$ mm), hCG+ABL-F $\geq 25$ mm (n=9; 2500UI of hCG administered 24h before ablation of largest follicle between 25 and 29mm) and hCG+ABL- $\geq 30$ mm (n=8; 2500UI of hCG administered 24h before ablation of largest follicle  $\geq 30$ mm). From D0 (day of ovulation or ablation) until D7, daily ultrasound evaluations where done to evaluate area (B mode) end vascularity (color-Doppler mode) of the structures. Follicle ablations promote an increase in plasma P4 concentrations to values similar to diestrous, however, the structures formed from follicle ablation show a delay in luteinisation. The hCG injection previous to ablation increased the number of functional structures among follicles of diameter 25-29mm and color-Doppler seems to be an efficient tool to detect functionality of the structure. In conclusion, the protocol used was efficient on promoting the luteinisation of granulosa cells that remain from ablation.

Keywords: corpus luteum, progesterone, follicle ablation, luteinization

## 1. Introduction

One of the biggest barriers for an embryo transfer (ET) program in mares is the absence of a good synchronization protocol between recipients and donors. It happens because the use of these protocols, as with steroids (Handler et al., 2007) or using the aspiration of all follicles to induce the emergence of a new follicular wave (Bergfelt et al., 2007), have not shown consistent results or have taken a long time for implantation, respectively.

Despite, some studies have detected increased plasmatic progesterone (P4) after aspiration of follicles in cycling mares (Hinrichs et al., 1991; Hayna et al., 2006; Mozzaquatro et al., 2010), which might be a potential protocol for recipient preparation. However, differences between the methodologies used in these studies have left behind some questions about the efficacy of follicles aspirations to forming functional CLs and to producing P4 in concentrations similar to spontaneous diestrous ( $P4 \geq 2\text{ng/mL}$ ).

Many factors, such as the moment of the cycle (Bogh et al., 2000; Mozzaquatro et al., 2010), time of the year (Alvarenga et al., 1999), quantity of granulosa cells left from the aspiration (Bracher et al., 1993) and follicular diameter of the aspirated follicle (Hayna et al., 2006), may influence the subsequent CL formation. It is already known that only dominant follicles  $\geq 25\text{mm}$  are capable of luteinizing (Hayna et al., 2006), which might be related to the increase in LH receptors after deviation (Nogueira et al., 2007), the removal of luteinization inhibitors present in the follicular fluid (Hinrichs et al., 1991) and the LH surge induced by the aspiration (Hayna et al., 2006).

Previous studies, have already shown that hCG is a hormonal preparation that may act in the follicle increasing intrafollicular P4 concentrations (Belin et al., 2000), increasing significantly granulosa cells expansion (Stock et al., 2002), stimulating VEGF and Angiopoietins expression and its receptors (Fraser et al., 2005), as well as modifying other receptors expression (Stocco et al., 2007). All these findings suggest that hCG anticipates follicle maturation and luteinization.

Also, the use of Doppler ultrasonography has been proved to be a valuable tool for evaluation of CL formation and functionality (Ginther et al., 2007). However, it has never been used to evaluate the same features in structures formed from follicle aspirations.

The present study aimed to determine the plasmatic P4 production by the structures formed from follicle  $\geq 25\text{mm}$  aspiration, as well as its hemodynamic characteristics and the hCG action influence over this process.

## 2. Materials and Methods

Cycles (n=51) of 16 crossbred mares aged between four and 15 years from UNESP School of Veterinary Medicine (Botucatu, Sao Paulo, Brazil, Latitude  $-22^{\circ} 53' 09''$  and Longitude  $48^{\circ} 26' 42''$ ) were used. All mares were cycling and in good body condition and were confined to paddocks with shelter, fed cost-cross hay (*Cynodon dactylon*), concentrate, mineral supplement, and had free access to water throughout the course of the experiments.

Ultrasonography B and 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 constant during the whole period of data collection.

Five days after the detection of ovulation, the three largest follicles were measured and Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PG  $F_{2\alpha}$ , Lutalyse<sup>®</sup>, 7.5mg, i.m., Pfizer Animal Health) was administered to promote luteolysis and to decrease plasmatic P4 to basal concentrations.

At this time, all mares were randomly distributed into five experimental groups: control (n=13; spontaneous ovulation), ABL-F $\geq 25\text{mm}$  (n=8; ablation of largest follicle between 25 and 29mm), ABL-F $\geq 30\text{mm}$  (n=13; ablation of largest follicle  $\geq 30\text{mm}$ ), hCG+ABL-F $\geq 25\text{mm}$  (n=9; 2500UI of hCG administered 24h before ablation of largest follicle between 25 and 29mm) and hCG+ABL- $\geq 30\text{mm}$  (n=8; 2500UI of hCG administered 24h before ablation of largest follicle  $\geq 30\text{mm}$ ). At the day dominant follicle achieved the defined diameters (F $\geq 25\text{mm}$  or F $\geq 30\text{mm}$ ), 24 hours were counted until ablations were done in the groups ABL-F $\geq 25\text{mm}$  and ABL-F $\geq 30\text{mm}$  or 2500UI of hCG was intravenously administered in the groups hCG+ABL-F $\geq 25\text{mm}$  and hCG+ABL- $\geq 30\text{mm}$  and

follicle ablation was done 24 hours later. Only the largest follicle was ablated except when co-dominance was detected (less than 5mm of difference between the two largest follicles), in these cases, both follicles were ablated.

### 2.1. Follicular ablation

Follicle ablations were done transvaginally using a multifrequential (5 to 10 Mhz) convex-assay transducer attached to Mindray DP3300 ultrasound machine. Mares were mildly sedated with Detomidine (0,002 mg/kg, i.v.; Dormiun V<sup>®</sup>, Agener União) and Acepromazine (0.03mg/Kg, i.v.; Acepran<sup>®</sup>, Vetnil). Hyoscine n-butyl bromide (butylscopolamine, 0.2mg/Kg, i.v.; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was given to relax the rectum. An 18-gauge needle with an approximate 7-cm length (Watanabe tecnologia aplicada) connected to a vacuum pump with flexible tubing were used to puncture and aspirate (approximately 300 mm Hg) the contents of the dominant follicles. At least three perforations were done to avoid follicle refilling. Aspiration was defined by the visual collapse of a targeted follicle after evacuation. Immediately before and about 24 h after the ablation procedure, mares received flunixin meglumine (1mg/Kg, i.v.; Banamine<sup>®</sup>, Shering-Plough Animal Health) to reduce any potential discomfort and /or inflammation.

### 2.2. Luteal formation evaluation (B and Doppler modes ultrasonography)

Daily ultrasound evaluation of the ovaries started 24h after follicular ablation or ovulation and was maintained until day seven (D0 = ovulation or ablation). Area and hemodynamic alterations of the CLs and the structures formed from the aspirations were evaluated by B mode and power Doppler ultrasonography.

The entire CL or structure formed from the ablations were scanned in a slow continuous motion. Real-time B-mode/color-flow images of the continuous scans were captured with an 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. (2007).

The percentage of the CLs or structures formed from ablation with color-flow signals was determined by a still image of a section selected and that appeared to represent maximum area and optimal area of color-flow signals. The CL and structure total area was determined from the same still image 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 were determined using the Image J software as described (Ginther et al., 2004). Total area were also determined by the same software.

### 2.3. Blood samples

Blood samples were daily collected through jugular venipuncture into heparinised tubes, beginning one day before ovulation (control group) or just before ablation on D0 (ABL-F $\geq$ 25mm, ABL-F $\geq$ 30mm, hCG+ABL-F $\geq$ 25mm and hCG+ABL-F $\geq$ 30mm) and until D7. Blood samples were centrifuged and serum samples were stored at -20°C for P4 radioimmunoassay (RIA) evaluation.

### 2.4. Statistical analysis

Before analysis, P4 data were converted to log to achieve normality. For the same reason, CLs areas (mm<sup>2</sup>) were converted to square root and variables expressed in proportions were converted to arcsen.

Models for repeated measures (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) were used to compare mean plasma P4, CL area, area of colored signals, and percentage of colored areas between groups and days. 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. A 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.

Fisher's test (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) was used to compare the proportion of animals that responded.

Simple linear regression models (PROC GLM, SAS Institute, 2009) were used to assess associations between diameter of the ablated follicle and maximum plasmatic P4, total area of CL and plasmatic P4, area of colored signals and plasmatic P4 and percentage of area of colored signals and plasmatic P4.

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

### 3. Results

Effects of treatment, day and a day treatment interaction was detected ( $P < 0.05$ ) for plasma p4. Differences between groups within each day and between days within a group are shown in Figure 1.

When the non-responders mares were excluded from analysis, in other words, when only those who achieved P4 plasma concentrations  $\geq 2$ ng/ml between D0 and D7 were used, the groups in which the mares underwent ablation did not differ from the control group (spontaneous ovulation). However, differences were found in plasma P4 among groups ( $P < 0.05$ ) at day 7: control group ( $n = 13$ , mean = P4 14.15 ng / mL) showed higher ( $P < 0.05$ ) plasma concentrations than groups ABL-F $\geq 30$ mm ( $n = 9$ ; P4 mean = 7.66 ng / ml) and hCG+ABL-F $\geq 25$ mm ( $n = 6$ ; P4 mean = 5.50 ng / mL). Control group tended to have higher ( $P = 0.06$ ) plasma concentrations of P4 than group hCG+ABL-F $\geq 30$ mm ( $n = 6$ , mean = P4 7ng/mL). The group ABL-F $\geq 25$ mm was not used in this analysis because the number of samples too after the exclusions ( $n = 2$ ).

It was only possible to evaluate the area of the CL or of the structure formed from ablation, as well as its vascularity, in mares that responded to aspiration and achieved plasma concentrations  $\geq 2$ ng/ml. This occurred once all non-responders mares did not form a structure similar to a CL, and neither color signals were detected by Doppler ultrasonography.

When ablation groups with (hCG+ABL-F $\geq 25$ mm and hCG+ABL-F $\geq 30$ mm) or without (ABL-F $\geq 25$ mm and ABL-F $\geq 30$ mm) hCG injection were added, the total area of the structure formed by CL or from the ablation do not differ among groups, but during the day in each group (Figure 3A). The Doppler

ultrasound evaluation allowed the detection of differences in vascularity between groups, but these differences did not depend on the time of analysis. The control group tended to be higher than the ablation groups with no previous hCG injection ( $P = 0.07$ ) and was higher than the ablation groups with previous hCG injection ( $P < 0.05$ ), but differences between association of ablation groups with and without hCG were not detected (Figure 2). The proportion of vascularity by the total area varied among groups and days (Figure 3).

The associations demonstrated that there is a weak relationship between total area of the CL or structure formed from the ablation and plasma P4 since the P4 continues to increase while the area is still more stable. For the association between area of colored signals, a positive relationship was found, Pearson correlation was 0.72, Spearman (linear correlation coefficient) was 0.65 (both  $P < 0.001$ ) and the linear regression analysis indicates that 52% of the vascularity influences P4. As a result, the association between percentage of colored area over the total area detected a moderate correlation ( $R^2 = 0.36$ ).

About the functionality of the structure formed from the ablation, 43% (3/7) mares group ABL-F $\geq$ 25mm, 77% (10/13) mares ABL-F $\geq$ 30mm, 75% (6/8) mares hCG+ABL-F $\geq$ 25mm and 67% (6/9) group of mares hCG+ABL-F $\geq$ 30mm reached plasma P4  $\geq$  2ng/mL. When compared to the control group, only the group ABL-F $\geq$ 25mm had lower ( $P < 0.05$ ) number of mares that responded to ablation, whereas no differences were found between ablation groups  $\geq$  25 and  $\geq$  30, or between groups in which hCG was administered 24 hours before the aspiration of follicles with diameter  $\geq$  25 and  $\geq$  30.

#### 4. Discussion

As previously reported by other authors (Hayna et al., 2006; Hinrichs et al., 1991; Montechiesi, 2009) and found in the present work, the aspiration of follicles  $\geq$  25mm promotes luteinization of follicular cells leading to an increase in plasma concentrations of P4 compatible to diestrus ( $\geq$  2ng/ml). As expected, in the control group 100% (13/13) of animals were responders while in ablation groups without (ABL-F $\geq$ 25mm + ABL-F $\geq$ 30mm) and with hCG injection (hCG+ABL-F $\geq$ 25mm + hCG+ABL-F $\geq$ 30mm), 65% (13/20) and 71% (12/17)

were responders, respectively. These findings showed a higher number of responders mares than those reported by Mozzaquatro et al. (2010) who found that only one of six follicles with diameters between 25 and 30mm, one of four between 30 and 35mm and none of five  $\geq 35$ mm were capable of luteinizing. In these mares, a greater P4 concentration was detected on D0 (Day of aspiration). This fact shows the importance of the prostaglandin injection prior to ablation, probably because the induction of luteolysis reduce circulating concentrations of P4 and allow endogenous LH surge.

One of the major changes during luteinization process is the change in cellular response to external signals enabling luteal cells response to a new group of hormones. A major external signals is the LH surge which promotes changes in the expression of several receptors (Stocco et al., 2007) and is directly involved in the process of luteogenesis.

However, beyond hormonal characteristics, the category of ablated follicles might be crucial for the structure response. The findings of this study show that ablated follicles with diameters between 25 and 29mm and without prior application of 2500 IU hCG (ABL-F $\geq 25$ mm) had a lower capability to become functional when compared to LCs formed from spontaneous ovulation. Only 43% (3/7) of animals evaluated in the ABL-F $\geq 25$ mm group reached plasma P4  $\geq 2$ ng/ml.

The plasma P4 results show that while in the control group its values are higher than 2ng/ml from D2 and D7 and do not differ among them, for the other ablation groups, with or without prior application of hCG, concentrations greater than 2ng/ml were only reached on D5. Although no differences were detected between groups when the non-responder mares (plasma P4 <2ng/ml) were excluded from analysis, mares that formed luteal structures maintained the same pattern only reaching concentrations greater than 2ng/ml on D5.

This indicates that, as already reported by previous studies (Montechiesi, 2009; Mozzaquatro et al. 2010), the luteinized structures formed from ablation of follicles  $\geq 25$  mm require a longer time to complete luteinization, which can be observed by the necessity of a long period such as four to seven days until they reach concentrations similar to those of the control group.

Studies show that transformation of granulosa cells into luteal cells occurs within hours (Stocco et al., 2007) and luteinization is complete until the third day after ovulation (Niswender & Nett, 1993), which is consistent with findings for control group. However, the results show a possible delay in the process of luteinization for ablated follicles, which agrees with previous results (Montechiesi, 2009). According to Niswender (2000), P4 serum concentrations depend on the amount of steroidogenic tissue, and blood perfusion in this tissue. The amount of steroidogenic tissue is dependent on the number and size of luteal cells, which increase during the luteal development.

The B-mode and Doppler ultrasound can be an interesting tool in the evaluation of the development of the luteinized structure and its functionality. In mares that did not respond to ablation, the formation of a structures similar to a CL when the B mode ultrasound was used was not detected, as well as the increase in vascularization could not be observed by Doppler mode.

Note that there is an increase in both the area and in the vascularization of the CL and the structures formed from ablation, however, is in the CL where the greater increase in vascularity and probably less changes in the area when comparing the first and last days of evaluation (Figure 3) were seen. In general, the vascularization of all CLs is greater than the structures formed in ablation groups, the same could not be observed for the total area. Reflecting this finding, the percentage of colored area over the total area increased significantly in the control group and not in other groups. Yet, vascularization also observed in the ablation groups showed that the procedure also influenced on one of the most important factors involved in luteogenesis: the angiogenesis.

As previously mentioned, neovascularization is essential for supplementation required for the biosynthesis of P4, and the secretion of sex steroids by luteal cells (Acosta & Miyamoto, 2004). Each luteal cell is directly in contact with many capillaries, giving the CL feature of being the tissue with the highest rates of blood flow in the body (Stocco et al., 2007).

The evaluation of the total area by B mode ultrasound did not show to be an efficient method of determination of CL and structure functionality, to be precise, to inform about the production of P4. Color-Doppler ultrasound, on the other hand, proved to be a more efficient evaluation for this purpose. By this technique it was possible to detect animals that did not respond and does not produce P4 even before hormonal RIA assays were done. Still, for the mares that responded, there is a positive relationship between plasma P4 and vascularized area that showed that 52% of the vascularized area influenced on the current P4.

The results and relationships presented for changes in area and vascularization in the present study are in agreement with the findings previously described by Ginther et al. (2007) when the hemodynamics of the CL during the estrous cycle was analyzed. The authors found that CL area also increased but not as markedly as the area of blood perfusion, and hemodynamics analysis showed to be a more decisive feature of the functionality of the CL (Ginther et al. 2007).

Two different hypothesis may explain the stimulation of the incise luteinisation of granulosa cells after dominant follicle ablation: 1 - taking into consideration the findings of Ginther et al. (2007) that showed the negative effect of steroid hormones over the release of gonadotropins, mechanical removal of follicular fluid might lead to a sharp reduction in the concentrations of E2 that could be relevant in the fall of plasma concentrations and thus induce the increased release of LH by the pituitary, or 2 - aspiration of follicular fluid, and as reported by Nekola & Nalbandov (1971), removes factors produced by the oocyte and are soluble in this fluid that act preventing follicular luteinization. It is known that factors released by the oocyte prevent mRNA expression of LH receptors (Eppig et al. 1997). Also, it has been demonstrated that the removal of an oocyte from an *in vitro* culture medium containing granulosa cells promotes luteinization while maintaining the oocyte inhibits this process (Li et al. 2000). However, for the process to be fully elucidated, further studies should be performed.

The hCG application was important for improving the luteinization of the granulosa cells specially in follicles from 25 to 29mm. While the mares that received 2500UI of hCG 24h previous to ablation of follicles from 25 to 29mm reached P4 plasma concentrations similar to those detected in the control group on D4, the mares that were not subject to prior administration of hCG and presented the same category of ablated follicles have not yet achieved the similarity on D7. As a support for these findings, and as previously reported (Ferreira-Dias et al. 2006), LH hormone is responsible for mediating the process of luteinization of the granulosa cells constituting the wall of the preovulatory follicle even before ovulation.

The hCG promotes a significant expansion on the granulosa cell layer in mares (Stock et al. 2002); stimulates the expression of VEGF and its receptors and angiopoietins (Fraser et al. 2005) and alters the expression of receptors (Stocco et al. 2007). All these are similar changes to those caused by LH preovulatory surge, which together with the interruption of the contact between follicular cells and factors released by oocyte and presented in the follicular fluid, were likely responsible to inducing the start of luteinization of mural granulosa cells.

In conclusion, ablation of follicles  $\geq 25$ mm to remove follicular fluid days after prostaglandin injection is efficient on the induction of the granulosa cells luteinisation. The ablation allows the formation of luteinic structures that are capable to increase plasma P4 to concentrations similar to diestrous ( $\geq 2$ ng/mL). However, these structures need more time to complete luteinisation than the CL. Follicle diameter influence on the response to ablation, follicles between 25 and 29mm show a lower capability of becoming functional but this problem may be solved with an intravenous injection of hCG 24h previous to aspiration. The hemodynamic evaluation by color-Doppler ultrasound is an efficient tool to detect the functionality of the structure formed from follicles ablation and may reasonably indicate the P4 plasma concentrations.

## References

Acosta, T. J., Miyamoto, A. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*. 82, 127-40.

Alvarenga, M.A., McCue, P.M., Franz, L.C. 1999. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. *Theriogenology*. 51 (1), 431.

Belin, F., Coudet, G., Duchamp, G., Gérard, N. 2000. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biology of Reproduction*. 62, p. 1335-43.

Bergfelt, D.R., Meira, C., Fleury, J.J., Fleury, P.D.C., Dell'Aqua, J.A., Adams, G.P., 2007. Ovulation synchronization following commercial application of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 68, 1183-91.

Bogh, I.B., Hoier, R., Synnøstvedt, B., Greve, T. 2000. Steroid concentration in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. *Theriogenology*. 54,877-88.

Bracher, V., Parlevliet, J., Fazeli, A.R., Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Dieleman, S.J., Taverne, M.A.M. Colenbrander, B. 1993. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 15 (Suppl.), 75-78.

Eppig, J.J., Wigglesworth, K., Pendola, F., Hirao, Y. 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 56, 976-84.

Ferreira-Dias, G., Bravo, P.P., Mateus, L., Redmer, D.A., Medeiros, J.A. 2006. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*. 30, 247-59.

Fraser, H.M., Bell, J., Wilson, H., Taylor, P.D., Morgan, K., Anderson, R.A., Duncan, W.C. 2005. 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*. 90, 427-34.

Ginther, O.J., Beg, M.A., Gastal, M.O., Gastal, E.L. 2004. Follicle dynamics and selection in mares. *Animal Reproduction*. 71, 45-63.

Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Utt, M.D., Beg, M.A. 2004. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*. 99, 213-20.

Ginther, O.J., Utt, M.D., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O. 2007. Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. 2007. *Biology of Reproduction*. 77, 543-50.

Handler, J., Schonlied, S., Hoppen, H.O., Aurich, C. 2007. Influence of reproductive stage at PRID™ insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Animal Reproduction Science*. 97, 382-93.

Hayna, J.T., Madill, S., Roser, J.F., Troedsson, M.H.T. 2006. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. *Animal Reproduction Science*. 94, 355-6.

Hinrichs, K., Rand, W.M., Palmer, E. 1991. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentration in the mare. *Biology of Reproduction*. 44, 292-8.

Montechiesi, D.F. 2009. Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de P4 plasmática em éguas cíclicas. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Mozzaquatro, F.D., Verstegen, J.P., Douglas, R.H., Troedsson, M.H.T., DeLaCorte, F.D., Silva, C.A.M., Rubin, M.I.B. 2010. *Animal Reproduction Science*. 119, 56-62.

Nekola, M.V., Nalbandov, A.V. 1971. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biology of Reproduction*. 63, 1149-56.

Niswender, D., Nett, T.M. Luteal phase. In: VOSS, J. L.; McKinnon, A. O. 1993. (Eds.). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger. 172-5.

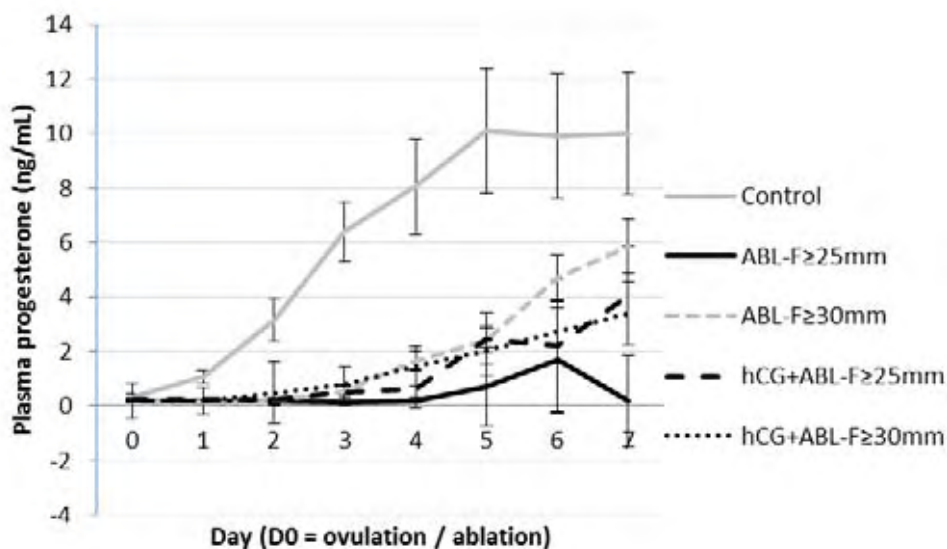
Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J.j., Rollyson, M.K., McIntush, E.W. 2004. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Hysiology Reviews*. 80, 1–29.

Nogueira, M.F.G., Buratini, J.R., Price, C.A., Castilho, A.C.S., Pinto, M.G.L., Barros, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. 2007. *Molecular Reproduction and Development*. 74, 680-6.

SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*. 28, 117-49.

Stock, A.E., Bouchard, N., Brown, K., Spicer, A.P., Underhill, C.B., Doré, M., Sirois, J. 2002. Induction of Hyaluronan synthase 2 by human chorionic gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Endocrinology*. 143 (11), 4375-84.



	0	1	2	3	4	5	6	7
Control	0,3Aa	1,1Ab	3,2Ac	6,4Ad	8,0Ae	10,1Ae	9,9Ae	10,0Ae
ABL-F $\geq$ 25mm	0,2Aa	0,2Aa	0,2BCa	0,1Ba	0,2BCa	0,7Ba	1,7BCa	0,2BCa
ABL-F $\geq$ 30mm	0,2Aa	0,1Aa	0,2BCa	0,6Bb	1,7ABCc	2,4Bc	4,7ACc	5,9ACc
hCG+ABL-F $\geq$ 25mm	0,3Aa	0,2Aa	0,2BCa	0,5Ba	0,6ABCac	2,5ABbc	2,2ACb	4,1ACb
hCG+ABL-F $\geq$ 30mm	0,2Aa	0,2Aa	0,5ACa	0,8Ba	1,5ACa	2,0Ba	2,7BCa	3,4ACa

Figure 1 – Plasma P4 concentrations during days 0 to 7 of groups: control (n=13), ABL-F $\geq$ 25mm (n=8), ABL-F $\geq$ 30mm (n=13), hCG+ABL-F $\geq$ 25mm (n=9) and hCG+ABL-F $\geq$ 30mm (n=8). Different lowercase letters (a, b, c) indicate statistical differences among days within a group, and uppercase letters (A, B, C) indicate statistical differences among groups within a day.

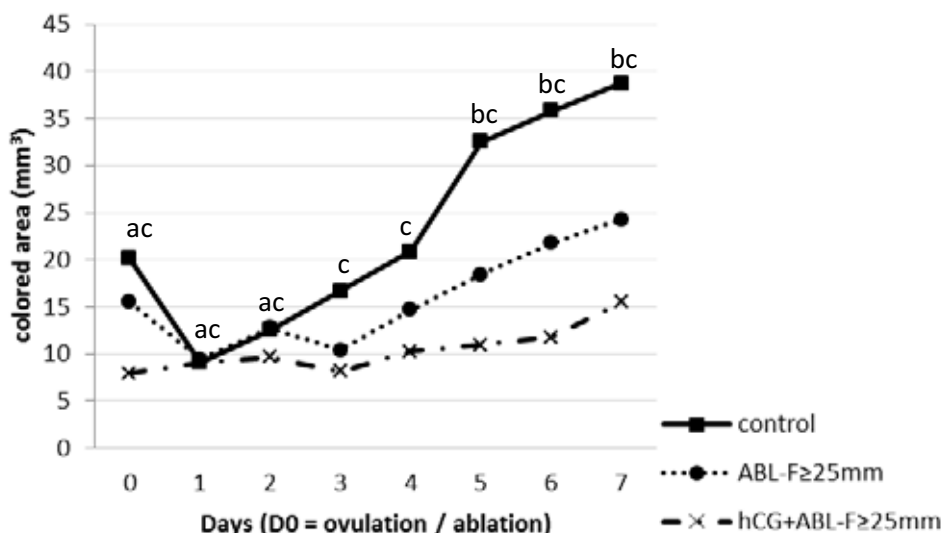


Figure 2 – CL or structures formed from follicle ablation vascularity (Mean ± SEM) during different moments (D0 to D7) of the associated groups: ABL-F≥25mm + ABL-F≥30mm = ABL-F≥25mm and hCG+ABL-F≥25mm + hCG+ABL-F≥30mm = hCG+ABL-F≥25mm. Differences among days within a groups are represented by different lowercase letters (a, b, c).

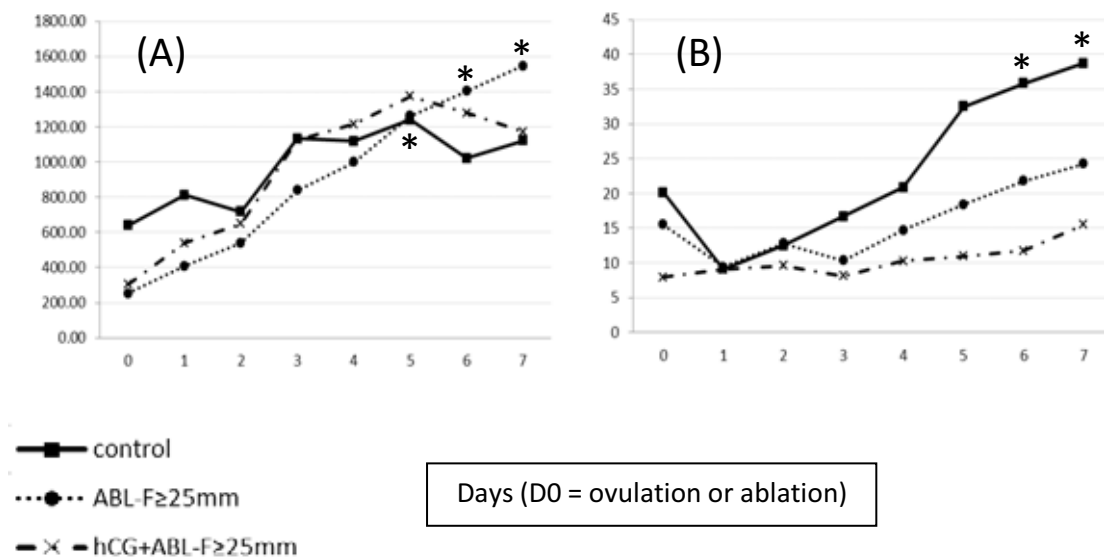


Figure 3 – luteal area (A) or percentage of colored area (B) of CL or structures formed from follicle ablation vascularity (Mean ± SEM) during different moments (D0 to D7) of the associated groups: ABL-F≥25mm + ABL-F≥30mm = ABL-F≥25mm and hCG+ABL-F≥25mm + hCG+ABL-F≥30mm = hCG+ABL-F≥25mm. \* indicates differences among days within the same group (P<0.05).

## 9.2. Normas da revista

Animal Reproduction Science

## GUIDE FOR AUTHORS

### INTRODUCTION

#### *Types of Paper*

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

*Original Research Papers* should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan  
University of Melbourne  
Veterinary Clinical Centre  
250 Princess Highway  
VIC 3030 Werribee, Australia  
k.macmillan@unimelb.edu.au

#### **Contact details for submission**

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

#### **Page charges**

This journal has no page charges.

### BEFORE YOU BEGIN

#### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### ***Policy and ethics***

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU* for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

### ***Conflict of interest***

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### ***Submission declaration***

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

### ***Authorship***

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

### ***Changes to authorship***

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### ***Copyright***

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

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

forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### ***Retained author rights***

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### ***Role of the funding source***

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

### ***Funding body agreements and policies***

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

### ***Language and language services***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### ***Submission***

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

### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anirep>.

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### ***Article structure***

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

### *Introduction*

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

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

### *Material and methods*

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

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

A combined Results

and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

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

### ***Essential title page information***

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

### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

**Keywords**

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

**Acknowledgements**

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

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

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

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

**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.

**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 wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### *Table footnotes*

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

## **Artwork**

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 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 finalised, 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 optimised 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.

***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.

### *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.

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

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

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

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

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

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

***Video data***

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

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

### ***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. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs 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>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>