

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

THADEU DE CASTRO

**FLUXO SANGUÍNEO LUTEAL E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LH E
FSH APÓS ADMINISTRAÇÃO DE GnRH DURANTE A FASE LUTEAL EM
ÉGUAS**

**ALEGRE
2017**

THADEU DE CASTRO

**FLUXO SANGUÍNEO LUTEAL E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LH E
FSH APÓS ADMINISTRAÇÃO DE GnRH DURANTE A FASE LUTEAL EM
ÉGUAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em reprodução e nutrição animal.

Orientador: Prof^o. Dr. Fabrício Albani Oliveira.
Coorientador: Prof^o. Dr. Luis Fonseca Matos.

ALEGRE

2017

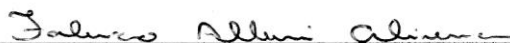
THADEU DE CASTRO

**FLUXO SANGUÍNEO LUTEAL E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LH E
FSH APÓS ADMINISTRAÇÃO DE GnRH DURANTE A FASE LUTEAL EM
ÉGUAS**

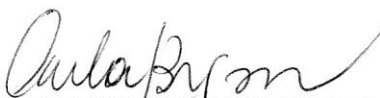
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovado em 15 de fevereiro de 2017.

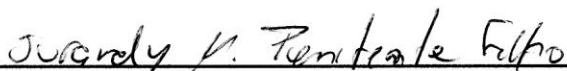
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Fabrício Albani Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr.ª Carla Braga Martins
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. Juracy Mauro Penitente Filho
Universidade Federal de Viçosa

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre comigo, me guiando pelo melhor caminho.

À minha família, por sempre me ajudar a tomar as decisões e me estimular ao estudo científico. Ao meu pai Jarbas, à minha mãe Maria de Lourdes e aos meus irmãos Chirlei e Tiago.

À Eutheria Foundation e à University of Wisconsin Madison, por disponibilizar o espaço físico e os animais para o desenvolvimento do experimento.

Ao Professor Dr. Oliver Joseph Ginther, pelo delineamento do projeto e aos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Luís Fonseca Matos, pela coorientação e por me indicar à Eutheria Foundation.

Ao meu orientador Dr. Fabrício Albani Oliveira, pelos ensinamentos e orientação.

Aos colegas de trabalho Mohammed Aziz Siddiqui, Julia Maria Baldrighi, Carolina Antoniazzi Wolf e Vanda Santos, pelos ensinamentos, por proporcionar um ideal ambiente de trabalho e pela ajuda na minha comunicação em inglês no início do meu trabalho.

À CAPES, pela ajuda financeira durante a realização deste projeto.

Aos membros da banca, Dr. Jurandy Mauro Penitente Filho e Dr^a. Carla Braga Martins, pelo apoio e colaboração, sendo prestativos em todas os momentos.

Ao Professor Dr. José Oliveira de Carvalho Neto, pelas orientações na condução deste trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e Engenharias – CCAE, pela oportunidade de realização do mestrado.

Enfim, o meu sincero agradecimento a todos que, de alguma forma, compartilharam desta caminhada.

“Quando você quer alguma coisa, todo o universo conspira para que você realize o seu desejo”.

Paulo Coelho

RESUMO

CASTRO, THADEU. **Fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de LH e FSH após administração de GnRH durante a fase luteal em éguas.** 2017. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Objetivou-se avaliar o efeito de uma única dose de GnRH por égua sobre as concentrações plasmáticas de LH, FSH, e progesterona (P4) e o fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) e do ovário ipsilateral ao CL. Os animais foram divididos em três grupos, conforme a dose de GnRH; 0 (n = 9), 100 (n = 8) ou 300 µg (n = 9), esta foi administrada no Dia 10 do ciclo estral (Dia 0 = ovulação). As mensurações das concentrações hormonais e do fluxo sanguíneo foram realizadas na hora 0 (momento do tratamento), aos 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após o tratamento. O fluxo sanguíneo da artéria ovariana foi avaliado por ultrassonografia Doppler colorido por meio do modo espectral antes da sua entrada no ovário. A percentagem do fluxo sanguíneo do CL foi calculada por imagens de vídeo com Doppler colorido em tempo real por um operador sem conhecimento da identidade da égua, hora e dose do tratamento. A concentração de LH e FSH aumentou ($P < 0,05$) aos 15 minutos e houve uma diminuição gradual ($P < 0,05$) entre os 30 minutos e a hora 6 após o tratamento. A concentração de P4 não foi alterada pelo tratamento. A resistência ao fluxo sanguíneo diminuiu entre as horas 0 e 1, entretanto a redução foi maior ($P < 0,05$) na dose de 100 µg em comparação a dose de 300 µg. A percentagem de CL com sinais de fluxo sanguíneo aumentou ($P < 0,05$) entre as horas 0 e 1, sem diferença significativa entre as doses de 100 e 300 µg de GnRH. Os resultados suportam a hipótese que o GnRH aumenta a concentração de LH, perfusão vascular no CL, perfusão vascular do ovário ipsilateral ao CL e o fluxo sanguíneo durante a fase lútea. No entanto, a concentração de P4 não foi alterada.

Palavras-chave: Fluxo sanguíneo. GnRH. Ultrassonografia Doppler colorido

ABSTRACT

CASTRO, THADEU. **Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares.** 2016. 61 p. Qualificação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2016.

A study was performed on the effect of a single dose per mare of 0 (n = 9), 100 (n = 8), or 300 (n = 9) of GnRH on Day 10 (Day 0 = ovulation) on concentrations of LH, FSH, and progesterone (P4) and blood flow to the CL ovary. Hormone concentration and blood flow measurements were performed at hours 0 (hour of treatment), 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 6. Blood flow was assessed by spectral Doppler ultrasonography for resistance to blood flow in an ovarian artery before entry into the CL ovary. The percentage of the CL with color Doppler signals of blood flow was estimated from videotapes of real-time color Doppler imaging by an operator who was unaware of mare identity, hour, or treatment dose. Concentrations of LH and FSH increased ($P < 0.05$) at hour 0.25 and decreased ($P < 0.05$) over hours 1 to 6; P4 concentration was not altered by treatment. Blood flow resistance decreased between hours 0 and 1, but the decrease was greater ($P < 0.05$) for the 100-mg dose than for the 300-mg dose. The percentage of CL with blood flow signals increased ($P < 0.05$) between hours 0 and 1 with no significant difference between the 100- and 300-mg doses. The results supported the hypothesis that GnRH increases LH concentration, vascular perfusion of the CL ovary, and CL blood flow during the luteal phase; however, P4 concentration was not affected.

Key-words: Blood flow. Color-Doppler Ultrasonography. GnRH

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Órgãos e suprimento vascular do sistema reprodutivo da égua.....	17
Figura 2 -	Concentração de P4, fluxo sanguíneo e área do CL durante ciclo estral.....	21
Figura 3 -	Ultrassonografia Doppler colorida, modo espectral. Avaliação do índice de resistência vascular.....	26
Figura 4 -	Exame ultrassonográfico Doppler do Corpo Lúteo: modo-B (A), Color-Flow (B) e Power-Flow (C).....	28
Figura 5 -	Éguas em baia coletiva.....	30
Figura 6 -	Avaliação ultrassonográfica.....	31
Figura 7 -	Médias \pm erro padrão da média da concentração de LH e FSH após o tratamento com 0 (n = 9), 100 (n = 8) e 300 μ g (n = 9) de GnRH. Efeito do grupo tratamento (G) e hora (H) e a interação do grupo e hora (GH), que foram significativos são mostrados. Letras diferentes em cada hora significam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos. O círculo indica (P < 0,05) o início de um aumento ou diminuição na concentração de LH ou FSH.....	34
Figura 8 -	Médias \pm erro padrão da média de concentração de progesterona (P4) após o tratamento com 0 (n = 9), 100 (n = 8) e 300 μ g (n = 9) de GnRH. O efeito da hora (H) é demonstrado. Não houve efeito do tratamento do grupo ou interação, e todos os grupos foram unidos (gráfico inferior). O círculo indica (P < 0,05) o início de um aumento ou diminuição na concentração de P4.....	35
Figura 9 -	Médias \pm erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria ovariana antes da entrada no ovário após o	

tratamento com 0 (n = 9), 100 (n = 8) e 300 µg (n = 9) de GnRH. O efeito do tratamento (G), hora (H) e a interação do tratamento e hora (GH) que foram significativos para RI, são demonstrados no gráfico superior. O percentual de mudança em RI no gráfico inferior. Letras diferentes em cada hora significa diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos. O círculo indica (P < 0,05) o início do aumento ou diminuição do RI..... 36

Figura 10 - Médias ± erro padrão da média da porcentagem de sinais do fluxo sanguíneo do CL após o tratamento com 0 (n = 5), 100 (n = 5) e 300 µg (n = 5) de GnRH. Efeito da hora (H) e a interação do tratamento e hora (GH) são por porcentagem do CL com sinais Doppler (gráfico superior) e porcentagem de mudança de sinais Doppler a partir da hora 0 (gráfico inferior). Não houve diferença entre os grupos 100 e 300 µg e o resultado dos dois grupos foi unido para comparar a mudança no percentual a partir da hora 0 nos grupos 100 e 300 µg em relação ao grupo controle (0 µg) (gráfico inferior). O círculo indica diferença estatística (P < 0,05) no início do aumento ou da diminuição na porcentagem do CL com fluxo sanguíneo. Letras diferentes na hora significa diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos..... 38

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

bu: Ramo da artéria uterina

°C: Graus centígrados

CV: Coeficiente de variação

cvc: Veia cava caudal

CL: Corpo lúteo

Cm: Centímetro

dca: Artéria circunflexa profunda

EDV: Velocidade diastólica final

eia: Artéria ilíaca externa

FSH: Hormônio folículo estimulante

ia: Artéria ilíaca interna

ipa: Artéria pudenda interna

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: Gonadrofina coriônica humana

LH: Hormônio luteinizante

MHz: Mega Hertz

ng: Nanograma

oa: Artéria ovariana

P4: Progesterona

PGF2 α : Prostaglandina

PI: Índice de pulsatilidade

PSV: Velocidade de pico sistólico

RI: Índice de resistência

TAMV – média das velocidades máxima

ua: Artéria uterina

uma: Artéria umbilical

uboa: Ramo uterino da artéria ovariana

ubva: Ramo uterino da artéria vaginal

uov: Veia uteroovariana

va: Artéria vaginal

μ g: Micrograma

α : Alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 - Esquema ilustrativo das coletas de dados: avaliações ultrassonográficas e amostras de sangue.....	31

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Anatomia ovariana	16
2.2 Ciclo estral equino.....	17
2.3 Corpo Lúteo (CL).....	18
2.4 Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH).....	22
2.5 Efeito do LH na fase luteal	23
2.6 Efeito do LH e do FSH na vascularização do aparelho reprodutivo	24
2.7 Ultrassonografia	24
2.7.1 Ultrassonografia Doppler	25
2.7.2 Modo espectral	26
2.7.3 Modo Doppler colorido.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Localização do experimento.....	29
3.2 Animais e grupos de tratamentos.....	29
3.3 Ultrassonografia e amostras de sangue.....	30
3.4 Análise hormonal	32
3.5 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS	45
ANEXO	54
ANEXO A - Trabalho publicado na revista Theriogenology	55

1. INTRODUÇÃO

A indústria do cavalo cresceu quase 12% ao ano nos últimos 10 anos. Em 2006, eram R\$ 7,5 bilhões de faturamento bruto anual, atingindo R\$ 16 bilhões em 2015. Além disso, o complexo do agronegócio relacionado à equideocultura gera 607.329 empregos diretos e cerca de 2,4 milhões de empregos indiretos, totalizando mais de 3 milhões de empregos (LIMA; CINTRA, 2015).

A profissionalização e o crescimento da equideocultura criam a necessidade de cada vez mais utilizar as biotecnologias da reprodução com o objetivo de aumentar a produção e facilitar o manejo (LIMA et al., 2012). Assim, o conhecimento e manipulação dos eventos reprodutivos têm-se tornado importantes para aplicação com sucesso das biotecnologias da reprodução.

Diversas biotecnologias têm sido utilizadas para auxiliar o melhor entendimento da fisiologia reprodutiva, tais como a ultrassonografia. Um dos eventos amplamente estudados está relacionado ao corpo lúteo (CL).

A capacidade de recuperação do CL equino é surpreendente. O ressurgimento natural da área e função do CL primário ao redor do dia 35 (dia 0 = ovulação), após a ovulação em éguas gestantes é bem descrito e documentado. Sendo o ressurgimento do CL durante a gestação em éguas associado com as propriedades luteotróficas da gonadotrofina coriônica equina (eCG), proveniente das criptas endometriais da placenta (BERGFELT; PIERSON; GINTHER, 1989).

Além disso, a disponibilidade de imagens transretais por meio da ultrassonografia resultou em alguns relatos que descrevem o ressurgimento do CL primário, associado com aumento nos níveis de progesterona (P4) e área do CL. Todos os relatos foram associados a um detectável ou esperado pico de LH (GINTHER; SANTOS, 2015). Sugerindo possível efeito positivo do LH sobre as células lúteas após o desenvolvimento do CL.

Uma das formas de se avaliar a atividade do CL é por meio da quantidade circulante de P4 e da vascularização sanguínea do CL. Em que, quanto maior o nível circulante de P4 e maior vascularização sanguínea do CL, maior a atividade do CL (GINTHER, 1992).

Um hormônio responsável pelo controle da biologia reprodutiva em mamíferos é o hormônio liberador de gonadotrofia (GnRH), que estimula a liberação de LH e FSH pela hipófise anterior (JOHNSON; BECKER, 1993). Por sua vez, o LH está relacionado com atividades luteotróficas iniciais (BAIRD, 1992). Uma das formas de se avaliar a função do CL é por meio do fluxo sanguíneo luteal (GINTHER et al., 2007). Portanto, estudos usando GnRH têm sido realizados para avaliar a função do CL (KANITZ et al., 2007; WILLIAMS et al., 2007). Também, estudos relacionados à hemodinâmica do sistema reprodutor equino (WITT et al., 2012). Contudo, pouco se sabe da relação do GnRH com a hemodinâmica na espécie equina. Então, foi pressuposto que o GnRH estimula o aumento das concentrações sanguíneas de LH, e conseqüentemente, o aumento das concentrações de P4, do fluxo sanguíneo do CL e da perfusão vascular do ovário ipsilateal ao CL durante a fase luteal em éguas.

O objetivo com o presente estudo foi avaliar a administração de GnRH (Fertagyl®) durante a fase luteal, antes do início da luteólise, e a associação entre o possível aumento das gonadotrofinas (LH e FSH) e P4 com a dinâmica vascular do ovário e do CL. Foi utilizada ultrassonografia Doppler colorido para determinar a perfusão vascular ovariana, sob a resistência do fluxo sanguíneo da artéria ovariana, antes da sua entrada no ovário ipsilateral ao CL e, para estimar o percentual de sinais de fluxo sanguíneo em toda área do CL.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia ovariana

Os ovários da égua possuem aproximadamente 8 cm de comprimento e 4 cm de espessura. Estão localizados na região sublombar e são normalmente ventrais à quarta ou quinta vértebras lombares, com distância em média de 55 cm do orifício vulvar (GETTY, 1986). A medula ou zona vascular possui localização superficial, enquanto que o córtex ou zona cortical que contém os folículos se encontra no interior do ovário. Esse rearranjo estrutural dos tecidos é responsável pela forma de rins dos ovários, na qual o córtex apresenta acesso limitado apenas pela região de depressão da porção livre ventral, denominada fossa ovulatória (GINTHER, 1992).

Grande parte da superfície do ovário está coberta pelo peritônio. A cobertura peritoneal está ausente na região do hilo do ovário, que é por onde os vasos e nervos penetram. O estroma ovariano é formado por uma rede de tecido conjuntivo onde há numerosos folículos vesiculosos que contém em seu interior fluído folicular e ovócitos em vários estágios de desenvolvimento (GETTY, 1986).

Após a ruptura de um folículo, suas células são transformadas em uma estrutura glandular denominada corpo lúteo (CL). Ambos, folículos e CL, estão distribuídos na parte central do ovário e em direção à fossa da ovulação. O folículo e o CL estão inclusos no interior de um tecido conjuntivo denso ricamente vascularizado que corresponde à medula do ovário em outras espécies (DYCE; SACK; WENSING, 2004).

O suprimento sanguíneo do ovário é realizado pela artéria ovariana (GHINTHER, 2007), tendo sua origem da ramificação da artéria aorta abdominal na parte cranial do ligamento largo do útero (GETTY, 1986), que se divide em ramo uterino e ovariano (DYCE; SACK; WENSING, 2004). O ramo ovariano possui um percurso tortuoso até o ovário onde ainda se divide em vários ramos. O outro ramo passa pela parte cranial do corno uterino onde emite pequenos ramos para a tuba uterina e para o útero, o qual, sofre anastomose com a artéria uterina da artéria ilíaca externa (Figura 1) (GETTY, 1986).

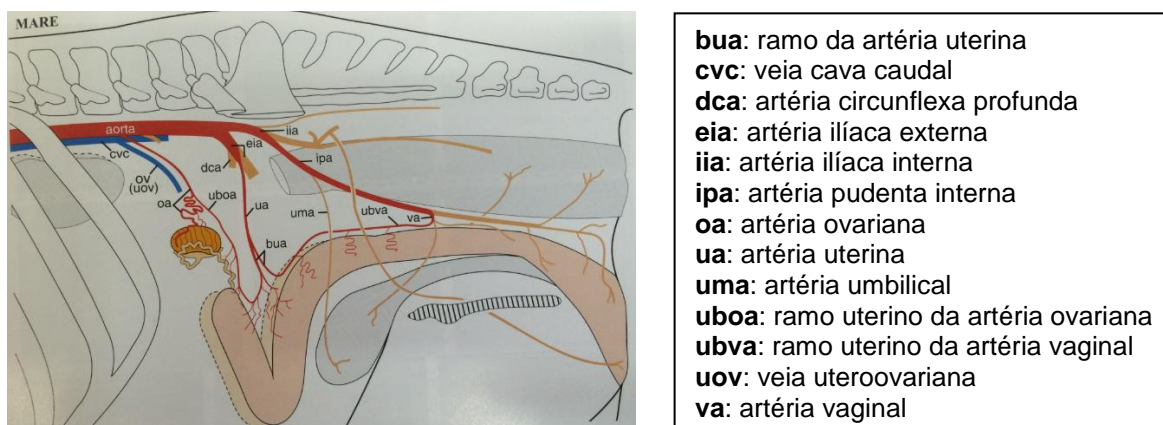


Figura 1. Órgãos e suprimento vascular do sistema reprodutivo da égua. Fonte: Ginther (2007).

A artéria ovariana é mais curta e mais calibrosa na espécie equina, comparando com outras espécies domésticas (GETTY, 1986), permitindo sua identificação sem dificuldade por exame ultrassonográfico (GINTHER, 2007). Além disso, segundo o mesmo autor, a artéria ovariana pode ser detectada na sua origem pela identificação da artéria aorta por meio de um corte longitudinal movendo o transdutor de lado-para-lado. Assim, a artéria ovariana aparecerá sobre a artéria aorta e a veia cava. A identificação da artéria ovariana também pode ser feita no pedículo ovariano.

2.2 Ciclo estral equino

Os equinos são animais considerados poliéstricos sazonais, ou seja, possuem atividade reprodutiva numa determinada época do ano. A estação reprodutiva das éguas ocorre do início da primavera até o final do verão. Os equinos são considerados reprodutores fotoperíodo crescente, pois a atividade reprodutiva é estimulada principalmente pelo aumento do comprimento do dia (SILVA et al., 2015).

Sabe-se que, além do fotoperíodo, fatores como nutrição, condição corporal e temperatura ambiental têm efeito sobre a atividade reprodutiva sazonal (NAGY; GUILLAUME; DAELS, 2000). Portanto, algumas éguas podem apresentar ciclo fértil durante todo o ano, tornando-se poliéstricas anuais (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ciclo estral em éguas é composto de uma fase folicular, ou estro, e uma fase lútea, ou diestro. O intervalo entre duas ovulações consecutivas é de 18 a 22 dias, considerando 21 dias como a média. Onde o estro geralmente possui duração de 6 dias, podendo variar de 4 a 10 dias, dependendo da égua e da raça. O diestro é a fase que compreende o tempo entre a ovulação e a regressão do CL, que normalmente dura 15 dias, podendo variar entre 12 a 18 dias (SATUÉ; GARDÓN, 2013). Essas fases são caracterizadas por modificações internas dos órgãos sexuais e do sistema glandular, assim como alterações comportamentais baseadas nos níveis de estrógeno (E2) e progesterona (P4) (AURICH, 2011). A endocrinologia do ciclo estral envolve um equilíbrio entre hormônios produzidos pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio (SATUÉ; GARDÓN, 2013).

O crescimento folicular durante o ciclo estral depende da concentração circulante de FSH, enquanto a seleção e subsequente dominância folicular estão associadas com a diminuição do FSH e aumento do LH (GINTHER et al., 2008b). Concomitante ao aumento das dimensões do folículo, estradiol continua a aumentar, chegando à sua concentração máxima cerca de 1 a 2 dias antes da ovulação, no momento onde os folículos estão na sua máxima dimensão (DONADEU; PEDERSEN, 2008).

Em éguas, ao contrário da maioria das espécies domésticas em que a ovulação ocorre 24 a 40 horas após um pico ovulatório de LH, a ovulação é observada quando os níveis de LH ainda estão aumentando. Portanto, o pico de LH ocorre ao redor de 48 horas após a ovulação (GINTHER et al., 2008b).

2.3 Corpo lúteo (CL)

O corpo lúteo é uma glândula endócrina que tem como principal função a produção de progesterona, que por sua vez é responsável pela manutenção da gestação e essencial para o controle do ciclo estral por atuar sobre o comportamento sexual da fêmea (WEBB et al., 2002).

A ovulação em éguas ocorre numa região específica do ovário denominada fossa de ovulação, única região do ovário recoberto por epitélio germinativo

(McKINNON et al., 2011). Cerca de 30 a 50% dos CL desenvolvem-se uniformemente, sem a formação de uma cavidade intraluteal, enquanto 50 a 70% dos CL acumulam líquido dentro da cavidade antral, formando os CL hemorrágicos (KURJAK; CHERVENAK, 2008). A formação desses corpos hemorrágicos não é considerada como uma condição patológica e tende a diminuir gradualmente com o tempo devido à organização do tecido luteal e ao processo de coagulação (PIERSON; GINTHER, 1985). A presença de cavidade intraluteal em equinos não interfere na atividade funcional do CL (GINTHER, 1992).

Quando ocorre ruptura do folículo levando à ovulação, o espaço ocupado previamente pelo folículo é invadido por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune (SANCHA et al., 2002), células endoteliais, células da teca interna e células da granulosa, que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia (BERTAN, 2006), dando origem ao CL (MOURA, 2003).

A maioria dos animais domésticos apresentam dois tipos distintos de células esteroidogênicas provenientes do folículo que ovulou, as células da granulosa e da teca interna. Em que, as células da granulosa tornam-se células luteais grandes e as células da teca interna tornam-se células luteais pequenas, sendo que a primeira não é responsiva ao LH e a segunda é responsiva ao LH secretando quantidades expressivas de esteroides (FITZ et al., 1982). Contudo, diferente de outras espécies domésticas, na égua as células da teca interna não contribuem para formação do tecido lúteo (VAN NIEKERK et al., 1975). Esses autores concluíram que as células da teca interna se degeneram e são substituídas por fibroblastos hipertrofiados, tornando as células da granulosa a única responsável pela formação do CL. Sendo este estudo confirmado por outros autores (WATSON; SERTICH, 1990).

A luteogênese tem início durante o processo de maturação folicular, quando o aumento pré-ovulatório de LH resulta na luteinização das células da granulosa (WUTTKE et al., 1998). A luteinização das células da granulosa se conclui três dias após a ovulação e a hipertrofia das células luteais é observado até o nono dia após a ovulação (McKINNON et al., 2011).

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

Nas éguas, o CL é composto por três tipos celulares: células lúteas pequenas, células lúteas grandes e células lúteas endoteliais. Foi demonstrado que as células lúteas grandes sofrem uma diminuição de tamanho entre a metade e o final do diestro e que a proporção de células lúteas pequenas aumenta diretamente com o decorrer dos dias do diestro (WATSON; SERTICH, 1990). Contudo, ambas as células lúteas grandes e pequenas possuem capacidade de realizar esteroidogênese (ALBRECHT; DAELS, 1997).

O LH é considerado uns dos principais hormônios para o crescimento e função do CL (BAIRD, 1992). A liberação de LH a partir da hipófise promove a síntese e secreção de P4 pelo CL em animais domésticos (NISWENDER, 2002). Alguns estudos sugerem uma forte evidência de que em éguas o LH é essencial para a secreção de P4 (BAIRD, 1992; GINTHER; SANTOS, 2014), e que a administração exógena de LH pode ter ação luteotrófica (WATSON, 1995).

Ainda, durante o desenvolvimento lúteo, a grande maioria das células em proliferação são células endoteliais que suportam a angiogênese que ocorre no CL, assegurando a nutrição e as trocas respiratórias das células que o formam, indispensáveis para a sua viabilidade e, permitindo assim, o desenvolvimento de suas funções (YAN et al., 1998).

Em equinos, o fator de necrose tumoral (TNF α) e o óxido nítrico (NO) podem estimular a produção de fatores angiogênicos e a prostaglandina E2 (PGE2), necessários para o desenvolvimento vascular e não-vascular durante a fase lútea inicial (FERREIRA-DIAZ et al., 2011). Os fatores de crescimento (IGF) estimulam o efeito da esteroidogênese e protegem as células da apoptose (WATSON et al., 2005). Segundo Watson et al. (2000), o hormônio do crescimento (GH) é determinante para a estabilidade e manutenção do CL em éguas.

Estudos realizados em éguas demonstraram que o IGF-I e o GH podem atuar na produção de fatores angiogênicos e na secreção de NO (TRAMONTANO et al., 2010), mostrando que esses fatores (IGF-I e GH) podem regular a atividade vascular luteal na espécie equina.

A vascularização do CL possui correlação positiva com a produção de P4, com aumento a partir do dia da ovulação, atingido o pico em média no dia 8, diminuindo até a perda da funcionalidade do CL (Figura 2) (GINTHER et al., 2007b).

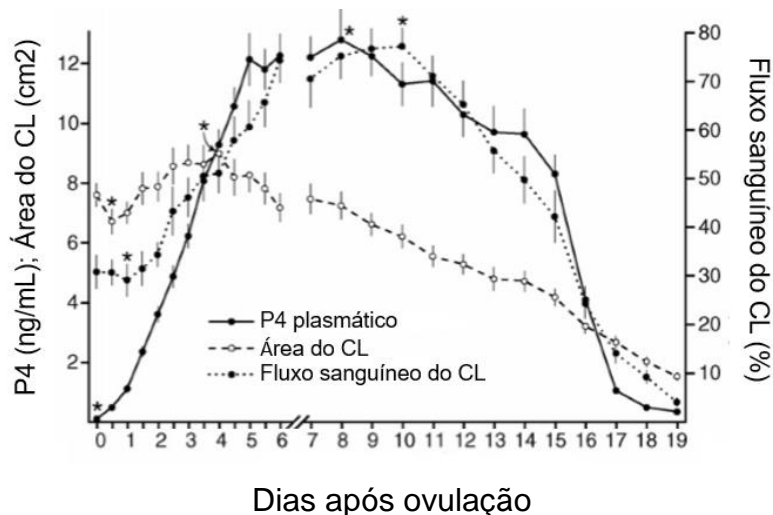


Figura 2. Concentração de P4, fluxo sanguíneo e área do CL durante ciclo estral. Fonte: Adaptado de Ginther et al. (2007b).

A regressão do CL ou luteólise representa uma diminuição na produção de progesterona e do fluxo sanguíneo a partir da secreção de $\text{PGF2}\alpha$ proveniente do endométrio, fazendo com que o CL perca sua integridade funcional e concomitantemente diminua de tamanho, causando uma degradação estrutural irreversível (WEEMS; WEEMS; RANDAL, 2006).

O intervalo dos picos de PGFM (metabólito de $\text{PGF2}\alpha$) durante o processo de luteólise em éguas, ocorre a cada nove horas (GINTHER et al., 2008). Cada pulso de PGFM é temporariamente associado com pulso de ocitocina (GINTHER; BEG, 2009). Demonstrando que a ocitocina em éguas, assim como em outras espécies domésticas, está associada diretamente ao processo de luteólise. Além disso, a luteólise em éguas inicia em média no dia 14 do ciclo estral, sendo o final do luteólise definido quando a P4 atinge uma concentração menor que 1 ng/mL (GINTHER; BEG, 2012a).

Nas éguas, quando não ocorre a luteólise e o animal torna-se gestante, o CL é o responsável pela produção de P4 e manutenção da gestação até 35 dias de gestação, a partir desse momento, a placenta começa a produzir hormônio denominado Gonadotrofina Coriônica Eguina (eCG) (BERGFELT; PIERSON; GINTHER, 1989). O eCG possui ação semelhante ao FSH e LH, que por sua vez, estimula o crescimento de vários folículos que podem ovular ou luteinizar, formando corpos lúteos acessórios que incrementam a produção de progesterona, a qual ajuda na manutenção da gestação até aproximadamente 150-160 dias de

gestação. A partir deste momento, a placenta assume integralmente essa função (NISWENDER et al., 2000).

2.4 Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)

O hipotálamo é uma glândula situada no cérebro, sendo considerado um transdutor central que converte sinais neurais em sinais hormonais. Um de seus produtos é o GnRH, um hormônio regulatório responsável pelo controle da biologia reprodutiva nos animais (GINTHER, 1992).

O GnRH é um decapeptídeo (10 aminoácidos) com peso molecular de 1183 daltons, sintetizado e armazenado na base do hipotálamo (GINTHER, 1992). O GnRH atua na pituitária anterior estimulando uma cascata de eventos hormonais para a pituitária e o sistema reprodutivo. Assim, o GnRH contribui para a liberação de LH e FSH pela hipófise anterior, os quais vão atingir os ovários por meio do sistema circulatório (JOHNSON; BECKER, 1993). Contudo, a relação de LH/FSH que atinge a circulação é ajustada pela frequência dos pulsos de GnRH e pelo controle do feedback de estrógenos e progestágenos, sendo que, pulsos de baixa frequência estimulam a produção e liberação de FSH, enquanto que pulsos de alta frequência estimulam a produção e liberação de LH (IRVINE; ALEXANDER, 1994).

Em éguas, a frequência dos pulsos de GnRH é mediada também pela liberação da melatonina. Uma baixa frequência de GnRH é liberada durante o anestro devido à alta concentração de melatonina, que é produzida pela devido a menor luminosidade nos períodos de outono e inverno (GINTHER, 1992). A administração de GnRH em éguas aumenta as concentrações de LH durante o anestro e estro (GINTHER; WENTWORTH, 1974; GARCIA; GINTHER, 1975) e durante o diestro (ALEXANDER; IRVINE, 1986; JOHNSON; BECKER; ROMA, 1988; KANITZ et al., 2007). Já em relação à concentração de P4, existem resultados divergentes. Segundo Williams et al. (2007), há aumento da concentração de P4 após tratamento com GnRH, o que não foi verificado por outro estudo (KANITZ et al., 2007). A administração de um antagonista de GnRH em éguas no diestro resulta numa diminuição de LH, FSH, e P4 (WATSON et al., 2000).

2.5 Efeito do LH sob a fase luteal

Em éguas, a concentração circulante de P4 diminui gradativamente a partir do dia 6 (Dia 0 = ovulação) até o início da luteólise (~ Dia 14), em associação com baixa concentração de LH (GINTHER et al., 2006). O número de receptores de LH no tecido luteal equino (BROADLEY et al., 1994) aumenta durante o diestro (ROSER; EVANS, 1983). Segundo Kelly, Honey e Wise (1988), em um estudo *in vitro*, o LH estimula a secreção de P4 pelas células luteais equinas, contudo, isso não foi confirmado em outro estudo *in vitro* conduzido por Broadley et al. (1994).

A gonodotrofina coriônica humana (hCG), um hormônio glicoproteico secretado pelas células da placenta humana, possui grande homologia à molécula de LH equino (WILSON et al., 1990), muito utilizado para induzir a ovulação em éguas por apresentar função semelhante ao LH (GASTAL et al., 2006). Portanto, em um estudo, a administração de hCG em éguas aumentou a concentração sanguínea de P4 (WATSON; COLSTON; BROADLEY, 1995). Além disso, administração de hCG ou extrato de pituitária equina no Dia 9 do ciclo estral prolonga a vida ativa do CL (GINTHER, 1979). Estes achados são consistentes com efeito positivo do LH sob a duração da P4 durante a fase luteal em éguas.

Nos primatas e ruminantes, o LH está envolvido na regulação da síntese de P4 (BAIRD, 1992). Em ovinos, a administração de LH aumenta a vida útil do CL (DONALDSON; HANSEL, 1965) e influencia positivamente a síntese de P4 (FITZ et al., 1982). Durante a fase lútea média, as oscilações nas concentrações de LH e P4 são sincronizadas (PROCKNOR et al., 1986; GINTHER et al., 2011a). Precedendo o início da luteólise, a administração de antagonista de GnRH bloqueia a secreção de LH e interfere com a proeminência e ritmicidade da oscilação de P4 (GINTHER et al., 2011b). Em bovinos, a retomada dos níveis de P4 após pulso de um metabólito de PGF₂ α durante a pré-luteólise e na primeira porção da luteólise (GINTHER et al., 2010) é, pelo menos parcialmente atribuível a um pulso de LH (SHRESTHA et al., 2011; GINTHER et al., 2013). No entanto, a sincronia entre a oscilação de LH e P4 e a retomada da P4 após cada pulso de metabólito de PGF₂ α não ocorre em éguas (GINTHER et al., 2008).

2.6 Efeito do LH e do FSH sob a vascularização do aparelho reprodutivo

O efeito da indução da ovulação por meio do aumento dos níveis de LH é temporariamente associado com o aumento da vascularização na parede dos folículos pré-ovulatórios em éguas (GASTAL et al., 2006; GINTHER; GASTAL; GASTAL, 2007), bovinos (ACOSTA et al., 2003; SIDDIQUI et al., 2010), mulheres (BRÄNNSTRÖM et al., 1998), camundongos (VARGA et al., 1985), coelhos (LEE; NOVY, 1978; JANSON, 1975), e ovelhas (NISWENDER et al., 1976). A administração de GnRH em bovinos estimula a secreção de LH e aumenta a perfusão vascular no folículo pré-ovulatório (ACOSTA et al., 2003; THATCHER et al., 1989). O tratamento de éguas com FSH duas vezes ao dia para induzir a superovulação aumentou a perfusão vascular do ovário concomitantemente com o desenvolvimento de múltiplos folículos (WITT et al., 2012). Embora a associação entre LH e fluxo sanguíneo do folículo seja bem conhecida em várias espécies, a associação entre LH e fluxo sanguíneo ovariano tem recebido considerações limitadas na espécie equina. Tratamento de coelhos com hCG aumenta a concentração de P4 e do fluxo sanguíneo no tecido não luteal do ovário, mas não aumenta o fluxo sanguíneo do CL (WILTBANK et al., 1989). Em mulheres, a administração prolongada de hCG aumenta o fluxo sanguíneo luteal (TAKASAKI et al., 2011). Em vacas, o fluxo sanguíneo luteal e P4 aumentam 1 hora após a administração de hCG (BEINDORFF et al., 2009).

2.7 Ultrassonografia

No âmbito da medicina, tanto humana quanto veterinária, a ultrassonografia tem ocupado destaque entre os mais eficazes métodos modernos de diagnósticos não invasivos. Fundamentalmente, sabe-se que o som é uma onda mecânica de forma longitudinal, que se propaga de modo circunscrito nos meios sólido, líquido ou gasoso, por possuírem massa e elasticidade, não se propagando no vácuo. Com base no fato de que as ondas sonoras não são ionizantes e, portanto, inócuas aos seres vivos, têm sido usadas amplamente para fins de diagnóstico, terapêuticos e de pesquisas (GOLDSTEIN, 2006).

Segundo o mesmo autor, o aparelho de ultrassonografia produz ondas sonoras de alta frequência que não são audíveis ao ser humano. Essas ondas são produzidas por vibração de cristais piezoelétricos presentes no transdutor, que interagem com os tecidos onde podem ser refletidas, refratadas ou absorvidas. As ondas que retornam ao transdutor formam as imagens de acordo com a impedância acústica do tecido (GINTHER, 1995a).

Após o primeiro uso na medicina veterinária para a avaliação de órgãos reprodutivos de éguas (PALMER; DRIANCOURT, 1980), a ultrassonografia tem sido uma ferramenta indispensável nos diagnósticos terapêuticos e nas pesquisas de animais de grande e pequeno porte (GOLDSTEIN, 2006).

A ultrassonografia transretal modo-B tem revolucionado o diagnóstico e a monitorização de eventos reprodutivos biológicos e patológicos, na pesquisa e clínica veterinária. O modo-B não é usado somente para identificar e medir estruturas, mas também para ser associado a eventos reprodutivos (GINTHER, 1995). A ultrassonografia Doppler, por sua vez, adiciona informações fisiológicas sobre o fluxo sanguíneo, possibilitando avaliar a hemodinâmica do tecido de interesse (GINTHER; UTT, 2004).

2.7.1 Ultrassonografia Doppler

Em 1842, o pesquisador austríaco Johann Christian Doppler descreveu o efeito Doppler como a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto que se encontra em movimento em relação ao observador (HOUSTO, 1989). Quando a fonte de onda e o objeto que recebe a onda estão estacionários, a frequência de onda é constante. No entanto, se a fonte de onda estiver movendo-se para perto ou longe do objeto, a frequência de onda diminui ou aumenta, respectivamente. Quando o efeito Doppler é utilizado na ultrassonografia, o observador estático é o transdutor e o objeto em movimento são as células sanguíneas (hemácias), que refletem as ondas ultrassonográficas emitidas pelo transdutor. A frequência das ondas refletidas varia de acordo com a velocidade e sentido do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

Nos animais de grande porte, a ultrassonografia Doppler é uma tecnologia não invasiva com resultado em tempo real, sendo a via transretal utilizada para avaliação do sistema reprodutivo (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011). Essa tecnologia é efetiva e útil para a avaliação *in vivo*, possibilitando uma acurácia no diagnóstico de patologias, monitoração dos eventos reprodutivos e no estudo da capilaridade das estruturas, assim como dos órgãos do sistema reprodutor (GINTHER; UTT, 2004), podendo prever condições futuras dos eventos reprodutivos (GINTHER, 2007).

A técnica de ultrassonografia Doppler é dividida em dois modos: Doppler colorido e espectral ou pulsado. Ambos os modos são utilizados com o objetivo de avaliar a perfusão sanguínea. A escolha de qual modo utilizar depende do tecido a ser estudado (GINTHER, 2007; FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

2.7.2 Modo espectral

O modo espectral, analisa o fluxo sanguíneo de um vaso específico de forma quantitativa, em que a velocidade do fluxo sanguíneo é representada por um gráfico em forma de onda denominado spectrum, representando cada onda um ciclo cardíaco completo (Figura 3).

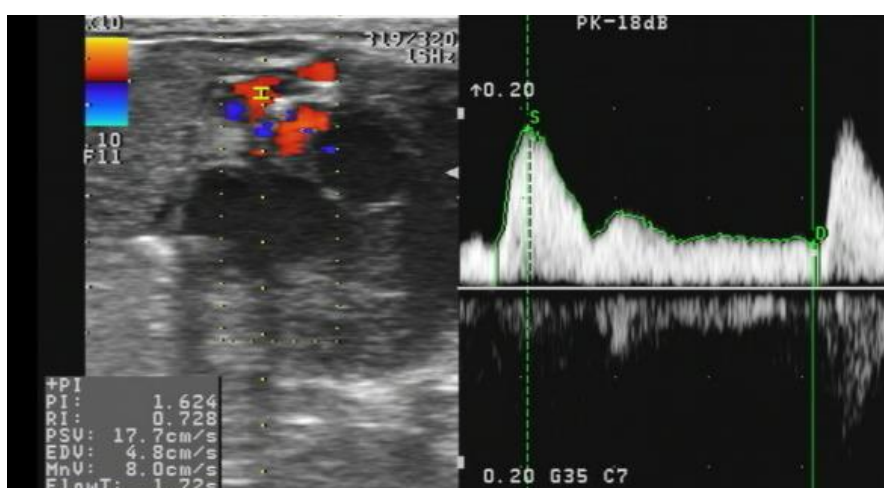


Figura 3. Ultrassonografia colorida Doppler, modo Spectral. Avaliação do índice de resistência vascular. Fonte: Arquivo pessoal.

O espectrum promove informação de valores como velocidade de pico sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV) e velocidade máxima média (TAMV). Por esse modo, é possível também identificar a direção do fluxo sanguíneo. Em que, a formação da onda abaixo da linha base do monitor é considerada fluxo em direção oposta ao transdutor. Portanto, a formação da onda acima da linha base do monitor é considerada fluxo em direção ao transdutor (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral é feita por imagem do modo-B ou do modo colorido, pela colocação do cursor (gate) no lúmen do vaso sanguíneo, formando uma angulação entre o cursor e o lúmen do vaso, denominado ângulo de insonação ou ângulo Doppler (GINTHER, 2007), sendo a mensuração realizada num ângulo entre 30° a 60° (GINTHER; UTT, 2004).

No entanto, devido à grande tortuosidade das artérias presentes no mesométrio, ovários e útero, não é possível determinar os seus respectivos ângulos Doppler. Uma alternativa usada para avaliar esses vasos tortuosos é por meio dos índices Doppler, que consiste em índice de resistência vascular (RI) e índice de pulsatilidade (PI) (SILVA et al., 2005). Esses índices são bons indicadores da perfusão vascular e são obtidos independentemente do ângulo de insonação (GINTHER; UTT, 2004). Ambos os RI e PI apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, ou seja, quanto menores RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER, 2007). A escolha de qual índice Doppler a ser utilizado vai depender da predileção do pesquisador.

Segundo Ginther (2007), os índices Doppler são calculados pela seguinte fórmula: $RI = \frac{PSV - EDV}{PSV}$; $PI = \frac{PSV - EDV}{TAMV}$.

2.7.3 Modo Doppler colorido

O modo Doppler colorido provê imediatamente uma avaliação qualitativa do fluxo sanguíneo de diferentes órgãos e tecidos. A vascularidade da estrutura é

estimada subjetivamente considerando a extensão do tecido com pixels coloridos. Diferente do modo espectral, o modo Doppler colorido é um método de avaliação simples e rápido, não dependendo do ângulo Doppler. Esse modo ainda é subdividido em: Modo Color-Flow e Power-Flow (GINTHER, 2007).

O modo Color-Flow provê imagem em duas cores, normalmente variando entre azul e vermelho, representando a perfusão vascular sanguínea da estrutura e a direção do fluxo sanguíneo (Figura 4).

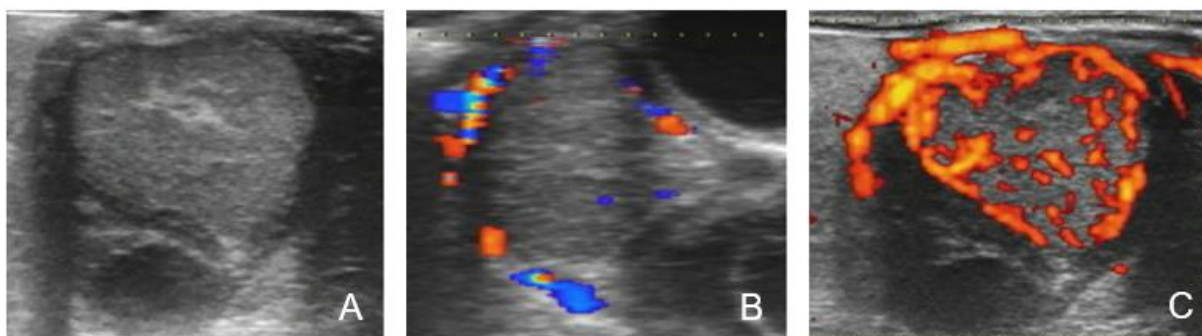


Figura 4. Exame ultrassonográfico Doppler do Corpo Lúteo: modo-B (A), Color-Flow (B) e Power-Flow (C). Fonte: Arquivo pessoal.

Os pixels vermelhos indicam que o fluxo sanguíneo está indo em direção ao transdutor, enquanto pixels na cor azul indica que o fluxo sanguíneo está indo em direção oposta ao transdutor (GINTHER, 2007).

No modo Power-Flow, o movimento do fluxo sanguíneo é graduado, utilizando uma única cor (vermelho) (Figura 3) e a intensidade de cores de pixel varia de acordo como a força de sinal do Doppler (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011). Segundo Ginther (2007), imagens geradas por meio do modo Power-Flow possuem maior sensibilidade para um fluxo sanguíneo fraco e é independente do ângulo Doppler. O modo Power-Flow é indicado para avaliação de vasos com pequenos diâmetros e com pouco fluxo sanguíneo, vasos presentes no útero (mesométrio, endométrio e miométrio) e no ovário (mesovário, corpo lúteo e parede folicular).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Localização do experimento

O experimento foi conduzido na instituição Eutheria Foundation, associado ao Departamento de Ciências Patobiológicas da University of Wisconsin Madison. A instituição está situada na cidade de Cross Plains, estado de Wisconsin, na zona temperada, no norte dos Estados Unidos da América, situado nas coordenadas geográficas 43° 05' 45,2" Norte e 89° 41' 12,7" Oeste.

3.2 Animais e grupos de tratamentos

Vinte e seis éguas não lactantes e não gestantes sem raça definida, com idade entre 6 e 15 anos, pesando entre 350 e 600 Kg foram utilizadas durante a primavera no período de março a maio de 2015. Não foram utilizados animais com dupla ovulação ou histórico de CL persistente. Os animais foram submetidos a avaliações ultrassonográficas prévias por via transretal e não foram detectadas anormalidades no trato reprodutivo. Todos os animais da propriedade eram avaliados diariamente após o dia 10 do ciclo estral até o dia da ovulação para identificar possíveis ovulações de diestro e o momento da ovulação.

As éguas foram mantidas sob luz natural em baia coletiva aberta (Figura 5) e tinham livre acesso a feno de capim Ryegrass (*Lolium* spp.), sal mineral e água. Todas as éguas permaneceram saudáveis e com bom estado de condição corporal, segundo a escala de Henneke et al. (1983). Os animais foram manipulados de acordo com o Guia de Cuidados no Uso de Animais Agrícolas em Pesquisa e Ensino do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América.



Figura 5. Éguas em baia coletiva.

Durante o período não experimental (inverno), os animais eram soltos em piquetes de capim Ryegrass (*Lolium* spp.) onde permaneciam até o início da neve (período de 2 meses), após esse período, eram mantidos novamente em baia coletiva até o próximo inverno.

As éguas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de acordo com a dose de GnRH (Gonadorelina; Fertagyl®) da seguinte forma: 0 (n = 9), 100 (n = 8) e 300 µg de GnRH (n = 9). Cada égua pertencente ao grupo 0 µg recebeu 6 mL de solução salina a 0,9%. As doses de 100 e 300 µg de GnRH foram administradas em volume de 6 mL por diluição do Fertagyl® com solução salina a 0,9%. Cada dose foi administrada em uma única aplicação intravenosa no dia 10 do ciclo estral (Dia 0 = ovulação).

3.3 Ultrassonografia e amostras de sangue

A ultrassonografia transretal, a coleta de amostras de sangue, e os tratamentos (0, 100 e 300 µg) foram realizados por um único operador que não tinha o conhecimento do grupo ao qual a égua pertencia (Figura 6). Um segundo operador codificou os tratamentos.



Figura 6. Avaliação ultrassonográfica.

A colheita de amostras de sangue, a ultrassonografia e os tratamentos foram realizados em ordem, às 8 da manhã no dia 10 do ciclo estral, e o tempo foi designado como hora 0. Após a hora 0, as amostra de sangue e exame ultrassonográfico foram realizados seguidamente em 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após o tratamento (Tabela 1).

TABELA 1 – Esquema ilustrativo das coletas de dados: avaliações ultrassonográficas e amostras de sangue

8:00 – Dia 10		Após o Tratamento						
US + CS	Trat. IV	US + CS	US + CS	US + CS	US + CS	US + CS	US + CS	US + CS
H 0	H 0	15 min.	30 min.	H 1	H 2	H 3	H 4	H 6

Trat: tratamento; H: hora; IV: intravenoso; Min.: minuto; CS: coleta de amostras de sangue; US: exame ultrassonográfico.

As imagens ultrassonográficas foram realizadas por meio de um aparelho de ultrassonografia equipado com modo-B (escala de cinza) e Doppler colorido (Aloka SSD-3500; Aloka America, Wallingford, CT, USA) com transdutor linear de 7.5-MHz, como descrito por Ginther (2007).

Todos os exames com Doppler foram realizados na configuração de ganho e contraste de cor, com velocidade de 9,96 cm/segundo, e filtro de fluxo em cores

de 4. O modo Doppler espectral foi usado para avaliar a resistência ao fluxo sanguíneo na artéria ovariana a 1 cm antes da entrada no ovário ipsilateral ao CL, por meio do índice de resistência do vaso (RI). A diminuição nos valores de RI indica diminuição na resistência para o fluxo sanguíneo e aumento da perfusão vascular do ovário (GINTHER, 2007). Foi gerado um spectrum Doppler a partir de três ciclos cardíacos, e o spectrum mais organizado foi selecionado para determinar o valor do RI. Esse procedimento foi realizado duas vezes, e a média dos dois valores de RI foi usada para as análises estatísticas.

Após o início do experimento, foi observado que a filmagem do exame com Doppler colorido do CL era necessária para a estimativa objetiva e confiável do percentual do CL com sinais Doppler de fluxo sanguíneo, assim, o percentual de fluxo sanguíneo no CL foi determinado apenas nas últimas cinco éguas de cada grupo. O CL foi escaneado por inteiro com movimentos contínuos e lentos em tempo real com modo-B, as imagens de Doppler colorido foram capturadas por um sistema de filmagem como descrito por Ginther e Utt (2004). A porcentagem do fluxo sanguíneo no CL com sinais de Doppler foi estimado como descrito e validado por Ginther (2007). A porcentagem foi determinada por um operador que não tinha o conhecimento prévio da identidade das éguas, grupo experimental e hora da análise.

3.4 Análise hormonal

As coletas sanguíneas foram feitas em tubo contendo heparina. Após as coletas, as amostras foram imediatamente submergidas em água a 0°C por 10 minutos seguido por centrifugação (2000 x g por 10 minutos). O plasma foi decantado e armazenado a -20 °C até o momento da análise. A concentração de P4 de cada amostra foi analisada conforme descrito e validado por Ginther et al. (2005a) utilizando o radioimunoensaio (RIA; ImmuChem Coated Tube Progesterone 125I RIA kit, MP Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA).

As concentrações de LH e FSH foram determinadas por RIA como descrito por Ginther et al. (2005b). O coeficiente de variação (CV) interensaio e a

sensibilidade para LH foram de 2,6% e 0,2 ng/mL, respectivamente. O CV e a sensibilidade para FSH foram de 4,4% e 0,30 ng/mL, respectivamente.

3.5 Análise estatística

Os dados que não foram distribuídos normalmente na base do teste de Shapiro-Wilk, foram resolvidos por transformação de logaritmos naturais ou por ranqueamento. Os dados foram processados pelo sistema de análise (SAS) PROC MIXED com repetições para minimizar as autocorrelações entre medidas sequenciais (versão 9.4; SAS Institute Inc., Cary NC, EUA). Quando um fator foi significativo, o teste de Tukey foi utilizado para comparações entre os grupos dentro da mesma hora. Quando a alteração foi significativa ou aproximadamente significativa, a diferença significativa foi usada para localizar diferenças entre horas dentro de um ponto final. A probabilidade de $P < 0,05$ indicou que a diferença foi significativa, e a probabilidade entre $P > 0,05$ e $P < 0,10$ indicou que a significância foi aproximadamente significativa.

4. RESULTADOS

Para as concentrações de LH e FSH, os efeitos do tratamento (0, 100, 300 μg) e tempo após o tratamento (hora 0 a 6) e a interação do grupo e os tempos de tratamento foram significativos (Figura 7).

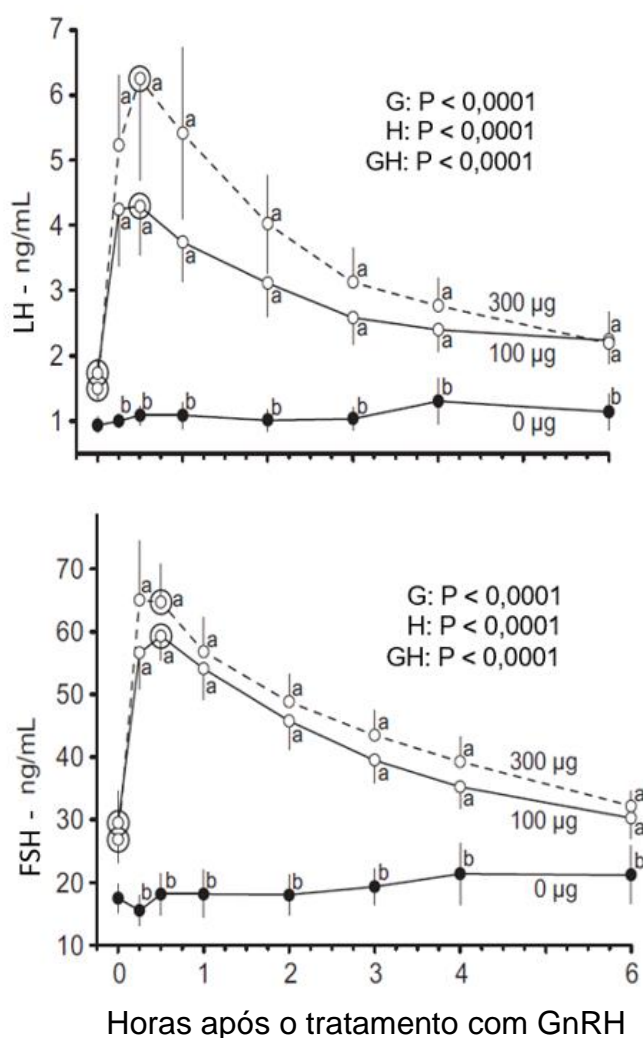


Figura. 7. Médias \pm erro padrão da média da concentração de LH e FSH após o tratamento com 0 (n = 9), 100 (n = 8) e 300 μg (n = 9) de GnRH. Efeito do grupo tratamento (G) e hora (H) e a interação do grupo e hora (GH), que foram significativos são mostrados. Letras diferentes em cada hora significam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. O círculo indica ($P < 0,05$) o início de um aumento ou diminuição na concentração de LH ou FSH.

Houve efeito do grupo sobre as concentrações de LH e FSH. Observou-se maior concentração de LH e FSH nos grupos 100 μg ($3,0 \pm 0,2$ e $42,2 \pm 2,0$ ng/mL) e 300 μg ($3,8 \pm 0,4$ e $47,1 \pm 2,0$ ng/mL) em relação ao grupo 0 mg ($1,1 \pm 0,07$ e $18,6 \pm 1,2$ ng/mL). O primeiro aumento ($P < 0,05$) em relação à hora de cada gonadotrofina (LH e FSH) ocorreu entre as horas 0 e 15 minutos e houve uma diminuição gradual ($P < 0,05$) entre 30 minutos e a hora 6. A interação foi semelhante para as gonadotrofinas (LH e FSH) e houve maior concentração nos grupos 100 e 300 μg , comparando com o grupo 0 μg em todos os momentos da avaliação após a hora 0. Não houve diferença entre os grupos 100 e 300 μg , quando analisados após a remoção do grupo 0 μg .

Para P4, apenas o efeito hora foi significativo. Houve aumento ($P < 0,0009$) nas concentrações entre 0 e 15 minutos e diminuição ($P < 0,007$) entre 15 minutos e a hora 1, nos três grupos (Figura 8).

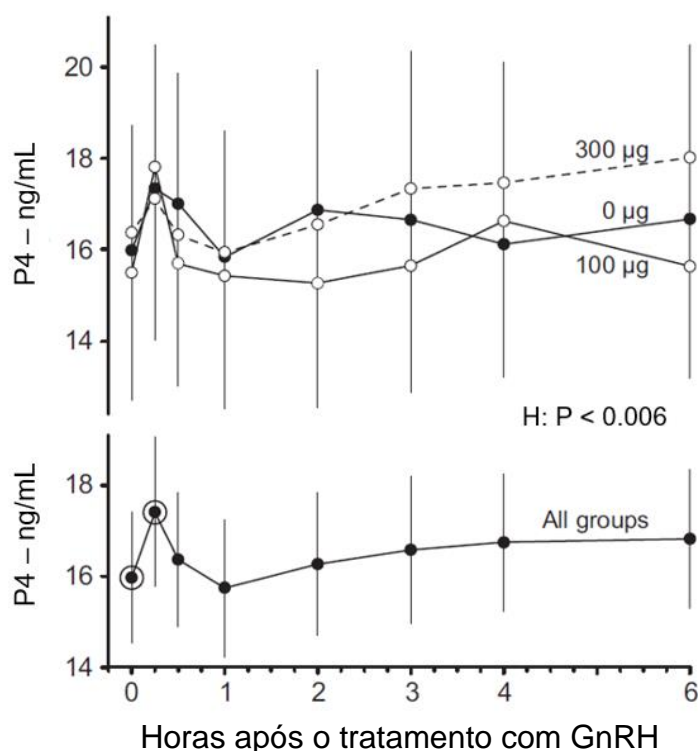


Figura. 8. Médias \pm erro padrão da média de concentração de progesterona (P4) após o tratamento com 0 ($n = 9$), 100 ($n = 8$) e 300 μg ($n = 9$) de GnRH. O efeito da hora (H) é demonstrado. Não houve efeito do tratamento do grupo ou interação, e todos os grupos foram unidos (gráfico inferior). O círculo indica ($P < 0,05$) o início de um aumento ou diminuição na concentração de P4.

Quanto ao RI da artéria ovariana antes da entrada no ovário, o efeito hora e a interação grupo e hora foram significativos. Em relação à interação grupo e hora, houve menor RI ($P < 0,05$) no grupo 100 μg do que no grupo 0 μg no momento 30 minutos e menor RI ($P < 0,05$) no grupo 100 μg do que no grupo 300 μg aos 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento (Figura 9).

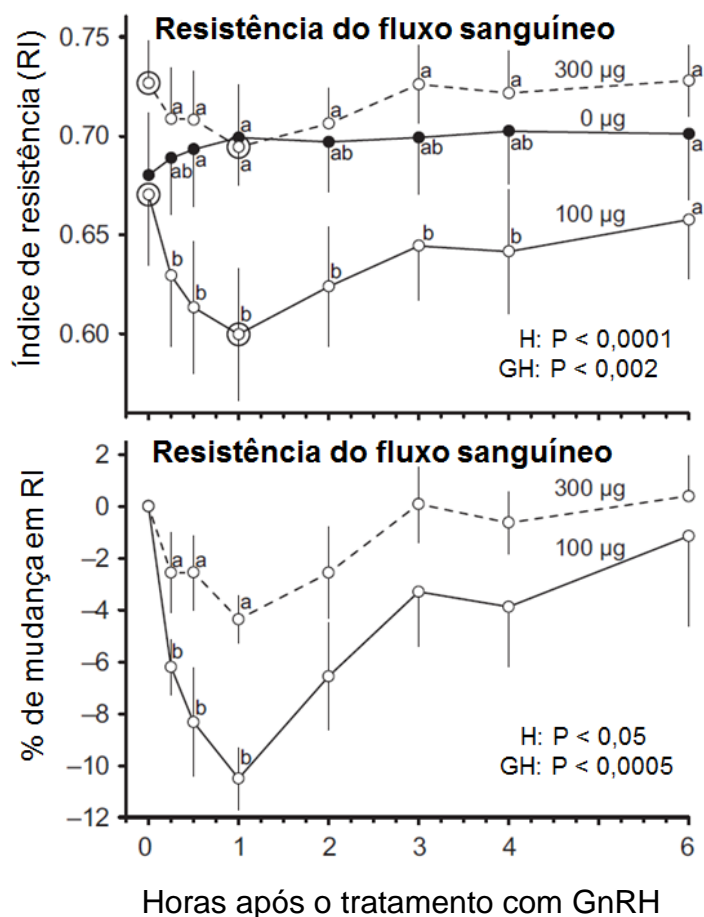


Figura. 9. Médias \pm erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria ovariana antes da entrada no ovário após o tratamento com 0 ($n = 9$), 100 ($n = 8$) e 300 μg ($n = 9$) de GnRH. O efeito do tratamento (G), hora (H) e a interação do tratamento e hora (GH) que foram significativos para RI, são demonstrado no gráfico superior. O percentual de mudança em RI no gráfico inferior. Letras diferentes em cada hora significa diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. O círculo indica ($P < 0,05$) o início do aumento ou diminuição do RI.

Quando cada grupo foi analisado separadamente, foi detectado efeito hora nos grupos 100 μg ($P < 0,0006$) e 300 μg ($P < 0,03$), o mesmo não foi observado no grupo 0 μg . Nos grupos 100 μg e 300 μg , o RI diminuiu ($P < 0,004$) entre as horas 0 e 1 e aumentou ($P < 0,03$) entre as horas 1 e 3. A diferença em RI entre os grupos 100 μg e 300 μg na hora 0 foi considerada aproximadamente significativa

($P < 0,09$). Portanto, o RI foi convertido em variação percentual a partir da hora 0 nos grupos 100 μg e 300 μg . O efeito grupo e a interação do grupo e hora foram significativos (Figura 9). Em relação à interação, foi maior a diminuição na porcentagem do RI no grupo 100 μg do que no grupo 300 μg nos momentos 15 minutos ($P < 0,04$), 30 minutos ($P < 0,03$) e 1 hora ($P < 0,02$) após o tratamento.

Para a porcentagem de sinais do fluxo sanguíneo com Doppler no CL, os efeitos da hora e a interação do grupo e hora foram significativos (Figura 10). A interação apresentou primeiramente um aumento na porcentagem de sinais Doppler do fluxo sanguíneo no CL durante as horas 0 e 1 nos grupos 100 μg e 300 μg , mas não no grupo 0 μg . Não houve diferença entre os grupos 100 μg e 300 μg , quando o grupo 0 μg foi removido das análises. A análise dos dados dos grupos 100 μg e 300 μg juntos, comparados com o do grupo 0 μg , foi aproximadamente significativo na hora 0. Portanto, a avaliação dos dados do grupo 100 μg e 300 μg foi comparada com a do grupo 0 μg , a partir da conversão dos dados para variação percentual, a interação foi significativa (Figura 10).

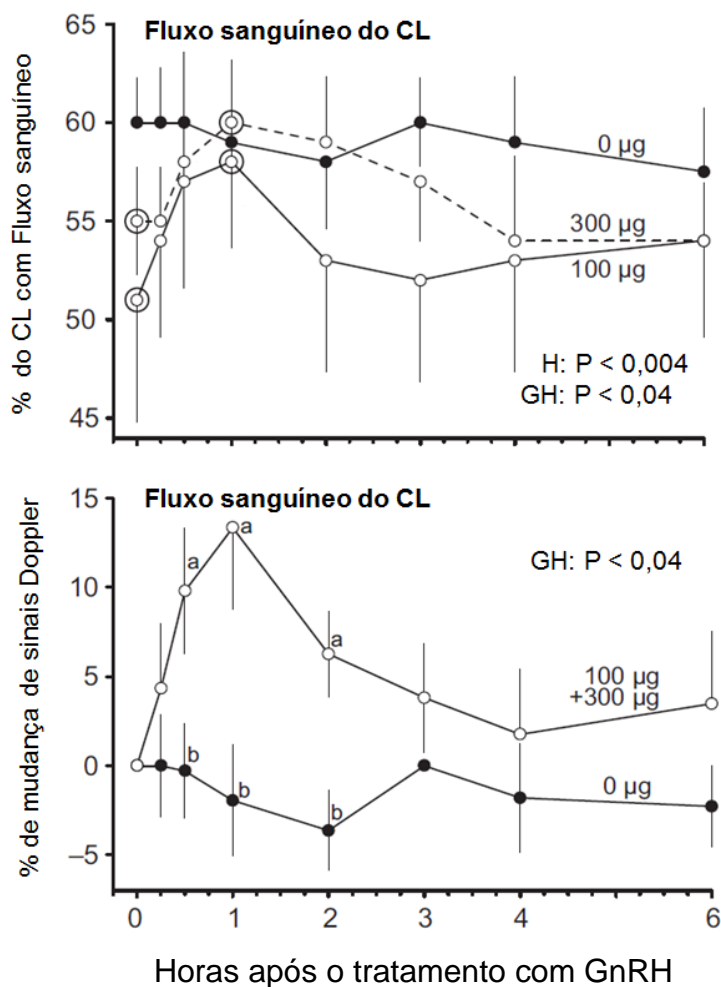


Figura. 10. Médias \pm erro padrão da média da porcentagem de sinais do fluxo sanguíneo do CL após o tratamento com 0 ($n = 5$), 100 ($n = 5$) e 300 μg ($n = 5$) de GnRH. Efeito da hora (H) e a interação do tratamento e hora (GH) são demonstrados por porcentagem do CL com sinais Doppler (gráfico superior) e porcentagem de mudança de sinais Doppler a partir da hora 0 (gráfico inferior). Não houve diferença entre os grupos 100 e 300 μg e o resultado dos dois grupos foi unido para comparar a mudança no percentual a partir da hora 0 nos grupos 100 e 300 μg em relação ao grupo controle (0 μg) (gráfico inferior). O círculo indica diferença estatística ($P < 0,05$) no início do aumento ou da diminuição na porcentagem do CL com fluxo sanguíneo. Letras diferentes na hora significa diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

A variação de percentual a partir da hora 0 diferiu ao decorrer das horas ($P < 0,002$) nos grupos unidos 100 e 300 μg , mas não no grupo de 0 μg . A variação percentual a partir da hora 0 foi maior ($P < 0,05$) aos 30 minutos, 1 e 2 horas para o grupo unido 100 e 300 μg do que no grupo de 0 μg .

5. DISCUSSÃO

O tratamento de éguas com GnRH por via intravenosa no dia 10 do ciclo estral ou durante a fase lútea induziu aumento nas concentrações de LH e FSH após a primeira amostra de sangue aos 15 minutos (GINTHER et al., 2006). Segundo Kanitz et al. (2007), um único tratamento com agonista de GnRH no dia 10 do ciclo estral aumentou as concentrações de LH na primeira amostra de sangue após o tratamento, aos 20 minutos, e a concentração permaneceu maior do que no grupo controle até 5 horas após o tratamento.

Em equinos, o GnRH induz aumento significativo de LH após a primeira amostra de sangue, aos 15 minutos da sua aplicação, durante anestro e estro (GINTHER; WENTWORTH, 1974). Em novilhas, uma única dose fisiológica de GnRH durante a fase lútea estimula um pulso de LH que é similar ao pulso natural de LH (GINTHER; BEG, 2012b). Novos estudos em éguas são necessários para melhor entendimento da relação de GnRH com LH, FSH e P4 durante a fase lútea e, sobre os fatores que regulam a liberação de GnRH pelo hipotálamo para a pituitária anterior.

Embora o único tratamento com 100 ou 300 µg de GnRH no Dia 10 tenha aumentado a concentração de LH, não houve alteração na concentração de P4. Estudos realizados na tentativa de aumentar a concentração de P4 em éguas por meio da administração de GnRH têm sido inconsistentes (KANITZ et al., 2007). Esses mesmos autores também observaram que um único tratamento no dia 10 do ciclo estral aumentou a concentração de LH, mas não a de P4.

Em outro estudo, o tratamento de éguas com GnRH de forma pulsátil no dia 9 ou 10 aumentou a concentração circulatória de LH e P4, mas não de FSH (JOHNSON et al., 1988). A infusão contínua de GnRH durante todo ciclo estral também aumentou as concentrações de P4 durante a fase lútea (WILLIAMS et al., 2007). Essas variações encontradas indicam a necessidade de estudos adicionais para esclarecer os efeitos de GnRH sobre P4, quando administrado em diferentes doses, durante diferentes concentrações endógenas de P4, e por administração única ou contínua.

O aumento transitório de P4 entre a hora 0 e o momento de 15 minutos foi seguido por uma diminuição ocorrida em todos os grupos, incluindo o grupo controle 0 µg. A razão para o aumento transitório da P4 não é conhecido, mas não pode ser atribuído ao tratamento com GnRH, devido ao grupo controle apresentar os mesmos resultados do que os grupos tratados.

O aumento na perfusão vascular do ovário ipsilateral ao CL devido ao tratamento com GnRH foi indicado pela diminuição dos valores do fluxo sanguíneo (RI) na artéria ovariana antes da entrada no ovário. O aumento na perfusão vascular ocorreu na primeira avaliação, 15 minutos após o tratamento. Futuras informações com maior frequência na determinação do RI serão necessárias antes dos 15 minutos para identificar quando ocorre o início da resposta ao tratamento com GnRH.

O aumento na porcentagem do fluxo sanguíneo do CL com sinais de Doppler colorido após o tratamento foi consistente com aumento da perfusão vascular do ovário (diminuição nos valores do RI). Como uma exceção, a extensão do fluxo sanguíneo do CL não diferiu entre as doses 100 e 300 µg. A razão para aumento mais pronunciado da perfusão vascular (Figura 9) com a menor dose (100 µg) do que com a dose mais alta (300 µg) de GnRH não é conhecida. Pode-se inferir que a dose de 300 µg pode ter sido associada com a inibição de uma overdose. No entanto, neste estudo, não houve diferença significativa na concentração de LH entre as doses de 100 e 300 µg. Nesse sentido, uma overdose de GnRH suprimiria as concentrações de LH, e doses menores de GnRH estimulariam o LH em equinos ou em outras espécies (MONTOVAN et al., 1990). Entretanto, futuros estudos serão necessários para esclarecer essas aparentes contradições.

O aumento da perfusão vascular do ovário ipsilateral ao CL e o aumento do fluxo sanguíneo do CL na resposta do tratamento com GnRH em éguas sem alteração nas concentrações de P4 é um novo achado. Em ovelhas, a administração de LH induziu o aumento da circulação sanguínea ovariana e na concentração de P4 (NISWENDER et al., 1976). Em vacas, o tratamento com hCG no dia 6 do ciclo induziu aumento no fluxo sanguíneo luteal e na concentração plasmática de P4 uma hora após o tratamento (BEINDORFF et al., 2009).

Em mulheres, a indução da ovulação com hCG foi associado com aumento no fluxo sanguíneo da artéria ovariana (WASEDA et al., 2003). O efeito do

estrógeno e do hCG no fluxo sanguíneo do CL foi estudado em coelhos usando microesferas radioativas (WILTBANK et al., 1989). O tratamento com hCG causou aumento nas concentrações de P4 e aumento no fluxo sanguíneo da porção não luteal do ovário, mas não do corpo lúteo. Dessa forma, conclui-se que, o fluxo sanguíneo do tecido não luteal é regulado independentemente do fluxo sanguíneo do CL. O efeito positivo do GnRH na artéria ovariana e no sistema vascular luteal em éguas, sem efeito nas concentrações de P4, indica que o GnRH ou LH e/ou FSH possui efeito positivo direto nos vasos sanguíneos do ovário. Estudos adicionais serão necessários para determinar se o efeito positivo do LH envolve tanto o ovário ipsilateral ao CL quanto o ovário contralateral ao CL durante a fase lútea e durante a fase folicular, assim como, algum efeito sobre folículos pré-ovulatórios.

Embora os mecanismos envolvidos no efeito positivo do GnRH, LH ou FSH sobre o sistema vascular do ovário não tenham sido determinados em animais de grande porte, essas informações estão disponíveis em animais de laboratório. Um aumento agudo no fluxo sanguíneo do ovário pelo LH tem sido relatado em ratos (WURTMAN, 1964; PIACSEK; HUTH, 1971; LEE; NOVY, 1978) e coelhos (JANSON, 1975; VARGA et al., 1985; WILTBANK et al., 1989) mas não em hamsters (VARGA; GREENWALD, 1979) ou cães (STARK; VARGA, 1975). Além disso, em ratos o aumento no fluxo sanguíneo do ovário ocorreu após o tratamento de LH, mas não com FSH ou prolactina (WURTMAN, 1964).

Em outro estudo, tratamento com LH aumentou o fluxo sanguíneo ovariano e a secreção de P4 e estradiol (LEE; NOVY, 1978). Com base na utilização de agentes bloqueadores, foi concluído que o AMP cíclico, prostaglandinas e outros metabólitos vasoativos estão envolvidos no auxílio do efeito positivo do LH no fluxo sanguíneo ovariano em ratos (LEE; NOVY, 1978). Em coelhos, o fluxo sanguíneo ovariano aumentou após 2 minutos da administração de LH (JANSON, 1975). Vargas et al. (1985) observaram, em coelhos, tanto o fluxo sanguíneo quanto a P4 aumentaram após o tratamento com LH.

A endometacina, um inibidor da síntese de prostaglandina, reduziu a resposta hiperêmica do ovário causado pelo LH, mas não alterou a concentração de P4 ou de estradiol. O possível papel das prostaglandinas, AMP cíclico e P4 na mediação do LH associado como agente causador da indução de hiperemia foi

discutido e revisado. Em mulheres (REISINGER et al., 2007) e ratos (GOMEZ et al., 2003), as gonadotrofinas também influenciam na expressão de fatores do crescimento vascular endotelial e alteram fatores angiogênicos proporcionando assim, um melhor fornecimento sanguíneo para o ovário. Aparentemente, não está claro se a artéria ovariana e o sistema vascular interovariano de éguas contêm receptores para GnRH, LH e/ou FSH. No entanto, em outras espécies domésticas (FIELDS; SHEMESH, 2004; ZIECIK et al., 2005) e de laboratório (SCHIRMAN-HILDESHEIM et al., 2005), receptores extragonadal para LH estão presentes em diversas porções do trato reprodutivo incluindo a artéria uterina.

Os mecanismos direto ou intermediário para efeito das gonadotrofinas sobre a vascularização do ovário em éguas não são conhecidos, mas estudos reportados de animais de laboratório são úteis ao considerar a direção de futuros estudos. A demonstração em éguas que o tratamento com GnRH durante a fase lútea induz aumento imediato das gonadotrofinas e do fluxo sanguíneo ovariano e luteal sem efeito nas concentrações de P4, pode estar relacionado a um efeito do GnRH, LH e/ou FSH na vascularização da artéria ovariana e do CL. Um efeito direto do FSH ou do GnRH não pode ser desconsiderado devido a informações incompletas em estudos anteriores. O efeito do GnRH endógeno sob a artéria ovariana parece improvável devido ao local de ação do GnRH endógeno na área hipotalâmica-pituitária, e da sua baixa concentração circulatória (GINTHER, 1992). No entanto, GnRH e seus receptores são produzidos no ovário de ratos (SCHIRMAN-HILDESHEIM et al., 2005), entretanto não é conhecido se no ovário de éguas existe receptores de GnRH.

Em éguas, a $PGF2\alpha$ e óxido nítrico podem intervir no efeito do LH nos vasos ovarianos. Tentativas de demonstrar o efeito positivo direto do tratamento sistêmico com $PGF2\alpha$ sobre o fluxo sanguíneo do CL em éguas usando exames diários têm sido insuficientes (GINTHER et al., 2007a; GINTHER et al., 2007b). No estudo de Ginther et al. (2008), ao analisarem amostras de sangue de éguas de hora em hora, verificou-se que o fluxo de sangue luteal não aumenta durante a porção ascendente do pulso de um metabólito de $PGF2\alpha$, embora ocorra em bovinos (GINTHER et al., 2007c). O óxido nítrico é derivado de um fator intraluteal que aparentemente medeia certas ações da $PGF2\alpha$ no CL e também possui efeitos vasoativos (SKARZYNSKI

et al., 2003). Em éguas, o óxido nítrico pode estar envolvido no processo de luteólise (GINTHER et al., 2015), contudo, futuros estudos são necessários.

Os resultados deste estudo indicam que a égua é um modelo útil para determinação de um mecanismo para avaliação do aumento no fluxo sanguíneo ovariano após o tratamento com GnRH ou gonadotrofinas. A artéria ovariana é acessível para determinação da resistência ao fluxo sanguíneo ovariano por meio da ultrassonografia Doppler colorida por via transretal (GINTHER; UTT, 2004). Além disso, o surgimento prolongado de um pico de LH ovulatório e grandes folículos pré-ovulatórios nessa espécie (GINTHER et al., 1992) também podem ser úteis para determinar o papel e mecanismo de ação das gonadotrofinas na artéria ovariana durante o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório.

6. CONCLUSÃO

A administração de uma única dose de GnRH na concentração de 100 µg ou 300 µg em éguas no dia 10 do ciclo estral após a ovulação aumentou a concentração plasmática de LH e FSH, diminuiu a resistência ao fluxo sanguíneo na artéria ovariana antes da entrada no ovário ipsilateral ao CL e aumentou a percentagem do fluxo sanguíneo do CL.

O aumento da perfusão vascular do ovário foi maior para a menor dose de GnRH (100 µg) do que para a dose maior (300 µg). A concentração circulante de P4 não foi alterada pelo tratamento com GnRH.

7. REFERÊNCIAS

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

ALBRECHT, B.A.; DAELS, P.F. Immunolocalization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase and cytochrome P450 aromatase in the equine corpus luteum of diestrus and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.111, p.127-133, 1997.

ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. Effect of graded doses of gonadotropin-releasing hormone on serum LH concentrations in mares in various reproductive states: comparison with endogenously generated LH pulses. **Journal of Endocrinology**, v.110, p.19-26, 1986.

AURICH, C. Reproductive cycle of horses. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.220-228, 2011.

BAIRD, D.T. Lutetrophic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.95-102, 1992.

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

BERGFELT, D.R.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.21, p.261-270, 1989.

BERTAN, C.M.; BINELI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.824-840, 2006.

BRÄNNSTRÖM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTRÖM, H.G.; JOSEFSSON, B.; HELLBERG, P.; GRANBERG, S.; COLLINS, W.P.; BOURNE, T. M.R.C.O.G. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. **Fertility and Sterility**, v.69, p.435-442, 1998.

BROADLEY, C.; MENZIES, G.S.; BRAMLEY, T.A.; WATSON, E.D. Isolation of cell populations from the mare corpus luteum: comparison of mechanical and collagenase dissociation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.7-15, 1994.

DONADEU, F. X.; PEDERSEN, H. G. Follicle development in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.224-231, 2008.

DONALDSON, L.E.; HANSEL, W. Prolongation of life span of the bovine corpus luteum by single injections of bovine luteinizing hormone. **Journal of Dairy Science**, v.48, p.903-904, 1965.

DYCE, K.M.; SACK, M.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3 ed. ed., Rio de Janeiro, 2004. 813p.

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

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

FIELDS, M.J.; SHEMESH, M. Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1412–1418, 2004.

FITZ, T.A.; MAYAN, M.H.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.27, p.703-711, 1982.

GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J.; Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, p.1581-1584, 1975.

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

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, 1986, 1134p.

GINTHER, O.J.; WENTWORTH B.C. Effect of a synthetic gonadotropin releasing hormone on plasma concentrations of luteinizing hormone in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.79-81, 1974.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. First ed., Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1979. 413p.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. Second ed., Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals, book 1**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995a. 225p.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses, book 2**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995b. 394p.

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v.130, p.379-388, 2005A.

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

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

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography, book 4**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007. 258p.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.20-27, 2007.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Effect of prostaglandin F2a on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.315-328, 2007a.

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, 2007b.

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506-513, 2007c.

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L.; FERREIRA, J.C.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.684-693, 2008.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovulatory Hormones: What's New? **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.8, p.454-460, 2008b.

GINTHER, O.J.; SHRESTHA, H.K.; FUENZALIDA, M.J.; SHAHIDUZZAMAN, A.K.M.; HANNAN, M.A.; BEG, M.A. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F2a and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. **Theriogenology**, v.74, p.1179-1186, 2010.

GINTHER, O.J.; FUENZALIDA, M.J.; SHERESTHA, H.K.; BEG, M.A. Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 40, p.77-86, 2011a.

GINTHER, O.J.; FUENZALIDA, M.J.; PUGLIESI, G.; HANNAN, M.A.; BEG, M.A. Effect of luteinizing hormone oscillations on progesterone concentrations based on treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.40, p.119-127, 2011b.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. **Biology of Reproduction**, v.86, p.1-12, 2012a.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A. Stimulation of a pulse of LH and reduction in PRL concentration by a physiologic dose of GnRH before, during, and after luteolysis in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.52-62, 2012b.

GINTHER, O.J.; BASHIR, S.T.; MIR, R.A.; SANTOS, V.G.; BEG, M.A. Interrelationships among progesterone, LH, and luteal blood flow during a pulse of a PGF2a metabolite and functional role of LH in the progesterone rebound in heifers. **Theriogenology**, v.79, p.1110-1119, 2013.

GINTHER, O.J.; WOLF, C.A.; BALDRIGHI, J.M.; GREENE, J.M. Relationships among nitric oxide metabolites and pulses of a PGF2a metabolite during and after luteolysis in mares. **Theriogenology**, v.84, p.193-199, 2015.

GINTHER, O.J.; SANTOS, V.G. Natural rescue and resurgence of the equine corpus luteum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.35, p.1-6, 2015.

GOLDSTEIN, J. R. Ultrasound-guided peripheral venous access. **Israeli Journal of Emergency Medicine**, v.6, n.4, p.46-52, 2006.

GOMEZ, R.; SIMOM, C.; REMOHI, J.; PELLICER, A. Administration of moderate and high doses of gonadotropin to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. **Biology of Reproduction**, v.68, p.2164-2171, 2003.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; YEATS, B. F. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p.371-372, 1983.

HOUSTO, P. L. Correlated Photochemistry: The Legacy of Johann Christian Doppler. **Accounts of Chemical Research**, v.22, p.309-314, 1989.

IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. L. The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. **Journal of Endocrinology**, v.140, p.283-295, 1994

JANSON, P.O. Effects of the luteinizing hormone on blood flow in the follicular rabbit ovary, as measured by radioactive microspheres. **Acta Endocrinologica**, v.79, p.122-133, 1975.

JOHNSON, A.L.; BECKER, S.E.; ROMA, M.L. Effects of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F-2 alpha on corpus luteum function and timing of the subsequent ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.545-551, 1988.

JOHNSON, A.L.; BECKER, S.E. Hormonal control of ovulation in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.33, p.209-226, 1993.

KANITZ, W.; SCHNEIDER, F.; HOPPEN, H.O.; UNGER, C.; NÜRNBERG, G.; BECKER, F. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.55-62, 2007.

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

KURJAK, A. CHERVENAK. F. Donald School: **Ecografía en obstetricia y ginecología**. 2 ed. Boenos Aires: Medica Panamericana, 2008. 1012 p.

LEE, W.; NOVY, M.J. Effects of luteinizing hormone and indomethacin on blood flow and steroidogenesis in the rabbit ovary. **Biology of Reproduction**, v.18, p.799-807, 1978.

LIMA, R.A.S; OLIVEIRA, R.A; MENDES, C.Q. Perfil e tendências da equideocultura brasileira. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, **Anais**. Brasília, DF, 2012. P.49

LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2015. 50p.

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

MONTOVAN, S.M.; DAELS, P.P.; RIVIER, J.; HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; LASLEY, B.L. The effect of a potent GnRH agonist on gonadal and sexual activity in the horse. **Theriogenology**, v.33, p.1305-1321, 1990.

MOURA, C.E.B. Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos. 2003. 123f. **Dissertação (Mestrado)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, 245-262, 2000.

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

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v.123, n.3, p.333-339, 2002.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.13, p.206-216, 1980.

PIACSEK, B.E.; HUTH, J.F. Changes in ovarian venous blood flow following cannulation: effect of luteinizing hormone (LH) and antihistamine. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.138, p.1022-1024, 1971.

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

PROCKNOR, M.; DACHIR, S.; OWENS, R.E.; LITTLE, D.E. HARMS O.G. Temporal relationship of the pulsatile fluctuation of luteinizing hormone and progesterone in cattle: a time series cross-correlation analysis. **Journal of Animal Science**, v.62, p.191-198, 1986.

REISINGER, K.; BAAL, N.; MCKINNON, T.; MÜNSTEDT, K.; ZYGMUNT, M. The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.269, p.65-80, 2007.

ROSER, J.F.; EVANS, J.W. Luteal luteinizing hormone receptors during the postovulatory period in the mare. **Biology of Reproduction**, v.29, p.499-510, 1983.

SANGHA, G.K; SHARMA, R.K; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.43, p.53-64, 2002.

SATUÉ, K, GARDÓN J.C. A Review of the Estrous Cycle and the Neuroendocrine Mechanisms in the Mare. **Journal of Steroids and Hormonal Science**, v. 4, p.115, 2013.

SCHIRMAN-HILDESHEIM, T.D.; BAR, T.; BEN-AROYA, N.; KOCH, Y. Differential gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression patterns in different tissues of the female rat across the estrous cycle. **Endocrinology**, v.146, p.3401-3408, 2005.

SHRESTHA, H.K.; PUGLIESI, G. BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Role of luteinizing hormone in changes in concentrations of progesterone and luteal blood flow during the hours of a simulated pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2alpha (PGFM) in heifers. **Biology of Reproduction**, v.85, p.482-489, 2011.

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

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

SILVA, M.S. J.; LIMA, R.S.; SILVA, M.J.S.; LUCENA, J.E.C.; CARNEIRO, G.F.; NASCIMENTO, G.; JOBIM, C.C. Avaliação comportamental de éguas estabuladas em período reprodutivo. **Revista Ciência Agronômica**, v.14, n.1, p.46-54, 2015.

SKARZYNSKI, D.J.; JAROSZEWSKI, J.J.; BAH, M.M.; DEPTULA, K.M.; BARSZCZEWSKA, B.; GAWRONSKA, B.; HANSEL, W. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F2-induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1674-1681, 2003.

STARK, E.; VARGA, B. Role of prostaglandin E2 in the stimulatory effect of ACTH on ovarian blood flow. **Acta Med Acad Sci Hung**, v.32, p.329-335, 1975.

STOCCO, C.; TELLERIA, C; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v.32, p.1171-1179, 2007.

TAKASAKI, A.; TAMURA, I.; KIZUKA, F.; LEE L.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; TAMURA, H.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; SUGINO, N. Luteal blood flow in patients undergoing GnRH agonist long protocol. **Journal of Ovarian Research**, v.4, p.1-6, 2011.

THATCHER, W.W.; MACMILLAN, K.L.; HANSEN, P.J.; DROST, M. Concepts for the regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v.31, p.149-164, 1989.

TRAMONTANO, A.; GALVÃO, A.; SERRÃO, P.; FERREIRA-DIAS, G.; MOLLO, A. Growth hormone and insulin growth factor-1 on nitric oxide production and angiogenic activity in the corpus luteum of the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 73, 2010.

VAN NIEKERK, C.H.; MORGENTHAL, J.C.; GERNEKE, W.H. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.23, p.171-175, 1975.

VARGA, B.; GREENWALD, G.S. Cyclic changes in utero-ovarian blood flow and ovarian hormone secretion in the hamster: effects of adrenocorticotropin, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v.104, p.1525-1531, 1979.

VARGA, B.; HORVÁTH, E.; FOLLY, G.; STARK, E. Study of the luteinizing hormone-induced increase of ovarian blood flow during the estrous cycle in the rat. **Biology of Reproduction**, v.32, p.480-488, 1985.

WASEDA, T.; MAKINODA, S.; WATANABE, Y.; SASAKURA, C.; IMAFUKU, N.; HIROSAKI N.; INOUE, H.; OHSHIMA, K.; FUJII, R.; IURA, T. Hemodynamic response of ovarian artery after hCG injection. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.202, p.71-75, 2003.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.8, p.223-229, 1990.

WATSON, E.D.; COLSTON, M.; BROADLEY, C. LH and progesterone concentrations during diestrus in the mare and the 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.

WATSON, E.D.; BAE, S.E.; AL-ZI"abi, M.O.; HOGG, C.O.; ARMSTRONG, D.G. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) during induced and natural regression of equine corpora lutea. **Theriogenology**, v.64, p.1371-1380, 2005.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.277-285, 2002.

WEEMS, C.; WEEMS, Y.; RANDEL, R. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, 171, 206-228, 2006.

WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; BLODGETT, G.P.; WARD, J.E.; UNNERSTALL, D.A.; QUIRK, K.S. Continuous administration of low-dose GnRH in mares: I. Control of persistent anovulation during the ovulatory season. **Theriogenology**, v.68, p.67-75, 2007.

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

WILTBANK, M.C.; GALLAGHER, K.P.; DYSKO, R.C.; KEYES, P.L. Regulation of blood flow to the rabbit corpus luteum: effects of estradiol and human chorionic gonadotropin. **Endocrinology**, v.124, p.605-611, 1989.

WITT, M.C.; BOLLWEIN, H.; PROBST, J.; BAACKMANN, C.; SQUIRES, E.L.; SIEME, H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. **Theriogenology**, v.77, p.1406-1414, 2012.

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

WURTMAN, R.J. An effect of luteinizing hormone on the fractional perfusion of the rat ovary. **Endocrinology**, v.75, p.927-933, 1964.

YAN, Z; NEULEN, J.; RACZEK, S.; WEICH, H.A.; KECK, C.; GRUNWALD, K.; BRECKWOLDT, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/ vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecol Endocrinol**, v.3, p.149-153, 1998.

ZIECIK, A.J.; BODEK, G.; BLITEK, A.; KACZMAREK, M.; WACLAWIK, A. Nongonadal LH receptors, their involvement in female reproductive function and a new applicable approach. **The Veterinary Journal**, v.169, p.75-84, 2005.

ANEXO

ANEXO A – Trabalho publicado na revista Theriogenology

Theriogenology 85 (2016) 740–746



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares



T. Castro^{a,b,c}, F.A. Oliveira^b, M.A.R. Siddiqui^{a,c}, J.M. Baldrighi^{a,c}, C.A. Wolf^{a,c}, O.J. Ginther^{a,c,*}

^aEutheria Foundation, Cross Plains, Wisconsin, USA

^bCentro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil

^cDepartment of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2015

Received in revised form 8 October 2015

Accepted 11 October 2015

Keywords:

GnRH

FSH

LH

Luteal blood flow

Mare

Progesterone

ABSTRACT

A study was performed on the effect of a single dose per mare of 0 (n = 9), 100 (n = 8), or 300 (n = 9) of GnRH on Day 10 (Day 0 = ovulation) on concentrations of LH, FSH, and progesterone (P4) and blood flow to the CL ovary. Hormone concentration and blood flow measurements were performed at hours 0 (hour of treatment), 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 6. Blood flow was assessed by spectral Doppler ultrasonography for resistance to blood flow in an ovarian artery before entry into the CL ovary. The percentage of the CL with color Doppler signals of blood flow was estimated from videotapes of real-time color Doppler imaging by an operator who was unaware of mare identity, hour, or treatment dose. Concentrations of LH and FSH increased (P < 0.05) at hour 0.25 and decreased (P < 0.05) over hours 1 to 6; P4 concentration was not altered by treatment. Blood flow resistance decreased between hours 0 and 1, but the decrease was greater (P < 0.05) for the 100- μ g dose than for the 300- μ g dose. The percentage of CL with blood flow signals increased (P < 0.05) between hours 0 and 1 with no significant difference between the 100- and 300- μ g doses. The results supported the hypothesis that GnRH increases LH concentration, vascular perfusion of the CL ovary, and CL blood flow during the luteal phase; however, P4 concentration was not affected.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In mares, concentration of circulating progesterone (P4) decreases gradually from Day 6 (Day 0 = ovulation) until the beginning of luteolysis (~Day 14) in temporal association with low LH concentration [1]. The number of LH receptors in equine luteal tissue [2] increases during diestrus [3]. *In vitro*, LH stimulates secretion of P4 by equine luteal cells [4]; however, this was not confirmed in another study [2]. Administration of GnRH in mares increases the concentration of LH during anestrus and estrus [5,6] and

during diestrus [7–9]. Concentration of P4 was increased by GnRH treatment in one study [10] but not in another [9]. Administration of a GnRH antagonist to diestrous mares results in a decrease in LH, FSH, and P4 [11]. Administration of hCG in mares increases the concentration of P4 [12]. Moreover, administration of hCG or an equine pituitary extract on Day 9 of the estrous cycle prolongs the active life of the CL [13]. In addition, passive immunization against an equine pituitary extract induces CL regression [14]. These findings are consistent with a positive effect of LH on P4 during the luteal phase in mares.

In primates and ruminants, LH is involved in the regulation of P4 synthesis [15]. In sheep, LH administration extends the life of the CL [16] and positively influences P4 synthesis [17]. During the midluteal phase, LH and P4

* Corresponding author. Tel.: +1 608 798 3777; fax: +1 608 798 3722.
E-mail address: ginther@vetmed.wisc.edu (O.J. Ginther).

oscillations are synchronized [18,19]. Preceding the beginning of luteolysis, a GnRH antagonist blocks LH secretion and interferes with the prominence and rhythmicity of P4 oscillations [20]. The P4 rebound after a pulse of a PGF2 α metabolite during preluteolysis and the first portion of luteolysis [21] is at least partly attributable to a pulse of LH [22,23]. However, synchrony between LH and P4 oscillations and the P4 rebound after each pulse of a PGF2 α metabolite do not occur in mares.

The ovulation-inducing effect of an LH surge is temporally associated with an increase in vascularity of the wall of the preovulatory follicle in mares [24,25], cattle [26,27], and women [28]. In addition, LH induces a vasoactive increase of blood flow in the ovaries of rats [29], rabbits [30,31], and sheep [32]. The administration of GnRH in cattle initiates the secretion of LH and increases vascular perfusion of the preovulatory follicle [26,33]. Treatment of mares with FSH twice a day to induce superovulation increases ovarian vascular perfusion concurrently with the development of multiple follicles [34]. Although the association between LH and follicle blood flow is well known in various species, the association between LH and luteal blood flow has received limited consideration. Treatment of rabbits with hCG increases P4 concentration and blood flow to the ovarian nonluteal tissue but does not increase blood flow to the CL [35]. In women, prolonged administration of hCG increases luteal blood flow [36]. In cows, luteal blood flow and P4 increase 1 hour after hCG administration [37].

In the present study in mares, administration of GnRH during the luteal phase before the beginning of luteolysis was used to study the temporal association between an increase in gonadotropins and vascular dynamics of the ovary and CL. Color Doppler ultrasonography was used to determine the extent of ovarian vascular perfusion on the basis of the resistance to blood flow in an ovarian artery before entry into the CL ovary, and color Doppler imaging was used to estimate the percentage of the entire CL with Doppler signals of blood flow. The hypothesis was that GnRH stimulates an increase in LH and P4 concentrations, vascular perfusion of the CL ovary, and CL blood flow during the luteal phase.

2. Materials and methods

2.1. Mares and treatment groups

Nonlactating mares of unknown breeding (riding-type horses and apparent horse-pony crosses), aged 6 to 15 years, and weighing 350 to 600 kg were used from March to May in the northern temperate zone. Animals with double ovulation or a history of persistent CL were not used. Abnormalities of the reproductive tract were not detected when assessed by transrectal ultrasonographic imaging [38]. The mares were housed under natural light in an open shelter and outdoor paddock and were maintained by free access to primarily grass hay, trace mineralized salt, and water. All mares remained healthy and in good body condition throughout the study. The animals were handled according to the United States Department of Agriculture Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

The mares were randomized by replication into three groups according to the dose of GnRH (Fertagyl or gonadorelin; Intervet, Inc., Roseland, NJ, USA) as follows: 0 (n = 9), 100 (n = 8), and 300- μ g GnRH (n = 9). Each mare in the 0- μ g group was given 6 mL of physiological saline. The 100 and 300- μ g doses of GnRH were given in a volume of 6 mL by diluting the Fertagyl with saline. Each dose was given as a single intravenous treatment on Day 10 (Day 0 = ovulation).

2.2. Ultrasonography and blood sampling

Transrectal ultrasonography, collection of blood samples, and treatment were performed by a single operator who was unaware of the treatment group; a second operator coded each treatment preparation for each mare. Blood sampling from a jugular vein, ultrasonography, and the single treatment were performed in that order at 8 AM on Day 10, and the time was designated as hour 0. Blood sampling and ultrasonography were performed thereafter at hours 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 6.

A duplex B-mode (gray scale) and color Doppler ultrasound instrument (Aloka SSD-3500; Aloka America, Wallingford, CT, USA) equipped with a linear-array 7.5-MHz transducer was used as described [38,39]. All Doppler scans were performed at a constant color gain setting, velocity setting of 9.96 cm/second, and a color-flow filter setting of 4. The spectral Doppler mode was used to assess the resistance to blood flow in the ovarian artery within 1 cm before entry into the CL ovary on the basis of the resistance index (RI). A decrease in RI indicates a decrease in resistance to blood flow and an increase in vascular perfusion of the ovary [39]. A Doppler spectrum for each of three cardiac cycles was generated, and the most organized spectrum was selected for determining the RI. This was performed twice, and the mean of the two RI determinations was used in the statistical analyses.

After the experiment was under way, it was realized that videotaping of the color Doppler scan of the CL was needed for objective and reliable estimation of the percentage of the CL with Doppler signals of blood flow. The CL blood flow percentage was determined for the last five replicates (n = 5 mares in each group). The entire CL was scanned in a slow continuous motion. Real-time B-mode and color Doppler images of the continuous scans were captured with a videotaping system as described [40]. The percentage of the CL with blood flow Doppler signals was estimated as described and validated [39]. The percentage estimates were determined by an operator who was unaware of mare identity, experimental group, and hour.

2.3. Hormone assays

After each blood collection, the samples were immediately placed in ice water for 10 minutes followed by centrifugation (2000 \times g for 10 minutes). The plasma was decanted and stored (-20 $^{\circ}$ C) until assayed. The plasma samples were assayed for P4 as described and validated for mare plasma in our laboratory [41] using a solid-phase radioimmunoassay (RIA; Immuchem Coated Tube Progesterone 125I RIA kit, MP Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA).

The intra-assay coefficient of variation (CV) and sensitivity were 6.0% and 0.12 ng/mL, respectively. The concentrations of LH and FSH were determined by RIA as described [42]. The intra-assay CV and sensitivity for LH were 2.6% and 0.20 ng/mL, respectively. The intra-assay CV and sensitivity for FSH were 4.4% and 0.30 ng/mL, respectively.

2.4. Statistics

Data that were not normally distributed on the basis of a Shapiro–Wilk test were resolved by transformation to natural logarithms or ranks. Data processing used the statistical analysis system (SAS) PROC MIXED with a REPEATED statement to minimize autocorrelation among sequential measurements (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary NC, USA). When a factor was significant, Tukey's honestly significant difference test was used for comparisons among dose groups within an hour. When the interaction was significant or approached significance, honestly significant difference was used to locate differences among hours within an end point. A probability of $P \leq 0.05$ indicated a difference was significant, and a probability between $P > 0.05$ and $P \leq 0.10$ indicated that significance was approached. Differences that approached significance were included on a tentative or preliminary basis for potential consideration in future studies. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean unless otherwise indicated.

3. Results

For concentration of LH and for concentration of FSH, the main effects of treatment group (0, 100, 300 μg of GnRH) and hour (hours 0–6) and the interaction of group and hour were significant (Fig. 1). The group effect was from greater overall concentrations for LH and for FSH, respectively, in the 100- μg group (3.0 ± 0.2 and 42.2 ± 2.0 ng/mL) and in the 300- μg group (3.8 ± 0.4 and 47.1 ± 2.0 ng/mL) than in the 0- μg group (1.1 ± 0.07 and 18.6 ± 1.2 ng/mL). The first increase ($P < 0.05$) for the hour effect of each gonadotropin occurred between hours 0 and 0.25 and a gradual decrease ($P < 0.05$) between hours 0.5 and 6. The interaction was similar for each gonadotropin from greater concentration in the 100- and 300- μg groups than in the 0- μg group at each hour after hour 0. There was no difference between the 100- and 300- μg groups when analyzed after removal of the 0- μg group.

For P4, only the hour effect was significant (Fig. 2). The hour effect was primarily from an increase ($P < 0.0009$) in concentration between hours 0 and 0.25 and a decrease ($P < 0.007$) between hours 0.25 and 1.0 averaged over the three groups.

For RI in the ovarian artery before entering the ovary, the main effects of hour and the interaction of treatment group and hour were significant (Fig. 3, upper panel). The interaction represented primarily lower RI ($P < 0.05$) in the 100- μg group than in the 0- μg group at hour 0.5 and lower RI ($P < 0.05$) in the 100- μg group than in the 300- μg group at hours 0.25, 0.5, 1, 2, 3, and 4. When each group was analyzed separately, an hour effect was detected in the 100- ($P < 0.0006$) and 300- μg groups ($P < 0.03$) but not in the

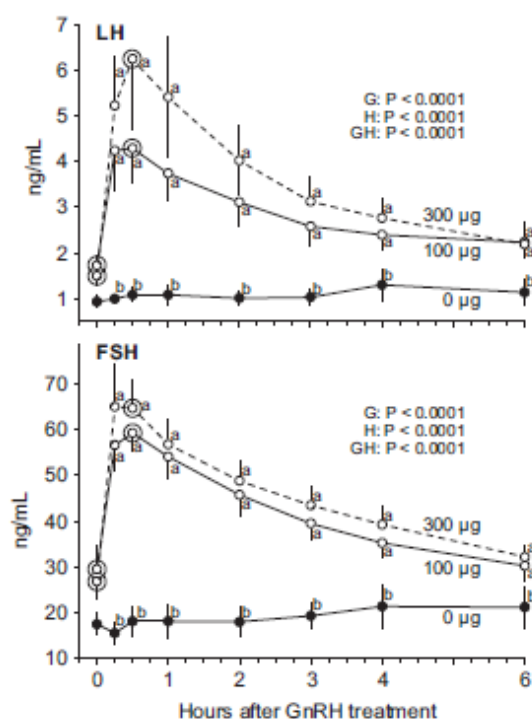


Fig. 1. Mean \pm standard error of the mean for concentrations of LH and FSH after a single treatment of 0 ($n = 9$), 100 ($n = 8$), or 300 μg ($n = 9$) of GnRH. Main effects of treatment group (G) and hour (H) and the interaction of group and hour (GH) that were significant are shown. For each gonadotropin group, means with a different letter within each hour are different ($P < 0.05$) among groups. An encircled mean indicates ($P < 0.05$) the beginning of an increase or decrease.

0- μg group. In each of the 100- and 300- μg groups, the RI decreased ($P < 0.004$) between hours 0 and 1 and increased ($P < 0.03$) between hours 1 and 3. The difference in RI between the 100- and 300- μg groups at hour 0 approached significance ($P < 0.09$). Therefore, RI was converted to percentage change from hour 0 for the 100- and 300- μg groups; the group effect and the interaction of group and hour were significant (Fig. 3, lower panel). The interaction was primarily from a greater percentage decrease in RI in the 100- μg group than in the 300- μg group at hours 0.25 ($P < 0.04$), 0.5 ($P < 0.03$), and 1 ($P < 0.02$).

For percentage of CL with Doppler blood flow signals, the main effects of hour and the interaction of group and hour were significant (Fig. 4, upper panel). The interaction represented primarily an increase in percentage of CL with blood flow Doppler signals during hours 0 and 1 in the 100- and 300- μg groups but not in the 0- μg group. There was no difference between the 100- and 300- μg groups when the 0- μg group was removed from the analysis. The difference between the combined 100- and 300- μg groups compared to the 0- μg group at hour 0 approached significance. Therefore, the combined 100- and 300- μg groups were compared with the 0- μg group by converting to percentage change from hour 0; the interaction was significant (Fig. 4, lower panel).

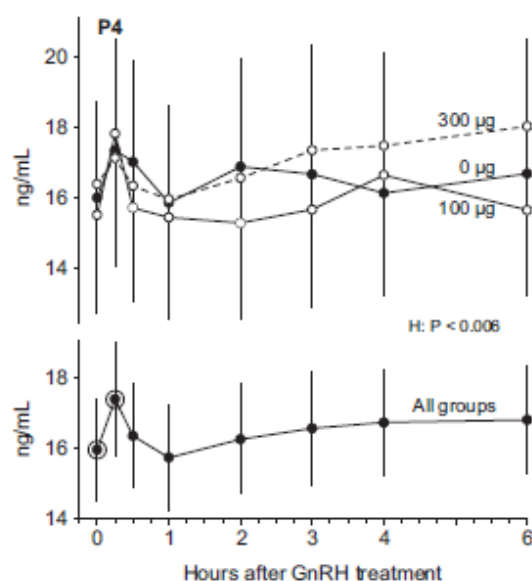


Fig. 2. Mean \pm standard error of the mean for concentrations of progesterone (P4) after a single treatment of 0 ($n = 9$), 100 ($n = 8$), or 300 μ g ($n = 9$) of GnRH. The main effect of hour (H) is shown. There was no effect of treatment group or an interaction, and all groups were combined (lower panel). An encircled mean (all groups) indicates ($P < 0.05$) the beginning of an increase or decrease.

The percentage change from hour 0 differed over hours ($P < 0.002$) in the combined 100- and 300- μ g groups but not in the 0- μ g group. Percentage change from hour 0 was greater ($P < 0.05$) at hours 0.5, 1, and 2 in the combined 100- and 300- μ g groups than in the 0- μ g group.

4. Discussion

The intravenous treatment of mares with GnRH on Day 10 or during the luteal phase [1] induced an increase in concentrations of both LH and FSH by the first posttreatment blood sampling at 15 minutes. In a reported study, a single treatment with a GnRH agonist on Day 10 increased the LH concentrations at the first posttreatment examination at 20 minutes, and concentration was greater than that in controls at the last examination 5 hours after treatment [9]. In the original equine study, GnRH induced a significant increase in LH by the first sampling at 0.25 hours during both anestrus and estrus [5]. In heifers, a single physiological dose of GnRH during the luteal phase stimulates an LH pulse that is similar to the characteristics and role of a natural LH pulse [43]. Further study is needed in mares on the relationships of GnRH to LH, FSH, and P4 during the luteal phase and on the factors that regulate release of GnRH into the venous portal system from the hypothalamus to the anterior pituitary [44].

Although the single treatment with either 100 or 300 μ g of GnRH on Day 10 increased the concentrations of LH, GnRH did not affect the concentrations of P4. Reported attempts to increase the concentration of P4 in mares by

GnRH have been inconsistent. A single treatment with a GnRH agonist on Day 10 increased the concentrations of LH but not P4 [9]. Pulsatile treatment of mares with GnRH beginning on Days 9 or 10 increased the circulatory concentrations of LH and P4 but not those of FSH [8]. Continuous infusion of GnRH throughout the estrous cycle also increased the P4 concentrations during the luteal phase [10]. These inconsistencies indicate a need for additional studies to clarify the effects of GnRH on P4 when given in different doses, during different endogenous concentrations of P4, and by single versus pulsatile delivery. The P4 transient increase at hour 0.25 followed by a decrease occurred in each of the three groups including the group that was given the 0- μ g dose (physiological saline). The reason for the transient P4 increase is not known but cannot be attributed to the GnRH treatment.

The increase in vascular perfusion of the CL ovary by the single treatment with GnRH was indicated by the decrease in blood flow RI in a prominent ovarian artery just before entry into the ovary. The increase in vascular perfusion occurred at the first examination 15 minutes after treatment. More frequent determination of RI will be needed for further information on the interval from treatment to response. The increase in percentage of blood flow Doppler

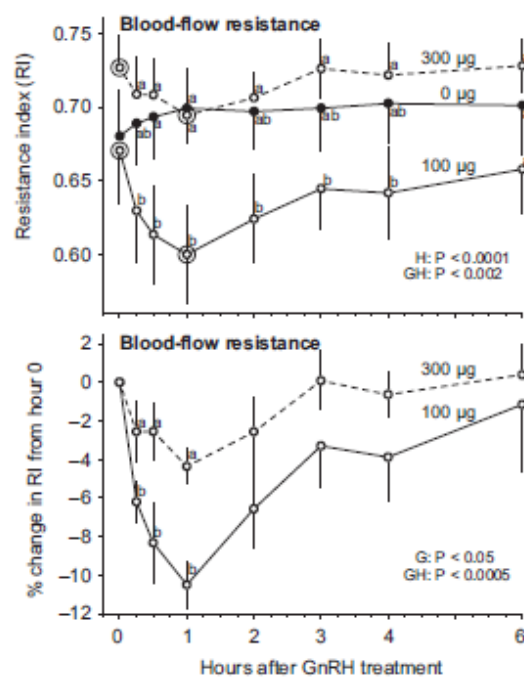


Fig. 3. Mean \pm standard error of the mean for blood flow RI at the ovarian artery before entry into the ovary after a single treatment of 0 ($n = 9$), 100 ($n = 8$) or 300 μ g ($n = 9$) of GnRH. Main effects of treatment group (G) and hour (H) and the interaction of group and hour (GH) that were significant are shown for RI (upper panel) and for percentage change in RI from hour 0 in the 100- and 300- μ g groups (lower panel). For each panel, means with a different letter within each hour are different ($P < 0.05$) among groups. An encircled mean (upper panel) indicates ($P < 0.05$) the beginning of an increase or decrease.

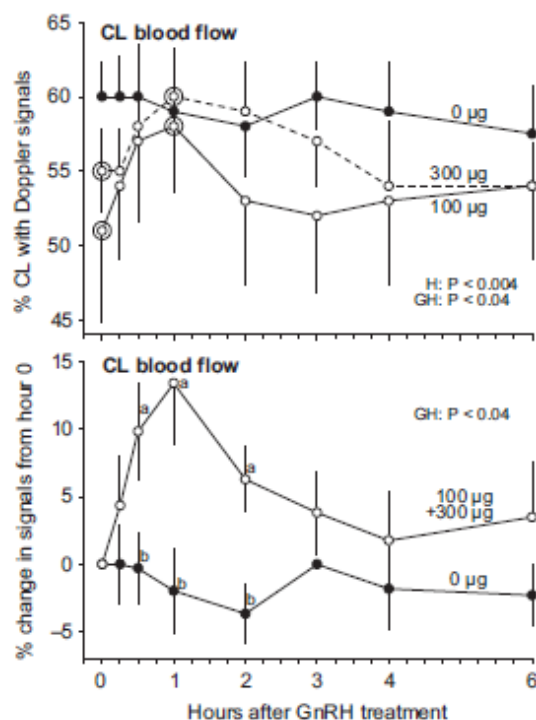


Fig. 4. Mean \pm standard error of the mean for percentage of CL with blood flow color Doppler signals after a single treatment of 0 ($n = 5$), 100 ($n = 5$), or 300 μg ($n = 5$) of GnRH. Main effect of hour (H) and the interaction of treatment group and hour (GH) that were significant are shown for percentage of CL with Doppler signals (upper panel) and for percentage change in Doppler signals from hour 0 (lower panel). There were no differences between the 100- and 300- μg groups, and the two groups were combined for comparing the percentage change from hour 0 between the combined groups and the 0- μg group (lower panel). An encircled mean (upper panel) indicates ($P < 0.05$) the beginning of an increase or decrease. Means with a different letter (lower panel) within each hour are different among groups ($P < 0.05$).

signals in the CL after GnRH treatment was consistent with the increase in ovarian vascular perfusion (decrease in RI). As an exception, the extent of CL blood flow did not differ between the 100- and 300- μg doses. The reason for the more pronounced increase in vascular perfusion with the low dose (100 μg) than with the high dose (300 μg) of GnRH is not known. Speculatively, the 300- μg dose may have been associated with the downregulation of an overdose. However, in the present study, LH concentrations were not significantly different between the doses of 100 and 300 μg . In this regard, an overdose of GnRH suppresses LH concentrations, whereas lower doses stimulate LH in both equine and nonequine species [45]. Further study will be needed to clarify these apparent contradictions.

The increased vascular perfusion of the CL ovary and the increased blood flow in the CL in response to GnRH in mares without a change in P4 concentration is a novel finding. In ewes, administration of LH induced an increase in both ovarian blood flow and circulating P4 [32]. In cows, treatment with hCG on Day 6 induced an increase in luteal

blood flow and plasma P4 within 1 hour [37]. In women, induction of ovulation with hCG was associated with an increase in ovarian arterial blood flow [46]. The effect of estrogen and hCG on blood flow in the CL has been studied using radioactive microspheres to measure blood flow in pseudopregnant rabbits [35]. Treatment with hCG caused an increase in P4 and an increase in blood flow to the nonluteal portion of the ovary but not to the CL. It was concluded that blood flow to the nonluteal tissue is regulated independently of blood flow to the CL. The positive effect of GnRH on the ovarian artery and the luteal vascular system in mares without an effect on P4 output indicates that GnRH, LH, or FSH has a direct positive effect on the ovarian blood vessels. Further study will be needed to determine whether the positive effect of LH involves the ovary containing the CL as well as the ovary without the CL during the luteal phase and the preovulatory follicle during the follicular phase.

Although the mechanisms involved in a positive effect of GnRH, LH, or FSH on the ovarian vascular system have not been determined in large animals, comparative information is available in laboratory animals. An acute increase in ovarian blood flow by LH has been reported for rats [30,47,48] and rabbits [29,31,35] but not for hamsters [49] or dogs [50]. In rats, the increase in ovarian blood flow occurred after LH treatment but not after FSH or prolactin treatment [47]. In another study, treatment with LH increased the ovarian blood flow and secretion of P4 and estradiol [30]. On the basis of the use of blocking agents, it was concluded that cyclic AMP, prostaglandins, and other vasoactive metabolites are involved in the effect of LH on ovarian blood flow in rats [30]. In rabbits, ovarian blood flow increased within 2 minutes after LH administration [31]. In another study in rabbits, both ovarian blood flow and P4 increased after LH treatment [29]. Indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, lowered the ovarian hyperemic response to LH but did not alter the P4 or estradiol concentrations. The possible roles of prostaglandins, cyclic AMP, and P4 in mediating the LH-induced hyperemia were discussed and reviewed. In women [51] and rats [52], the gonadotropins also influence the expression of vascular endothelial growth factor and alter angiogenic factors thereby providing an optimal ovarian blood supply. Apparently, it is not known whether the ovarian artery and the intraovarian vascular system of mares contain receptors for GnRH, LH, or FSH. However, in other domestic species [53,54] and laboratory species [55], extragonadal LH receptors are present in many portions of the reproductive tract including the uterine artery.

The direct or intermediate mechanisms for an effect of gonadotropins on the ovarian vasculature in mares are not known, but the reports on the studies in laboratory animals are useful in considering the direction of future studies. The demonstration in mares that GnRH treatment during the luteal phase induces an immediate increase in gonadotropins and in ovarian and luteal blood flow without a detected effect on P4 could be related to an effect of GnRH, LH, or FSH on the ovarian artery and CL vasculature. A direct effect of either FSH or GnRH cannot be discounted owing to inadequate consideration in previous studies. An effect of endogenous GnRH on the ovarian artery seems unlikely

owing to the local role of endogenous GnRH in the hypothalamic–pituitary area and the resulting low circulatory concentration [44]. However, GnRH and its receptors are also produced locally in the ovary of rats [55], but it is not known whether GnRH is produced in the ovaries of mares.

In mares, PGF2 α and nitric oxide are candidates for an intervening role in the effect of LH on the ovarian vessels. Attempts to demonstrate a direct positive effect of systemic treatment with PGF2 α on CL blood flow in horses using daily examinations have been unsuccessful [56,57]. Hourly sampling has shown that luteal blood flow does not increase during the ascending portion of the pulse of a PGF2 α metabolite in mares [58], although it does increase in cattle [59]. Nitric oxide is an intraluteal-derived factor that apparently mediates certain actions of PGF2 α in the CL and has vasoactive effects [60]. In mares, nitric oxide may have a role in luteolysis [61], but further study is needed.

The results of the present study indicate that the mare provides a useful model for determining the mechanism for an increase in ovarian blood flow after GnRH or gonadotropin treatment. The ovarian artery is accessible for noninvasive determination of the resistance to ovarian blood flow using transrectal color Doppler ultrasonography [40]. Furthermore, the prolonged ovulatory LH surge and large preovulatory follicle in this species [44] may also be useful for determining the role and mechanisms for an effect of gonadotropins on the ovarian artery during development of the preovulatory follicle.

4.1. Conclusions

Administration of a single dose of GnRH to mares on Day 10 after ovulation increased the circulatory concentration of LH and FSH, decreased the resistance to blood flow in the ovarian artery before entry into the CL ovary, and increased the percentage of the CL with color Doppler signals of blood flow. The circulating concentration of P4 was not altered by the GnRH treatment, despite the increase in LH. The increased ovarian vascular perfusion as indicated by the decreased blood flow resistance was greater for the low dose of GnRH (100 μ g) than for the high dose (300 μ g). The response to the high dose may have represented down-regulation from an overdose.

Acknowledgments

This research was supported by the Eutheria Foundation (Project E2-TC-15).

References

- [1] Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim Reprod Sci* 2006;95:144–50.
- [2] Broadley C, Menzies GS, Bramley TA, Watson ED. Isolation of cell populations from the mare corpus luteum: comparison of mechanical and collagenase dissociation. *J Reprod Fertil* 1994;102:7–15.
- [3] Roser JF, Evans JW. Luteal luteinizing hormone receptors during the postovulatory period in the mare. *Biol Reprod* 1983;29:499–510.
- [4] Kelly CM, Honey PB, Wise ME. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. *J Reprod Fertil* 1988;94:593–600.
- [5] Ginther OJ, Wentworth BC. Effect of a synthetic gonadotropin-releasing hormone on plasma concentrations of luteinizing hormone in ponies. *Am J Vet Res* 1974;35:79–81.
- [6] García MC, Ginther OJ. Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. *Am J Vet Res* 1975;36:1581–4.
- [7] Alexander SL, Irvine CHG. Effect of graded doses of gonadotropin-releasing hormone on serum LH concentrations in mares in various reproductive states: comparison with endogenously generated LH pulses. *J Endocrinol* 1986;110:19–26.
- [8] Johnson AL, Becker SE, Roma ML. Effects of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F-2 alpha on corpus luteum function and timing of the subsequent ovulation in the mare. *J Reprod Fertil* 1988;83:545–51.
- [9] Kanitz W, Schneider F, Hoppen HQ, Unger C, Nürnberg G, Becker F. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. *Anim Reprod Sci* 2007;97:55–62.
- [10] Williams GL, Amstalden M, Blodgett GP, Ward JE, Unnerstall DA, Quirk KS. Continuous administration of low-dose GnRH in mares: I. Control of persistent anovulation during the ovulatory season. *Theriogenology* 2007;68:67–75.
- [11] Watson ED, Pedersen HG, Thomson SRM, Fraser HM. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. *Theriogenology* 2000;54:599–609.
- [12] Watson ED, Colston M, Broadley C. LH and progesterone concentrations during diestrus in the mare and the effect of hCG. *Theriogenology* 1995;43:1325–37.
- [13] Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. First edition. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1979.
- [14] Pineda MH, Ginther OJ, McShan WH. Regression of corpus luteum in mares treated with an antiserum against an equine pituitary fraction. *Am J Vet Res* 1972;33:1767–73.
- [15] Baird DT. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci* 1992;28:95–102.
- [16] Donaldson LE, Hansel W. Prolongation of life span of the bovine corpus luteum by single injections of bovine luteinizing hormone. *J Dairy Sci* 1965;48:903–4.
- [17] Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1982;27:703–11.
- [18] Procknor M, Dahir S, Owens RE, Little DE, Harms OG. Temporal relationship of the pulsatile fluctuation of luteinizing hormone and progesterone in cattle: a time series cross-correlation analysis. *J Anim Sci* 1986;62:191–8.
- [19] Ginther OJ, Fuenzalida MJ, Shrestha HK, Beg MA. Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2011;40:77–86.
- [20] Ginther OJ, Fuenzalida MJ, Pugliesi G, Hannan MA, Beg MA. Effect of luteinizing hormone oscillations on progesterone concentrations based on treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist in heifers. *Domest Anim Endocrinol* 2011;40:119–27.
- [21] Ginther OJ, Shrestha HK, Fuenzalida MJ, Shahiduzzaman AKM, Hannan MA, Beg MA. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F2 α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology* 2010;74:1179–86.
- [22] Shrestha HK, Pugliesi G, Beg MA, Ginther OJ. Role of luteinizing hormone in changes in concentrations of progesterone and luteal blood flow during the hours of a simulated pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α (PGFM) in heifers. *Biol Reprod* 2011;85:482–9.
- [23] Ginther OJ, Bashir ST, Mir RA, Santos VG, Beg MA. Interrelationships among progesterone, LH, and luteal blood flow during a pulse of a PGF2 α metabolite and functional role of LH in the progesterone rebound in heifers. *Theriogenology* 2013;79:1110–9.
- [24] Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 2006;131:699–709.
- [25] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO. Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. *J Equine Vet Sci* 2007;27:20–7.
- [26] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003;125:759–67.

- [27] Siddiqui MAR, Ferreira JC, Gastal EL, Beg MA, Cooper DA, Ginther OJ. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. *Reprod Fert Develop* 2010;22:1110–7.
- [28] Brännström M, Zackrisson U, Hagström HG, Josefsson B, Hellberg P, Granberg S, et al. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril* 1998;69:435–42.
- [29] Varga B, Horváth E, Foly G, Stark E. Study of the luteinizing hormone-induced increase of ovarian blood flow during the estrous cycle in the rat. *Biol Reprod* 1985;32:480–8.
- [30] Lee W, Novy MJ. Effects of luteinizing hormone and indomethacin on blood flow and steroidogenesis in the rabbit ovary. *Biol Reprod* 1978;18:799–807.
- [31] Janson PO. Effects of the luteinizing hormone on blood flow in the follicular rabbit ovary, as measured by radioactive microspheres. *Acta Endocrinol* 1975;79:122–33.
- [32] Niswender GD, Reimers TJ, Diekmann MA, Nett TM. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol Reprod* 1976;14:64–81.
- [33] Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for the regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989;31:149–64.
- [34] Witt MC, Bollwein H, Probst J, Baackmann C, Squires EL, Sieme H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. *Theriogenology* 2012;77:1406–14.
- [35] Wiltbank MC, Gallagher KP, Dysko RC, Keyes PL. Regulation of blood flow to the rabbit corpus luteum: effects of estradiol and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1989;124:605–11.
- [36] Takasaki A, Tamura I, Kizuka F, Lee I, Maekawa R, Asada H, et al. Luteal blood flow in patients undergoing GnRH agonist long protocol. *J Ovarian Res* 2011;4:1–6.
- [37] Beirdorff N, Honnens A, Penno Y, Paul V, Bollwein H. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lutea. *Theriogenology* 2009;72:528–34.
- [38] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses, book 2. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1995.
- [39] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography, book 4. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 2007.
- [40] Ginther OJ, Utt MD. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *J Equine Vet Sci* 2004;24:516–26.
- [41] Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction* 2005;130:379–88.
- [42] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Regulation of circulating gonadotropin by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol Reprod* 2005;73:315–23.
- [43] Ginther OJ, Beg MA. Stimulation of a pulse of LH and reduction in PRL concentration by a physiologic dose of GnRH before, during, and after luteolysis in heifers. *Anim Reprod Sci* 2012;133:52–62.
- [44] Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. Second edition. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1992.
- [45] Montovan SM, Daels PP, Rivier J, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Lasley BL. The effect of a potent GnRH agonist on gonadal and sexual activity in the horse. *Theriogenology* 1990;33:1305–21.
- [46] Waseda T, Makinoda S, Watanabe Y, Sasakura C, Imafuku N, Hirotsuki N, et al. Hemodynamic response of ovarian artery after hCG injection. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:71–5.
- [47] Wurtman RJ. An effect of luteinizing hormone on the fractional perfusion of the rat ovary. *Endocrinology* 1964;75:927–33.
- [48] Piacsek BE, Huth JF. Changes in ovarian venous blood flow following cannulation: effect of luteinizing hormone (LH) and antihistamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;138:1022–4.
- [49] Varga B, Greenwald GS. Cyclic changes in utero-ovarian blood flow and ovarian hormone secretion in the hamster: effects of adrenocorticotropic, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1979;104:1525–31.
- [50] Stark E, Varga B. Role of prostaglandin E2 in the stimulatory effect of ACTH on ovarian blood flow. *Acta Med Acad Sci Hung* 1975;32:329–35.
- [51] Reisinger K, Baal N, Mckinnon T, Münstedt K, Zygmunt M. The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol* 2007;269:65–80.
- [52] Gomez R, Simom C, Remohi J, Pellicer A. Administration of moderate and high doses of gonadotropin to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod* 2003;68:2164–71.
- [53] Fields MJ, Shemesh M. Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals. *Biol Reprod* 2004;71:1412–8.
- [54] Ziecik AJ, Bodek G, Blitek A, Kaczmarek M, Wacławik A. Nongonadal LH receptors, their involvement in female reproductive function and a new applicable approach. *Vet J* 2005;169:75–84.
- [55] Schirman-Hildesheim TD, Bar T, Ben-Aroya N, Koch Y. Differential gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression patterns in different tissues of the female rat across the estrous cycle. *Endocrinology* 2005;146:3401–8.
- [56] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Effect of prostaglandin F2 α on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest Anim Endocrinol* 2007;32:315–28.
- [57] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Utt MD, Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim Reprod Sci* 2007;99:213–20.
- [58] Ginther OJ, Rodrigues BL, Ferreira JC, Araujo RR, Beg MA. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reprod Fert Develop* 2008;20:684–93.
- [59] Ginther OJ, Silva LA, Araujo RR, Beg MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 2007;76:506–13.
- [60] Skarzynski DJ, Jaroszewski JJ, Bah MM, Deptula KM, Barszczewska B, Gawronska B, et al. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F2-induced luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 2003;68:1674–81.
- [61] Ginther OJ, Wolf CA, Baldrighi JM, Greene JM. Relationships among nitric oxide metabolites and pulses of a PGF2 α metabolite during and after luteolysis in mares. *Theriogenology* 2015;84:193–9.