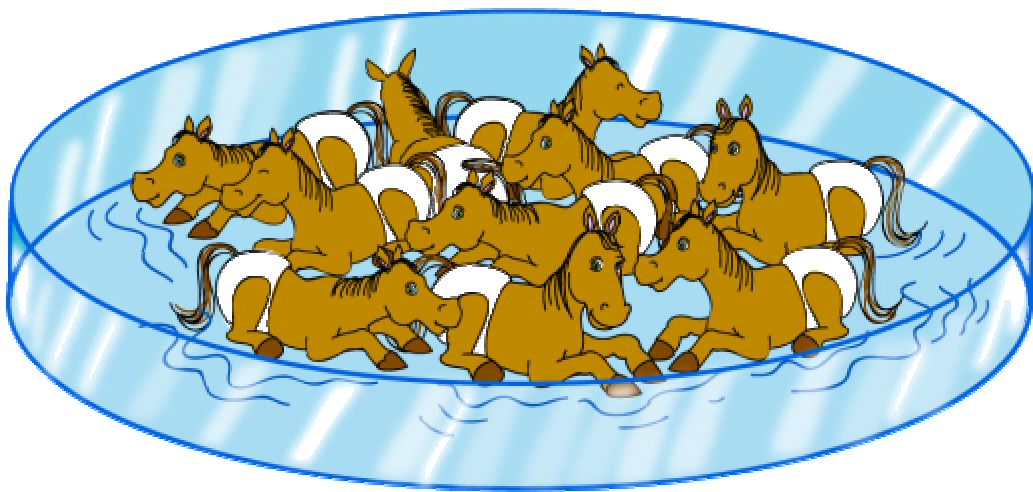


Márcio Teoro do Carmo

**Comparação entre doses constantes e
decrecentes de extrato de pituitária eqüina
na indução de superovulação em éguas**



Orientador: *Prof. Ass. Dr. Marco Antonio Alvarenga*

Botucatu – SP

2003

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

Carmo, Márcio Teoro.

Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária
eqüina na indução de superovulação em éguas / Márcio Teoro do Carmo. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução 2. Ovulação - Indução

CDD 636.1089262

Palavras-chave: Superovulação; Ovulação múltipla; Extrato de pituitária;
Transferência de embrião; Égua

Existem barreiras a serem quebradas,
bloqueios a serem liberados,
mas isso só pode ser feito
por você mesmo.
Quem poderá conhecer mais
um instrumento, do que aquele que o estuda
– e o toca, e o aperfeiçoa –
durante todo o tempo?

“Vivaldi Cunha Filho”

Queira, basta ser sincero e desejar profundo,
que você será capaz de sacudir o mundo.

“Raul Seixas”

Pegadas na Areia

«Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia, com o Senhor, e através do Céu passavam cenas da minha vida. Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia:

um era o meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso entristeceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor:

«Senhor, Tu me dissestes que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo todo o caminho mas, notei que durante as maiores atribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas.

Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixastes».

O Senhor me respondeu: «Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas da tua prova e do teu sofrimento. Quando viste na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que Eu, nos braços... te carreguei».



DEDICATÓRIA

Dizer palavras que não expresse o que eu sinto, seria algo insensato, elas existem e estão a vagar por todos os lados, no papel sinto-as escorrerem pelas margens, formando versos que tentem explicar a minha gratidão.

Dedico este regozijo momento a Deus pai e à mãe Aparecida padroeira do Brasil, por me conceder a satisfação de transpor mais um obstáculo que nos é impostos durante a jornada da vida.

Dedico a meus pais Esmeraldo e Maria Lúcia por ter - me ensinado a dar os primeiros passos de uma longa caminhada pelos vales da vida, e a meus irmãos (Cássio e Cristiane), sobrinho (Thiago), avós (em memória), avô José Teoro e ao Ricardo.

Dedico a minha avó Aparecida, que mesmo não estando mais ao nosso convívio, fez; faz e sempre fará parte da minha história.

Dedico aos meus tios: Laura, Antonio Celso, Maria Zélia, Maria Teoro, aos primos e a todos que fazem parte da nossa família.

Dedico a meus padrinhos Fernando Junqueira Meireles e Imaculada do Carmo Junqueira Meireles, por serem de forma direta e indireta os que me estimularam a exercer a profissão de Médico Veterinário, e principalmente pelo entusiasmo em trabalhar com a espécie eqüina.

A TODOS MEU MUITO OBRIGADO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Marco Antonio Alvarenga, pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos nestes dois anos, e por ter me dado a grande oportunidade de tornar realidade este título de mestre. E por ter financiado a presença da banca examinadora.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu - S.P. - Brasil e ao curso de pós-graduação da área de reprodução animal.

À CAPES (comissão de apoio ao pessoal de ensino superior) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal: Fernanda, Papa, Sony, João, Meira, Nereu, Denise, Eunice, e a seus orientados do curso de pós graduação: Claudia, Elen, Luiz Felipe, Karem, José Antonio, Itararé, José Victor, Bió, Neto, Denise, Letícia, Daniel, André, Hymerson, Luciana Takara, Leira, Christianne, Henrique, Fabiana, Viviane, Jussara, Carla, Isabel, Marcelo, Dorça, Fabiola, Marlúcia, Luciana Leal, Maria Ines.

Aos orientados do Prof. Marco Alvarenga: Antonio Sylvio, Milena, Renato, Karen, Gustavo, Alexandre.

Ao professor Doutor Carlos Fernandes, por ter-me incentivado a trabalhar na área de reprodução animal e na realização do mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução: Miguel, Valter, Márcio, Cristina, Tico, e aos funcionários da biblioteca.

À professora Lídia do Departamento de Bioestatística.

Ao Marco, Luciana Batalha e Edilson na edição da tese, e a Alessandra na realização do Abstract.

Aos médicos Veterinários Cássio L.N. Trinque, Marcelo Mandrá e Carlos Denipot, pela amizade e por transmitir-me seus conhecimentos.

Ao Haras e Centro Hípico Agromen, pela oportunidade profissional que me foi concedida.

Aos amigos de república: Felipe, Danilas, Wendel, Fábio, Maicol.

Aos residentes da Área de Reprodução Animal e aos alunos da graduação em Medicina Veterinária.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Transferência de embriões	20
2.2. Aspectos fisiológicos do ciclo estral da égua	24
2.3. Oogênese	27
2.4. Foliculogênese	30
2.5. Maturação oocitária	36
2.6. Processo da ovulação	39
2.7. Ovulações múltiplas espontâneas	41
2.8. Superovulação em ruminantes	44
2.9. Superovulação na espécie eqüina	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	72
3.1. Preparação do extrato de pituitária eqüina	72
3.2. Fase pré-experimental	73
3.2.1. Análise estatística	74
3.3. Fase experimental	74
3.3.1. Animais	74
3.3.1.1 Éguas	74
3.3.1.2 Garanhão	75
3.4 Monitorização das éguas	76
3.5 Protocolos superovulatórios	77
3.5.1 Descrição dos protocolos superovulatórios	78
3.5.1.1 Dose constante	79
3.5.1.2 Dose decrescente	79
3.6 Colheita dos embriões	81
3.7 Análise estatística	82

4	RESULTADOS	86
4.1	Fase pré-experimental	86
4.2	Fase experimental	88
5	DISCUSSÃO	109
5.1	Fase pré-experimental	109
5.2	Fase experimental	111
6	CONCLUSÕES	120
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
	ANEXOS	149
	ABSTRACT	154

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC Paint** = Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Paint
- ABCCBH** = Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Brasileiro de Hipismo
- ABCCC** = Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo Campolina
- ABCCM** = Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo Mangalarga
- ABCCMM** = Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo Mangalarga Marchador
- ABQM** = Associação Brasileira do Cavalo Quarto de Milha
- AMPc** = Adenosina monofosfato cíclica
- bFGF** = “Basic Fibroblast Growth Factor”
- Bi** = Blastocisto Inicial
- BI** = Blastocisto
- BSA** = Albumina Sérica Bovina
- Bx** = Blastocisto Expandido
- CIDR-B** = “Controlled Intravaginal Drug Release”
- Const.** = Constante
- Dec.** = Decrescente
- DPBS** = “Dulbecco’s Phosphate Buffer Saline”
- E2** = Estradiol - 17 β
- eCG** = Gonadotrofina Coriônica Equina
- eFSH** = Hormônio Folículo Estimulante Equino
- EGF** = “Epidermal Growth Factor”
- EPE** = Extrato de Pituitária Equina
- FIV** = Fertilização *in-vitro*
- Fol.** = Folículo
- FSH** = Hormônio Folículo Estimulante
- FSHp** = Hormônio Folículo Estimulante Suino
- GH** = Hormônio do Crescimento
- GI / GII** = Grau I / Grau II
- GIFT** = Transferência Intrafalópio de Gametas

hCG = Gonadotrofina coriônica humana

hMG = Gonadotrofina da Menopausa Humana

IA = Inseminação Artificial

ICSI = Injeção de Espermatozóide Intra - Citoplasmática

IGF1 / IGF2 = “Insulin – Like Growth Factor 1 / 2”

LH = Hormônio Luteinizante

MFP = Fator Promotor de Maturação

Mo = Mórula

N⁰ = Número

NIH-FSH-S₁ = National Institut Health-FSH-S₁

OMI = Fator Inibitor de Maturação do oócito

OV. = Ovulação

P₄ = Progesterona

PGF_{2a} = Prostaglandina F_{2α}

PMSG = Gonadotrofina do Soro da Égua Prenha

PSI = Cavalo Puro Sangue Inglês

rbsT = Somatotrofina Recombinante Bovina

Trat. = Tratamento

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de potros registrados ao ano, oriundos do programa de transferência de embriões em diferentes associações de criadores de cavalos no Brasil	23
Tabela 2 – Parâmetros médios das avaliações dos ejaculados do garanhão utilizados nos períodos compreendidos entre os 10 meses que antecederam o experimento e durante a realização do mesmo	76
Tabela 3 – Média e desvio padrão referente às variáveis: número de folículos, número de corpos lúteos, total de estrutura no ovário, número de oócitos e peso do ovário, segundo grupos	86
Tabela 4 – Média e desvio padrão das variáveis segundo doses constantes e decrescentes	91
Tabela 5 – Resposta superovulatória em éguas tratadas com o extrato de pituitária eqüina em doses constantes e doses decrescentes segundo número de ovulações pós inseminação artificial, número de embriões e o percentual de embriões recuperados	93
Tabela 6 – Número e percentual de éguas com ovulações múltiplas e embriões recuperados, segundo grupos	94
Tabela 7 – Correlação linear entre o número de folículos (10 – 15 mm e 16 – 20 mm) e o número de ovulações segundo grupos em doses constantes	95
Tabela 8 – Correlação linear entre o número de folículos (10 – 15 mm e 16 – 20 mm) e o número de ovulações segundo grupos em doses decrescentes	96
Tabela 9 - Correlação linear entre o número de folículos (10 – 15 mm e 16 – 20 mm) e o número de ovulações nos dois grupos estudados	97

Tabela 10 – Correlação linear do número de folículos entre 10 – 15 mm e 16 – 20 mm que culminaram com ovulações segundo grupo em doses constantes	98
Tabela 11 – Correlação linear do número de folículos entre 10 – 15 mm e 16 – 20 mm que culminaram com ovulações segundo grupo em doses decrescentes	99
Tabela 12 – Correlação linear do número de folículos entre 10 – 15 mm e 16 – 20 mm que culminaram com ovulações segundo os dois grupos estudados.....	100
Tabela 13 – Número total de folículos, ovulações e o percentual de ovulações segundo diâmetro folicular em diferentes grupos	101
Tabela 14 – Número e percentual do total de ovulações segundo os grupos no 1 ^o e no 2 ^o período de tratamento	102
Tabela 15 - Número e percentual do total de embriões recuperados segundo os grupos no 1 ^o e no 2 ^o período de tratamento	103
Tabela 16 – Média e desvio padrão das variáveis segundo 1 ^o e 2 ^o período de tratamento	104
Tabela 17 – Resposta superovulatória em éguas tratadas com o extrato de pituitária eqüina segundo o período de tratamento	105
Tabela 18 – Classificação morfológica dos embriões entre os grupos tratados em doses constantes e doses decrescentes	106
Tabela 19 – Grau de classificação embrionária entre os grupos tratados em doses constantes e doses decrescentes	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Intervalos entre os tratamentos superovulatórios	83
Figura 2 – Protocolo superovulatório segundo grupo tratado em doses constantes	84
Figura 3 – Protocolo superovulatório segundo o grupo tratado em doses decrescentes	85
Figura 4 – Número médio de corpos lúteos (CL) e oócitos recuperados de hamsters superovulados com extrato de pituitária eqüina em doses constantes (EPEc) e doses decrescentes (EPEd), e com a gonadotrofina corionica eqüina (eCG).....	87
Figura 5 – Número médio de corpos lúteos (CL) e oócitos recuperados de hamsters superovulados com extrato de pituitária eqüina em doses constantes (EPEc) e doses decrescentes (EPEd), e com a gonadotrofina corionica eqüina (eCG), induzidas às ovulações com hCG.....	87
Figura 6 – Número médio de ovulações (OV) e de embriões recuperados (Emb) segundo os tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária eqüina em doses constantes (EPEc) e doses decrescentes (EPEd)	92
Figura 7 – Número de ovulações segundo os grupos no 1 ^o e no 2 ^o período de tratamento	102
Figura 8 - Número de embriões recuperados segundo os grupos no 1 ^o e no 2 ^o período de tratamento	103

Figura 9 - Resposta ovariana de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina ao terceiro dia com folículos de diâmetro médio de 25 mm (A), quinto dia com folículos com diâmetro de 30 mm (B) e ao oitavo dia com folículos de diâmetro 35 mm (C) após o início do tratamento superovulatório.....107

Figura 10 - Embriões recuperados de éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina.....108

CARMO, M.T. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas. Botucatu, 2003, 14p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

RESUMO

Vários estudos têm relatado que a égua é refratária a todas as drogas rotineiramente utilizadas, visando superovulação em outras espécies, como o FSH e o eCG (Mc Cue, 1996). O extrato de pituitária eqüina (EPE) é um preparado parcial de gonadotrofina eqüina, e o único composto que consistentemente induz ovulações múltiplas em éguas (Squires et al, 1999); contudo, a resposta superovulatória tem sido baixa (1-3 ovulações/égua) (Mc Cue, 1996). Estudos mais recentes demonstram uma melhora no percentual de ovulações múltiplas em éguas superovuladas com a administração do EPE duas vezes ao dia (4-7 ovulações/égua), entretanto com baixa taxa de recuperação embrionária (Scoggin et al., 2002; Alvarenga et al., 2001). Este fato pode estar relacionado a produção de oócitos de baixa qualidade (anormalidade na maturação folicular e oocitária) (Dippert et al., 1994; Palmer et al., 1993), a falha do folículo em liberar o oócito e a dificuldade na captação do mesmo para o interior do oviduto, assim como o trânsito deste ou do embrião pelo oviduto (Dippert et al., 1994). O extrato de pituitária eqüina (EPE) foi preparado no laboratório do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu - SP, através do método proposto por Guillon & Combarnous, (1983). Seis éguas em bom estado nutricional, com idade variando entre quatro e 15 anos e massa corpórea de 400 a 500 Kg, além de um bom histórico reprodutivo, foram monitoradas diariamente durante os períodos compreendidos entre os meses de novembro (2001) a março (2002). Foram utilizados dois ciclos estrais de cada égua subdivididos em dois grupos: doses constantes e doses

decrecentes; porém entre os tratamentos esperou-se um intervalo de dois ciclos estrais. O experimento foi conduzido no posto de monta (UNESP) localizado na fazenda Lageado, município de Botucatu – SP. Para ambos os grupos o tratamento foi iniciado no sétimo dia pós-ovulação, utilizando éguas que apresentaram corpo lúteo bem evidente e folículo igual ou inferior a 25 mm de diâmetro na avaliação ultrassonográfica. No grupo 1 (doses constantes) foram administrados 25 mg do EPE a cada 12 h até que a maioria dos folículos atingisse o tamanho de 35 mm de diâmetro. No grupo 2 (doses decrescentes) foram administrados 40 mg/ do EPE a cada 12h; 35 mg a cada 12h; 30 mg a cada 12h; 25 mg a cada 12h; 20 mg a cada 12h; 15 mg a cada 12h; 10 mg a cada 12h; sendo que o tratamento foi interrompido quando a maioria dos folículos atingiu o diâmetro de ≥ 35 mm. Nos dois grupos, o hCG foi administrado na dosagem de 3.000 UI ao término do tratamento. A colheita dos embriões foi realizada no oitavo dia após a detecção da primeira ovulação, com o intuito de recuperar embriões em estágio de mórula a blastocisto expandido. Foi utilizado para a análise estatística o teste t de Student para avaliar o número de ovulações e embriões recuperados por égua, e o número de embriões recuperados por ovulações. O teste de Chi-quadrado e o de Goodman foram realizados para comparar proporções de éguas com diferentes números de ovulações entre os tratamentos. Para o estudo das correlações entre o número de folículos e de ovulações, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados demonstraram não haver diferença estatística entre os grupos tratados com doses constantes e decrescentes, quando comparado a duração do tratamento (8,0 e 7,7 dias respectivamente), o intervalo do início do tratamento à primeira ovulação (9,8 e 9,8 dias respectivamente), o intervalo da primeira à última ovulação (34,9 e 33,4 dias respectivamente), o número de ovulações e embriões recuperados (3,5 e 1,2; 5,0 e 1,8 respectivamente). Concluímos que a utilização de doses decrescentes de EPE propiciou uma melhora numérica, contudo, não matematicamente significativa na

superestimulação ovariana e nos índices de recuperação embrionária. Entretanto, se faz necessário outros estudos visando esclarecer os motivos da baixa taxa de recuperação embrionária, visto que, houve boa resposta superovulatória, porém o número de embriões recuperados por ovulações foi insatisfatório. Estudos mais aprofundados dos mecanismos que envolvem a maturação oocitária em éguas superovuladas, assim como, os mecanismos de ovulação e captação oocitária pelas fimbrias, bem como, o transporte deste através do oviduto e do embrião para o útero, são necessários.

Palavras chave: Superovulação, Ovulação Múltipla, Extrato de Pituitária Equina, Transferência de Embrião, Éguas.

1. INTRODUÇÃO

Com incessante trabalho de fomento, na indústria eqüina, faz-se necessário a incorporação de novas biotecnologias para se elevar e conservar os altos valores genéticos da espécie eqüina e principalmente entre as raças.

Na cosmovisão social e biotécnica, a transferência de embriões foi fundamental para a criação de cavalos no Brasil, acelerando o melhoramento genético nas diferentes raças eqüinas. Porém, os altos custos em manter as receptoras de embriões têm sido ponto limitante para uma maior difusão da técnica. Para minimizar estes custos, muitos trabalhos têm sido enfocados na tentativa superovulatória em éguas.

O tratamento superovulatório na espécie eqüina, assim como em ruminantes que apresentam ovulações simples, busca recrutar um maior número de folículos possíveis de uma onda folicular, sustentando o estímulo do seu desenvolvimento até o momento das ovulações (Meira and Buratini, 1998).

O principal objetivo da superovulação é o de elevar a eficiência reprodutiva e econômica dos programas de transferência de embriões, visto que, com a multiplicação do número de ovulações e conseqüentemente do número de oócitos viáveis para a fertilização, teríamos um maior número de embriões por égua doadora, sendo recuperados em uma única colheita (Andrade, 1986).

Contudo, todas as drogas rotineiramente utilizadas para superovular outras espécies, não têm sido efetivas para a espécie eqüina. O extrato de pituitária eqüina (EPE) é o único composto que se tem relato de sucesso na tentativa superovulatória em eqüinos, porém a resposta ao tratamento é baixa (1 a 3 ov/égua) comparada a outras espécies.

Baseando-se nos estudos com bovinos, foi demonstrado que um alto nível de LH presente no preparado do FSH afeta adversamente a resposta ovariana, a taxa de fertilidade e a qualidade dos embriões, fazendo-se necessária a administração gradativa do FSH e LH em doses

decrecentes ao invés de doses constantes, na tentativa de minimizar os danos na maturação folicular e oocitária (Monniaux et al., 1983).

Hyttel et al., (1989 e 1991), relataram uma assincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear nos oócitos de vacas superovuladas, supondo ser consequência da assincronia intrafolicular causada pelo variável e baixo suporte sangüíneo entre os folículos superestimulados.

A baixa resposta superovulatória e a baixa recuperação de embriões viáveis por colheita ainda podem estar relacionadas a fatores individuais (raça, causas genéticas ou fisiológicas, estado nutricional, estação do ano e repetições sucessivas de tratamento superovulatório) e a fatores relacionados ao tratamento superovulatório (momento do início do tratamento em relação ao ciclo estral, tipo de gonadotrofina utilizada, relação FSH e LH nos preparados, duração do tratamento, dose de gonadotropina e a via de administração) (Ginther et al., 1989; Totey et al., 1989; Gonzalez et al., 1990; Carbodevila and Torquatis, 1991; Pérez, 1996; Adams et al., 1992; Bo et al; 1993; Armstrong, 1993).

O desenvolvimento de técnicas que permitam superovular fêmeas é altamente desejável em programas de transferência de embriões e fertilização "*in vitro*". Contudo a égua tem sido refratária a protocolos até então desenvolvidos.

Resultados de recentes trabalhos, demonstraram que uma maior freqüência na aplicação do extrato de pituitária eqüina, melhorou significativamente a resposta superovulatória em éguas. Porém, os índices de recuperação de embriões foram baixos. Sabidamente este extrato contém altas concentrações de LH.

O uso de doses decrescentes com conseqüente decréscimo de LH, pode melhorar os índices de recuperação de embriões, pois como visto na espécie bovina, permite uma melhor maturação dos oócitos em animais superovulados (Monniaux et al. 1993).

O presente trabalho, teve por objetivo comparar o efeito da administração do EPE em doses constantes (a cada 12 horas) e doses

decrecentes (a cada 12 horas) sobre a resposta superovulatória e o percentual de embriões recuperados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transferência de embriões

A biotecnologia da transferência de embriões consiste na colheita de um oócito fecundado (embrião) de uma égua, doadora, com carga genética superior, sendo o mesmo transferido (inovulado) para o útero de uma outra égua, denominada de receptora, a qual terá a função de gerar e criar a prole (Andrade, 1986).

Em meados de 1890, na Universidade de Cambridge – Inglaterra, Walter Heaper realizou a primeira transferência de embriões em animais de laboratório (coelha), porém sem sucesso (Gonsalves et al., 2002). Seguindo a mesma linha de pesquisa, Gregory Pincus et al. (1929) obtiveram o primeiro produto de transferência de embriões em coelha (Andrade, 1986)

O primeiro relato da transferência de embriões na espécie bovina foi realizado por Willet et al. (apud Gonsalves et al., 2002) em 1951 na universidade de Wiscosin (EUA), resultando no nascimento do primeiro bezerro fruto da biotecnologia. Em 1960, o mesmo grupo de pesquisadores relataram a importância da sincronização do estro entre doadoras e receptoras.

Na década de 60, ocorreu um elevado avanço na transferência de embriões na espécie bovina e a partir da década de 70 na mesma espécie, houve um grande impulso para o programa comercial de embriões nos EUA, devido à modificação da técnica cirúrgica através da laparotomia medial sob anestesia geral inalatória e posteriormente a nível de flanco, para a técnica não cirúrgica trans-cervical, viabilizando e facilitando o uso desta técnica a nível de campo (Gonsalves et al. 2002).

No Brasil, o primeiro relato de transferência de embriões na espécie bovina foi realizado pelo Professor Doutor J. Hahn em 1977, na Universidade Federal de Santa Maria – R.S., viabilizando a técnica aos meados dos anos 80 para todo o país (Gonsalves et al. 2002).

Na espécie eqüina, os estudos envolvendo a transferência de embriões foram realizados em 1969 por um grupo de pesquisadores japoneses. O mesmo grupo de pesquisadores, relatou mais tarde (1972) uma taxa de 45% de sucesso nas colheitas dos embriões, porem nenhuma concepção foi confirmada (Oguri, N. and Tsutsumi, Y.,1972).

Dois anos depois, os mesmos pesquisadores seguindo a mesma linha de estudo, coletaram 18 embriões em 20 éguas, transferindo apenas 15 destes pelo método não cirúrgico transcervical para as éguas receptoras em sincronismo -5 a +7 em relação às éguas doadoras, obtendo um percentual de concepção de 40% dos embriões transferidos (Oguri, N. and Tsutsumi, Y.,1974). Estudos mais recentes têm demonstrado que o sincronismo entre as éguas doadoras e receptoras de embriões é fundamental para o sucesso da transferência de embriões, constatando que os melhores índices de gestações para as éguas receptoras são os sincronismos entre -3 e +1 em relação às éguas doadoras (sincronismo "0", é o dia da ovulação). (Mckinnon et al., 1988; Squires & Seidel, 1995; Peres et al., 2002)

O primeiro potro nascido fruto do programa de transferência de embriões foi relatado em 1972 na Inglaterra, utilizando – se da técnica cirúrgica (Andrade, 1986).

No Brasil, a transferência de embriões na espécie eqüina teve seu marco inicial em 1987, tendo sido introduzido no país pelo Médico Veterinário João Junqueira Fleury pelo método cirurgico (Fleury et al., 1987), pelos professores Marc Henry e Cezinande Meira pelo método não cirurgico (Henry & Meira, 1987) . As taxas de recuperação embrionária e de prenhez relatadas no Brasil, têm variado entre 48,3% a 83,3% e 45,5% a 80,0%, respectivamente aos relatos dos pesquisadores, Farinasso et al. (1989); Meira & Henry (1991); Pastorello et al. (1996).

A transferência de embriões, assim como qualquer outra biotecnologia reprodutiva, apresenta aplicações e limitações. A principal aplicação relatada por Meira & Buratini, (1998), visa elevar o nível genético da progênie, porém, os altos custos desta biotecnologia se

limitam principalmente aos gastos em manter as éguas receptoras, pelo fato de ter que esperar vários ciclos para receberem o embrião, desde que a espécie eqüina é monovulatória (Squires and Seidel, 1995).

Allen (1982), relata que as principais limitações na transferência de embriões estão relacionadas com a dificuldade da biotecnologia superovulatória e ao processo de congelação de embriões, desde que o sucesso da biotécnica da congelação de embriões equivale aos embriões em fase de mórula (Squires et al., 1999).

Dentre os fatores que possam influenciar a taxa de prenhez em um programa de transferência de embriões, podemos citar: o método de inovulação, sincronização doadora e receptora, qualidade dos embriões, condições nutricionais e uterina das doadoras e das receptoras e o manejo geral das receptoras (Squires et al., 1999).

No início da década de 70, apenas a associação americana da raça Quarto de Milha abriu seu livro de registros para os potros nascidos frutos da biotecnologia da transferência de embriões (Squires et al., 1999).

Hoje em dia muitas associações e criadores de cavalos estão se beneficiando da técnica, como é o caso das associações brasileiras dos criadores de cavalos da raça Brasileiro de Hipismo (ABCCBH), da raça Mangalarga Marchador (ABCCMM), da raça Mangalarga (ABCCM), da raça Quarto de Milha (ABQM), da raça Árabe (ABCCA), da raça Paint Horse (ABCPaint) e da raça Campolina (ABCCC).

Estima-se que aproximadamente 1.500 potros nascidos oriundos do programa de transferência de embriões são registrados ao ano nos EUA (Squires et al., 1999). No Brasil, estudos recentes demonstraram um crescente aumento na utilização desta biotécnica nos últimos três anos, sendo hoje o país que mais emprega esta técnica no mundo (aproximadamente 2000 potros/ano) obtendo um percentual médio do crescente desenvolvimento entre os anos de 1999 e 2001 de 60% dos potros registrados nas diferentes associações de criadores de cavalos (Carmo & Alvarenga 2003, dados não publicados).

Em um relato mais detalhado, podemos citar em ordem cronológica as associações brasileiras que mais se beneficiaram com a biotécnica da transferência de embriões na tabela 1:

Tabela 1 - Número de potros registrados ao ano, oriundos do programa de transferência de embriões em diferentes associações de criadores de cavalo no Brasil

PARÂMETROS	1998	1999	2000	2001
ABCCMM	443	676	795	1.052
ABCCM	181	304	251	380
ABCCBH	#	131	119	130
ABCCC	#	05	57	154
ABC Paint	01	03	75	120
ABQM	01	06	15	12
ABCCA	-	-	06	12
TOTAL	626	1125	1318	1860

Dados não fornecidos

- Não há registros

ABCCMM (Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo da raça Mangalarga Marchador)

ABCCM (Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo da raça Mangalarga)

ABCCBH (Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo da raça Brasileiro de Hipismo)

ABCCC (Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo da raça Campolina)

ABC Paint (Associação Brasileira do Cavalo Paint)

ABQM (Associação Brasileira do Quarto de milha)

ABCCA (Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo da raça Árabe)

Aplicações da transferência de embriões ainda é restrita devido ao seu alto custo, sendo delineada para animais de alto valor genético, principalmente para animais que atuam nos palcos esportivos e de exposições (Squires et al., 1999).

2.2. Aspectos fisiológicos do ciclo estral da égua

O ciclo estral da espécie eqüina é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, estro e diestro (Andrade, 1986), podendo também denominá-las de fase folicular e fase luteal (Dieleman et al., 1986), que são intervaladas entre dois períodos sucessivos de cio (Andrade, 1986).

A fase de estro ou fase folicular em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo dominante de 30 mm de diâmetro (Ginther, 1992) no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa. Em éguas Poneis, Ginther et al. (2002) relataram uma dominância “desviation” folicular com 22,5 mm.

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos, induzem o comportamento de estro e a elevação dos níveis de LH pela ativação dos seus receptores na célula da granulosa, consequentemente a ovulação e a formação do corpo lúteo através da retroalimentação positiva no sistema hipotalâmico e hipofisário (Luque et al, 1983; Hafez, 1995).

A elevação dos níveis de estrógenos durante a fase estral é responsável pela instalação do edema uterino; o qual, tende a ser diminuído em dois dias que antecedem a ovulação (Buratini, 1997; Mckinnon and Carnevale, 1993).

Já a fase de diestro ou luteal é caracterizada pelo término das manifestações dos sinais do cio, que ocorrem entre 24 h e 48 h após a ovulação, resultado da formação do corpo lúteo (Neely et al., 1989). Sirois, et al., (1986), consideram a ovulação como o início da fase luteal, e a fase final culminando com a luteólise do corpo lúteo, apresentando níveis plasmáticos de progesterona inferiores a 1 ng/ml.

Na fase luteal, o corpo lúteo produz progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia pós-ovulação. Esta secreção se mantém estável até o décimo segundo dia, quando ocorre uma queda acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona, ocasionando

a luteólise entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo estral (Ginther, 1992).

As fêmeas eqüinas por apresentarem atividade sexual durante a fase de maior luminosidade, são classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais. Elas atingem a maturidade sexual quando alcançam a puberdade, o que ocorre por volta dos dois anos de idade, podendo ser esta alterada pela influência das condições corporais, peso, níveis de energia, ferormônio e a estação do ano (McKinnon & Voss, 1992).

A duração do ciclo estral da égua tem sido considerado variável por alguns autores. Esta variabilidade, podem ser de origem racial, individual e principalmente da natureza dos dados computados, como é o caso das aquisições dos dados de diferentes técnicos, em diferentes ambientes e de diferentes métodos de avaliação do estro além da dificuldade de predizer as fases exatas do estro e do diestro (Ginther, 1992; McKinnon & Voss, 1993; Neely et al., 1991; Hafez, 1995).

O período do ciclo estral, estro e diestro, tem sido relatado por Ginther (1992) como sendo em média de, 21,7 (19,1 a 23,7), 6,5 (4,5 a 8,9); 14,9 (12,1 a 16,3) dias respectivamente.

Com o uso da ultra-sonografia na reprodução equina na década de 80, uma maior precisão da atividade ovariana, no que diz respeito ao recrutamento, crescimento, divergência e atresia folicular, pôde ser estudada (Palmer and Driancourt, 1980), tendo sido caracterizada a dinâmica folicular aos mecanismos reguladores hormonais (Mapletoft et al., 1994; Fortune, 1994).

As éguas podem apresentar uma ou duas ondas foliculares (Sirois et al., 1989; Ginther, 1990), havendo uma maior predisposição a uma única onda. Há trabalhos que indicam uma tendência a duas ondas foliculares na primeira metade da estação reprodutiva (Pierson & Ginther, 1987; Ginther & Pierson, 1989; Ginther, 1990) e uma maior tendência a uma onda folicular na segunda metade da estação reprodutiva (Ginther, 1990; Buratini, 1997).

O estudo comparativo da dinâmica folicular entre raças, tem indicado uma maior predisposição a duas ondas foliculares para as raças PSI (Stabenfeldt et al., 1972), Apallosa e Quarto de Milha (Ginther & Bergfeld, 1993), quando comparadas com as raças Árabe e Pônei (Ginther, 1992; Dimmick et al., 1993) na primeira metade da estação reprodutiva.

Em estudos realizados por Buratini (1997), a duração média do intervalo interovulatório para ciclos que apresentaram uma ou duas ondas foliculares maiores foram de 19,4 e 23,3 dias respectivamente.

O crescimento diário dos folículos recrutados pelas ondas foliculares, pode variar de 2,5 a 3,0 mm (Ginther, 1986). Porém, quando se beneficiam da estimulação ovariana através de preparados hormonais, o crescimento folicular diário pode alcançar 3,0 mm ou mais (Moura & Merkt, 1996). Palmer et al. (1993) relataram um desenvolvimento folicular de 2,1 mm ao dia em éguas pôneis superovuladas com o EPE.

A atividade ovariana também tem sido estudada entre éguas jovens, adultas e idosas, apresentando uma maior queda desta atividade a partir dos 15 anos de idade, onde se pode notar um atraso na emergência das ondas foliculares, no prolongamento do intervalo interovulatório e na redução da população de folículos nas ondas foliculares (Ginther & Bergfeld, 1993; Carnevale et al., 1995).

Estas alterações são provavelmente devido a um menor número de folículos e disposição dos mesmos a serem recrutados, e uma menor resposta aos estímulos gonadotróficos, já que os níveis de FSH liberados pela pituitária não são alterados ao decorrer da idade (Ireland, 1987).

2.3. Oogênese

A origem das gônadas se dá através do nefrom, que é um órgão com uma estrutura bilateral, alongado, formado a partir do mesoderma embrionário e composto por três porções: o pronefro (origina os rins), o mesonefro (origina os rins) e o metanefro (compõe a eminência genital que origina as gônadas) (Austin & Short, 1982; Byskov, 1986).

Os dutos paramesonéfricos ou dutos de Muller e os dutos mesonéfricos ou dutos de Wolff, estão presentes no embrião sexualmente indiferenciado. Os dutos de Muller na diferenciação sexual, desenvolvem-se em um sistema de duto-gonadal, que se unem na sua porção caudal dando origem a toda a porção tubular da fêmea (útero, cérvix e a porção anterior da vagina) (Byskov, 1986; Hafez, 1995a).

Os dutos de Wolff, sofrem atrofia nas fêmeas e originam-se em uma estrutura vestigial presente na vagina, denominada de duto de Gartner (Byskov, 1986).

Se não ocorrer o estímulo para a diferenciação sexual, as gônadas primitivas (eminência genital) do embrião feminino (XX), transformam-se espontaneamente em ovário, que ao contrário dos testículos, permanecem na cavidade abdominal migrando para a região caudal aos rins, permanecendo definitivamente por toda a vida do indivíduo (Ohno, 1985; Byskov, 1986).

Os ovários desempenham duas importantes funções, uma exócrina ou gonadal (produção e liberação de oócito) e outra endócrina (produção e liberação de hormônios) (Hafez, 1995, Youngquist, 1997).

Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (Pineda, 1989), portanto, a produção do gameta feminino é resultante da interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (Saumande, 1981).

A oogênese é considerada como o processo de formação, crescimento e maturação do gameta feminino (Austin & Short, 1982;

Ginther, 1992), iniciando-se na fase embrionária, através da formação das células germinativas primordiais originárias das células tronco embrionária, e termina na fase de puberdade por ocasião da fecundação (Austin & Short, 1982)

As células germinativas primordiais são oriundas do saco vitelínico. Elas inicialmente migram para o epitélio embrionário e posteriormente para o mesênquima da crista genital, colonizando a gônada indiferenciada ainda na vida fetal (Wassarman, 1988). Nesta fase as células germinativas primordiais sofrem o processo de mitose, recebendo a denominação de oogônias ao redor dos 50 dias de gestação na espécie equina (Deansly, 1978).

O processo de mitose da célula, é constituído de quatro fases: diplóteno-2n, síntese de DNA, 4n e a divisão mitótica que é subdividida em prófase, pró-metáfase, metáfase e telófase (Gordon, 1994).

Na fase de telófase da subdivisão mitótica, a célula que apresentava 4n cromossomos volta a apresentar 2n cromossomos, devido a divisão ou separação das cromátides irmãs (Austin and Short, 1982), dando origem a uma linhagem de células oogoniais e a uma outra célula que permanece em interfase que se divide periodicamente, originando-se em nova célula germinativa que diferenciará em oogônia (Russe, 1983).

Numa fase pré-meiótica da prófase I, denominada de preleptóteno, o gameta com 2n cromossomo tem seu DNA duplicado pela síntese de DNA (Sagata, 1996), dando início à meiose e transformando a oogônia em oócito (Gordon, 1995a).

O processo da meiose, ocorre aproximadamente entre 75 e 160 dias de gestação na égua (Ginther, 1992). É caracterizado pela presença do gameta 2n cromossomo, que sofre a primeira divisão meiótica, passando pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno da prófase I, dando origem a uma célula haplóide (1n cromossomo) (Picton, 2001).

Nesta fase de profase I da meiose, forma-se o oócito primário, que se apresenta recoberto por uma fina camada de células da granulosa no folículo primordial, permanecendo quiescente no estágio de diplóteno,

conhecido como estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa da primeira prófase meiótica até a puberdade, quando os folículos selecionados estarão aptos a ovularem (Picton, 2001).

Todos os oócitos que não forem incorporados aos folículos primordiais, serão degenerados, porém os folículos primordiais estabelecidos serão recrutados pelas ondas foliculares, pelo resto da vida dos animais, ou até o final da atividade ovariana (Gosden & Telfer, 1987ab).

Na fase pré - puberal, imediatamente antes da ovulação, reinicia-se a divisão meiótica e a vesícula germinativa passa para o estágio de diacinese, quando em seguida ocorre o rompimento da vesícula germinativa, a condensação cromossômica e a organização dos cromossomos no plano equatorial, correspondendo ao estágio da metáfase I (Gordon, 1994).

Em seguida, ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar e o oócito passa a ser denominado de secundário, correspondendo às fases de anáfase I e prófase I (Vanderwall, 1996). A partir desse momento, inicia a segunda divisão meiótica em estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (Gordon, 1994).

Nesta fase, o oócito já possui maturação nuclear completa e está preparado para a fecundação do espermatozóide, o qual se houver a fertilização do oócito, inicia a segunda divisão da meiose, passando pelos estágios de anáfase II (Cromatidas separadas), telófase II e zigoto ou oócito terciário, ocorrendo a expulsão do segundo corpúsculo polar e originando o pró-núcleo masculino e o pró-núcleo feminino, dentro do espaço perivitelíneo (Goudet et al., 1998).

Em alguns casos, o oócito equino imaturo em metáfase I da meiose pode ser encontrado no oviduto, onde será maturado e concluído a metáfase II da meiose (Vanderwall, 1996).

A partir do início da foliculogênese embrionária até a fase de sub-fertilidade senil da fêmea, haverá uma diminuição progressiva do número de oócitos (Andrade, 1986).

2.4. Foliculogênese

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia com o desenvolvimento das oogônias e a formação do folículo primordial, e culmina com a formação do folículo De Graaf também denominado de folículo pré-ovulatório ou de folículo maduro (Picton, 2001).

O folículo é a unidade funcional do ovário, que tem a finalidade de propiciar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito e a produção de hormônios esteróides (Gordon, 1994).

Os mamíferos apresentam milhares de folículos ao nascimento, constituindo uma grande reserva folicular (Downs, 1993; Beckers et al. 1996), dos quais apenas 0,01% resultam em ovulação durante a vida reprodutiva, ocorrendo a atresia dos demais no decorrer das fases de crescimento e maturação (Carrol et al. 1990).

Estima-se que a população folicular ovariana na espécie bovina e humana ao nascimento é de 235.000 e 2.000.000 respectivamente (Erickson, 1986; Betteridge et al., 1989), porém na espécie equina não há relatos.

A população folicular presente nos ovários pode variar em relação ao indivíduo, a espécie, a raça e a genética (Peters, 1976; Cahill et al., 1979; Gosden & Telfer, 1987a, 1987b; Roy and Treacy, 1993, Smith et al., 1994).

Os pesquisadores Driancout & Palmer (1984) relataram a presença de aproximadamente 36.000 folículos primordiais e 100 folículos em desenvolvimento em éguas Pôneis com atividades cíclicas normais, através do exame histológico ovariano.

Até bem pouco tempo acreditava-se que os folículos ovarianos não atresícos resultantes do estágio fetal, iniciavam o seu desenvolvimento ininterruptamente de uma forma aleatória, independente das fases do ciclo estral ou gestação (Ginther, 1992). Hoje em dia, este

conceito se modificou e sabe-se que os grupos de folículos iniciam o seu desenvolvimento sincronicamente em determinados períodos do ciclo estral (Austin & Short, 1982; Ginther, 1992).

Os folículos ovarianos são preenchidos internamente por um fluido viscoso denominado de líquido folicular que apresenta em sua composição líquida os hormônios esteróides, principalmente o estradiol (em quantidades crescentes com o desenvolvimento folicular) e a progesterona (presente em folículos em atresia e próximos à ovulação). (Hafes, 1987).

Outros hormônios não esteróides fisiologicamente ativos também estão presentes no líquido folicular, como o O.M.I (fator inibidor da maturação do oócito) e a inibina (em quantidade crescente no final do desenvolvimento folicular). A composição e a quantidade do líquido folicular modifica-se com o desenvolvimento do antro folicular (Hafez, 1987).

As principais funções do líquido folicular segundo Hafez (1995); são:

- Regulação das funções das células da granulosa, início do crescimento folicular e esteroidogênese,
- Maturação do oócito, ovulação e transporte do oócito para a trompa,
- Preparação do folículo para a formação do subsequente corpo lúteo,
- Fatores estimulantes e inibidores no fluido que regulam o ciclo folicular.

Em relação à pressão do fluido folicular no processo da ovulação, Janson (1975), demonstrou um aumento no volume folicular relacionado ao aumento no fluxo sanguíneo e diminuição na resistência vascular induzido pelo LH.

Entretanto, antes da ruptura folicular, ocorre um aumento acentuado no volume do fluido e um aumento na distensibilidade das

células da granulosa na parede folicular, e o decréscimo na força elástica permitem que a ruptura folicular (ovulação) ocorra sob pressão (Rondell, 1964).

O desenvolvimento folicular nas espécies monovulatória é subscrito em três fases: a primeira, inicia-se com a ativação do folículo primordial, a segunda, ocorre o recrutamento e o crescimento folicular, e a terceira ocasionando a seleção de um ou dois folículos dominantes e atresia dos folículos subordinados (Ginther & Bergfelt 1993).

De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser subdivididos em pré-antrais, que são constituídos pelos folículos primordiais, folículos primários e folículos secundários; e antrais, que compreendem os folículos terciários e os folículos De Graaf (Hafez, 1987; Fortune, 1994; Hulshof, 1995).

Os folículos pré-antrais, compõem a fase mais longa e são dependentes de fatores ovarianos intrínsecos (regulado pelo próprio ovário, ou seja, substâncias e mecanismos que atuam na própria célula) (Austin & Short, 1982).

Já os folículos antrais, são caracterizados pelo desenvolvimento do antro quando os folículos atingem aproximadamente 300 µm de diâmetro na espécie eqüina, e são regulados pela hipófise, ou seja, é dependente do FSH e LH, além da ação do estrógeno produzido pelo próprio folículo.(Hafez, 1995).

Nesta fase, ocorre um aumento no tamanho do oócito e a formação de duas sub-camadas de células da teca (interna e externa) que são formadas ao redor das células da granulosa (Driancourt et al., 1991). As células da granulosa nesta fase, organizam-se em múltiplas camadas ao redor do oócito, formando o Cumulus oóphorus (Kenney et al., 1979).

Alguns autores têm relatado uma forte evidência em ovelhas, mulheres, vacas e porcas, que o gene que codifica o receptor para FSH, não é expresso antes que o folículo atinja o grau do desenvolvimento da formação do antro folicular (Tisdall et al., 1995; Xu et al., 1995; Yuan et al., 1996).

Outros pesquisadores contradizem estas evidências, relatando a presença de um estímulo gonadotrófico para a ativação e para o crescimento dos folículos pré-antrais (Hirshfield, 1991; Van Wezel & Rodgers, 1996).

Os mecanismos reguladores do desenvolvimento do folículo pré-antral, ainda não são completamente esclarecidos, acredita-se que o fator de crescimento β (TGF – β) expressado pelo oócito, pode ser o mediador para o crescimento do folículo pré-antral (Mcnatty et al., 1999; Elvin et al., 2000).

Os folículos primordiais são os primeiros a serem formados e os menores folículos encontrados no ovário, representando um pool de folículos do qual alguns serão selecionados até tornarem-se folículos dominantes, sendo então considerados a unidade reprodutiva fundamental do ovário (Eppig & O'Brien, 1996).

Estes folículos primordiais são constituídos de um oócito dictiano centralizado e circundado por uma única camada de células da granulosa de forma achatada ou pavimentosa, demarcada por uma membrana basal (Eppig & O'Brien, 1996; Fortune, 1994). Eles compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário dos mamíferos (Erickson, 1986).

A ativação dos folículos primordiais se faz necessário para que haja a passagem dos folículos quiescentes em uma reserva, para o pool de folículos em crescimento (Russe, 1983). O primeiro sinal desta ativação é o retorno da proliferação das células da granulosa, transformando o formato achatado da célula para o formato cuboidal, culminando com o aumento do tamanho do oócito, ocorrendo a passagem do estágio de folículo primordial para o estágio de folículo primário (Hirshfield, 1995).

Van Wezel & Rodgers, (1996), sugerem que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais são dependentes de nutrientes ovarianos, fatores de crescimento é pouco dependente da ação do

hormônio gonadotrófico, o que contradiz com Hafez, (1987) que relata a total ausência da ação das gonadotrofinas hipofisárias nesta fase.

Alguns folículos primordiais iniciam seu crescimento tão logo sejam formados, enquanto outros permanecem quiescentes por vários meses ou anos (Hirshfield, 1992, Van Wezel & Rodgers, 1996).

Os folículos primários, são caracterizados pela presença de um oócito central circundado por uma camada de células da granulosa com formato cuboidal, representando o primeiro estágio do crescimento folicular (Hyttel, et al., 1997).

Este estágio inicial do crescimento folicular é ininterrupto, inclusive por ocasião da gestação, lactação, bem como após a hipofisectomia (Hirshfield, 1991). O crescimento do folículo primário, é pouco dependente das gonadotrofinas hipofisárias, fazendo-se necessário à ação dos fatores de crescimento (Hirshfield, 1985).

Os folículos secundários, apresentam um oócito com as mesmas características que os folículo primários, porém maior e circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa com o formato cúbico (Hyttel, et al., 1997). Nesta fase, ocorre a diferenciação das células da teca, que são formadas pela organização em seguimentos paralelos das fibras de tecido conjuntivo (Hirshfield, 1991) e o espaçamento da zona pelúcida, a qual circunda o oócito (Figueiredo, 1995).

Eppig (1992) relatou que tanto o crescimento do oócito como a proliferação das células da granulosa, são processos independentes de gonadotrofina em folículos pré-antrais, o que contradiz o relato de Hirshfield (1985); portanto deduz-se que tanto na fase de folículo primordial como nas fases de folículo primário e folículo secundário, podem ou não sofrer a ação destes hormônios.

Estudos in vitro em folículos pré-antrais, têm demonstrado que os fatores de crescimento como Epidermal Growth Factor (EGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Jewgenow, 1996), e o insulín – like Growth Factor (IGF-1 e IGF-2), bem como o FSH (Nuttinck et al., 1996), estão envolvidos na proliferação e diferenciação das células da granulosa

e na esteroidogênese, que é de extrema importância na estimulação de receptores para LH nas células da granulosa, tal qual para o comportamento sexual do estro.

Os folículos terciários, são caracterizados em sua fase inicial como folículos antrais, constituídos por um oócito circundado por várias camadas de células da granulosa que se organizam para a formação do Cumulus oóphorus (Hyttel, et al., 1997).

Nesta fase, surge o aparecimento de uma pequena cavidade contendo líquido folicular denominada de antro, apresenta também uma membrana basal e duas camadas de células tecaais que são denominadas de teca interna e teca externa (Figueiredo, 1995).

O desenvolvimento dos folículos terciários estão diretamente relacionados com a gonadotrofina hipofisária, assim como os fatores de crescimento e os fatores extra-ovarianos como é o caso do hormônio do crescimento (GH) (Hirshfield, 1991).

Na fase final do folículo terciário, ocorre um aumento da sensibilidade das células da granulosa ao FSH, o aparecimento e ativação dos receptores de LH nas células da granulosa e um aumento da atividade aromatase nas células da granulosa, resultando na formação do folículo De Graff (Monniaux et al., 1993).

2.5. Maturação oocitária

A meiose no oócito têm início durante a vida pré-natal ou logo após o nascimento, sendo interrompida no estágio de diplóteno da prófase (primeira parada meiótica). O oócito entra no estágio dictiatio quando seu núcleo se torna proeminente (referido como vesícula germinativa), permanecendo estático. Durante a vida fértil, em cada ciclo sexual, será retomada a meiose apenas no oócito do folículo De Graff selecionado pelo pico pré-ovulatório das gonadotrofinas (Ayalon et al., 1972).

Prince & Smith (1997), relataram que a cada ciclo ovulatório, as centenas de oócitos primários que foram recrutados para o pool de crescimento através de mediados estímulos pelos hormonais gonadotróficos, reassumem a divisão meiótica, chegando até a metáfase da segunda divisão meiótica, sendo todos esses passos compreendidos entre o final da prófase I e a metáfase II.

Este processo é genericamente conhecido por processo de maturação meiótica e compreende sucessivamente a dissolução da membrana nuclear oocitária ou quebra da vesícula germinativa, condensação da cromatina, separação dos cromossomos homólogos, emissão do primeiro corpúsculo polar e parada da divisão na metáfase II com os cromossomos alinhados no fuso mitótico Prince & Smith (1997).

Contudo, a maturação meiótica que ocorre no oócito se refere especificamente à conversão dos oócitos inférteis presente nos folículos, em oócitos férteis imediatamente antes da ovulação, através dos processos de maturação nuclear e citoplasmática (Landim-Alvarenga, 1999).

A maturação oocitária na espécie eqüina é procedida com o aumento gradativo de LH na fase estral, alcançando o seu nível máximo no segundo dia após a ovulação (Miller et al., 1980; Ginther, 1992).

Kenney et al. 1979, relataram que os níveis de estradiol-17 β (E2) no fluido folicular, permanecem elevados em folículos pré-ovulatórios, já

Ginther (1992), relatou que há uma queda dos níveis de estrógeno em dois dias que antecedem a ovulação.

A maturação nuclear e citoplasmático foi estudada em éguas por Goudet et al. (1997), onde observaram que os oócitos colhidos em estágios iniciais de folículos pré-ovulatórios (36-48 h) são imaturos, completamente fechados em uma célula compacta do cúmulo e estão no estágio germinal da vesícula. Já os oócitos ovulados, possuem maturação nuclear completa, ou seja, estão no estágio de metáfase II da meiose (Miller et al., 1980).

Grondahl et al. (1995) e Landim-Alvarenga. (1999), relataram a maturação nuclear como o reinício da meiose, onde se observam um achatamento do núcleo esférico do oócito eqüino, seguido de um aumento da ondulação do envelope nuclear, formação da placa metafásica da primeira divisão meiótica, a extração do primeiro corpúsculo polar e subsequente a formação da placa metafásica da segunda divisão meiótica. O processo da maturação nuclear, termina uma hora antes da ovulação, quando o primeiro corpo polar for expulso (Hafez, 1995).

Segundo Landim-Alvarenga (1999), a maturação nuclear oocitária pode ser classificada em quatro fases: a) vesícula germinativa (quando o oócito apresenta um núcleo esférico e localizado centralmente ou periféricamente no ooplasma); b) quebra da vesícula germinativa (quando o núcleo do oócito apresentar carioteca irregular ao redor da cromatina condensada e dispersa); c) metáfase I (caracterizada pela presença dos cromossomos arranjados na placa metafásica e localizados periféricamente ao ooplasma); d) metáfase II (presença dos cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e do corpúsculo polar no espaço periférico).

A ocorrência da maturação meiótica do oócito em equinos, é acompanhada e provavelmente regulada por mudanças no padrão de fosforilação de várias proteínas celulares, na qual, um importante componente desta mudança é a atividade do fator promotor de maturação (MPF), (Landim-Alvarenga, 1999).

Este fator promotor de maturação, foi estudado por Masui & Markert (1971) e Smith & Ecker (1971) utilizando-se oócitos de sapo. Neste estudo constataram que os oócitos em processo de maturação produzem um fator que provoca a retomada da meiose, sendo denominado de fator promotor de maturação (MPF). Outros pesquisadores constataram também a presença deste fator em oócitos de outras espécies domésticas (Murray, 1989; Downs, 1993).

O fator promotor de maturação apresenta níveis oscilantes, onde inicialmente aparece quando a vesícula germinal é rompida e atinge o nível máximo na fase de metáfase I, desaparecendo transitoriamente quando o primeiro corpo polar é emitido. O MPF, volta a reaparecer em metáfase II permanecendo em níveis elevados até a fertilização (Hashimoto & Kishimoto., 1988).

A maturação citoplasmática é caracterizada por diversas mudanças no formato e localização das organelas celulares (Landim-Alvarenga, 1999), a qual ocorre a migração das mitocôndrias, vesículas e gotas lipídicas para a região central, resultando no aparecimento de um grande número de grânulos corticais e complexos de Golgi livres na região periférica (Enders et al., 1987).

Goudet et al. (1997), relataram que a migração dos grânulos corticais são indicativos da maturação citoplasmática do oócito em metáfase II recém ovulado, indicando que o oócito da égua é completamente maturado em folículos pré-ovulatórios.

Bezard et al. (1995), compararam a maturação nuclear e citoplasmática em oócitos de éguas superovuladas com o EPE e não superovuladas, e constataram que não há diferença na qualidade oocitária, porém, a composição do líquido folicular parece ser diferente entre os grupos superovulado e não superovulado.

O mesmo grupo de pesquisadores, seguindo a linha de pesquisa descrita anteriormente, observou um menor número de oócitos recuperados em ciclos de éguas superovuladas (61%) em relação as não superovuladas (79%), porém sem diferença significativa.

A baixa taxa da recuperação oocitária, pode ser atribuída ao estágio atresico e imaturo de folículos pré-ovulatórios. Esta hipótese é confirmada com a alta incidência da baixa concentração de esteróides encontrados em folículos em que o oócito não foi recuperado; contudo, a qualidade heterogênea dos folículos e dos oócitos produzidos após o tratamento superovulatório, pode explicar o baixo sucesso na taxa de recuperação de múltiplos embriões (Bezard et al., 1995).

2.6. Processo da ovulação

O processo da ovulação, consiste na liberação do oócito do folículo dominante selecionado a partir da emergência de uma onda folicular (selecionado por processos ainda não totalmente elucidados), na qual os folículos pertencentes a mesma onda folicular que não sofreram a ovulação, entram em atresia (Mies Filho, 1982).

Os folículos pré-ovulatórios passam por três modificações fundamentais durante o processo ovulatório: a) maturação citoplasmática e nuclear do oócito; b) diminuição da propriedade coesiva das células do Cumulus entre as células da granulosa; c) adelgaçamento e ruptura da parede folicular externa (Hafez, 1995).

Quando a onda ovulatória de gonadotrofina estimula um folículo pré-ovulatório, a principal resposta celular é a luteinização das células da teca interna e das células da granulosa que constituem a parede folicular pela ação do LH, (Price & Smith, 1997).

Embora o processo de luteinização não requeira a ovulação, parece que o processo ovulatório é parte integral dos estágios iniciais da luteinização. A ovulação e a luteinização, são dependentes de eventos da célula da teca interna e da célula da granulosa, e a ruptura final do folículo ovulatório pode ser dependente da ativação dos fibroblastos do tecido conectiva tecal folicular (Price & Smith, 1997).

Pouco antes da ruptura folicular, as células do Cumulus sofrem uma dissociação parcial e acumulam em torno do oócito, formando a

corona radiata, devido a um aumento dos níveis de progesterona que estimula a síntese de enzimas collagenases que dissociam a ligação entre as células da granulosa, tornando a camada de células da granulosa menos espessa (Parr, E.L., 1975; Espey, L.L., 1978).

Por ação do hormônio luteinizante, ocorre a síntese de prostaglandina pelas células da granulosa, que contribui para a ruptura dos lisossomos das células epiteliais no ápice folicular e provoca também a contração de fibras musculares do estroma ovariano, aumentando a pressão no interior do folículo e favorecendo a ruptura do mesmo após o adelgaçamento do ápice folicular (Brannstrom & Hellberg, 1989). A inibição da síntese da prostaglandina pode impedir o processo de ovulação (Hafez, 1995).

Dentre as prostaglandinas, as que atuam no processo da ovulação são, a prostaglandina F_{2α} que participa da ruptura folicular através da ativação dos lisossomos, e a prostaglandina E₂ que estimula a produção de plasminogênio ativador, aumentando a atividade da plasmina que geralmente fica envolvido na migração celular dos tecidos e provavelmente tem a função na remodelação das camadas de células teca e das células da granulosa durante a formação do corpo lúteo (Hafez, 1995).

Segundo Fritz & Speroff (1982), o mecanismo da ovulação pode ser resumido em:

- O aumento do LH plasmático estimula o aumento do AMPc intracelular.
- O AMPc é o mediador da luteinização e da retomada da meiose, superando a ação local do inibidor da luteinização e da maturação do oócito.
- A síntese de progesterona aumenta e a parede folicular tem aumentada sua distensibilidade.
- Aumentam os níveis de prostaglandina que junto com a plasmina e a collagenase, digerem a parede do folículo ovariano.

- O aumento dos níveis de LH completa a divisão reducional e formação do primeiro corpo polar.
- O pico do FSH estimula a expansão do Cumulus e a produção do ativador do plasminogênio.
- A continuidade da digestão enzimática resulta na ruptura da parede folicular.
- Ocorre a expulsão do oócito.
- Vasos sanguíneos invadem a granulosa luteinizada.

2.7. Ovulações múltiplas espontâneas

O conhecimento das particularidades fisiológicas, quanto a aspectos da foliculogênese e incidência de múltiplas ovulações torna-se necessário no intuito da prevenção de gestações gemelares ou na otimização da eficiência reprodutiva e econômica em um programa de transferência de embriões (Carmo et al., 2002a).

Apesar da espécie eqüina ser considerada monovulatória, ou seja, apenas um folículo dominante é selecionado durante cada onda folicular, particularidades são descritas dentre algumas raças, como é o caso do Puro Sangue Inglês, Polo Argentino, Quarto de Milha e Apaloosa, que apresentam incidência de múltiplas ovulações na ordem de 15-30%; 38%; 9% e 8% respectivamente, por ciclos estrais (Ginther et al., 1992; Losinno et al., 2000 e Sertich, 1989).

Pascoe et al. (1987), avaliaram 1.015 éguas de raças européias e PSI, concluíram que 38,2% das ovulações múltiplas evoluíram para gestações gemelares. Sertich, (1989) relatou que a incidência de múltiplas ovulações em éguas de raças européias tem uma maior prevalência de múltiplas ovulações (55,9%), quando comparado com raças americanas (8% a 9%).

Pimentel et al. (1994), descreveram a incidência de múltiplas ovulações em 3.631 éguas com predominância de sangue da raça Crioula e concluíram que a frequência média geral de múltiplas ovulações foi de

7,1%, sendo que, 6,5% de dupla ovulação, 0,5% de tripla ovulação e 0,1% de quádrupla ovulação.

Trinque et al. (1997), relataram na raça Brasileiro de Hipismo, um caso de quádrupla ovulação, havendo a recuperação de dois blastocistos expandidos, um blastocisto inicial e um oócito em uma única colheita de embrião, resultando em três prenhez confirmadas.

Entretanto, há uma maior incidência de ovulações duplas do que tripla ou quádrupla, segundo relato de Hughes et al. (1972), onde foram observados 99% de ovulações duplas e 1% de ovulações triplas e quádrupla.

Um total de 829 ciclos em éguas da raça Brasileiro de Hipismo foi avaliado por Carmo et al. (2002a), tendo sido detectados 390, 360 e 79 ciclos com ovulações simples, duplas e triplas, respectivamente, e um total de 617 embriões recuperados, sendo 230, 306 e 81 embriões provenientes de ovulações simples, duplas e triplas respectivamente, sendo observados uma incidência de 53 % de ovulações múltiplas.

A freqüência de ovulações múltiplas unilaterais e bilaterais tem sido motivo de estudo por alguns pesquisadores, onde Ginther & Pierson (1989), não notaram diferença significativa entre as incidências uni ou bilateral. O mesmo foi relatado por Squires et al., (1987b) relatando 49,7% de ovulações múltiplas unilaterais e 50,3% de ovulações múltiplas bilaterais.

A maioria das ovulações múltiplas ocorre sincronicamente, apresentando 75% das ovulações entre as primeiras 24h; 15% entre 48h e 10% após as 48h (Hughes et al., 1972).

Em um outro estudo mais minucioso, Ginther (1987) relatou que 55% das ovulações múltiplas são simultâneas, ou seja ocorrem ao mesmo tempo, 33% em 24h, 9% em 48h e 3% em até 62h.

Quando comparado o sincronismo entre as ovulações duplas unilateral e bilateral, Henry et al. (1982) relataram em um estudo envolvendo 209 ovulações duplas, um maior sincronismo entre as ovulações bilaterais do que em unilaterais.

A incidência de ovulações múltiplas pode estar relacionada a fatores genéticos (raça), hereditários (familiar), nutricional (dieta rica em energia) e relacionado com a idade da égua (18% entre 6 a 10 anos, e 14% entre 2 a 5 anos) (Ginther, 1992; Warszawsky et al., 1972; Henry et al., 1982).

Não se sabe ao certo qual a base hormonal para a predisposição de ovulações múltiplas espontâneas, onde estudos têm demonstrado que as concentrações circulantes de LH e FSH são semelhantes entre éguas de ovulações simples e múltiplas, sugerindo haver uma maior sensibilidade ovariana a gonadotrofina em determinadas raças e indivíduos (Urwin & Allen, 1983).

Ginther (1992), comparou entre as ovulações simples e dupla o diâmetro médio dos folículos pré- ovulatórios, descrevendo o diâmetro de 44mm para a ovulação simples, 35mm e 40mm para as ovulações duplas unilateral e bilateral respectivamente. Quando o mesmo autor correlacionou o diâmetro entre a primeira e a segunda ovulação de dois folículos pré-ovulatórios unilateral as mensurações foram de 39mm e 34mm de diâmetro respectivamente.

Uma das possíveis causa para o menor diâmetro dos múltiplos folículos ovulatórios, é o aumento do nível circulante de inibina, resultando na inibição da liberação do FSH. Entretanto, a relação entre o diâmetro dos folículos pré-ovulatórios e o menor sincronismo entre as múltiplas ovulações unilaterais, pode ser consequência do menor suporte sanguíneo entre os folículos, levando a uma diminuição dos nível de LH nos folículos menores em relação aos folículos maiores (Ginther, 1992).

Squires et al. (1987a) relatam um aumento na concentração de progesterona circulante em ovulações duplas naturais ou induzidas, porém os níveis apresentam ser menores do que o dobro das ovulações simples. Não há alteração sobre a duração do estro, diestro e do ciclo estral em éguas com ovulações múltiplas (Ginther & Pierson., 1989).

Entretanto, o aumento do número de ovulações é desejável para fins de programa de transferência de embriões, elevando o percentual de

embriões recuperados por éguas. Contudo, é preocupante no que diz respeito ao manejo reprodutivo, pois, gestações gemelares são indesejáveis na espécie eqüina (Carmo et al., 2002a).

2.8. Superovulação em ruminantes

A superovulação é um elemento chave na biotecnologia da transferência de embriões, sendo estudada desde 1940 na espécie bovina com o intuito de estimular através da administração de hormônios gonadotróficos o desenvolvimento de um maior número de folículos antrais que normalmente sofreriam atresia (Casida et al., 1940).

Um grande número de pesquisadores tem procurado um melhor entendimento da dinâmica folicular (Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989) com o propósito de compreender alguns dos eventos que ocorrem durante a superovulação.

No entanto, apesar das intensas pesquisas nas últimas décadas, ainda não existe um protocolo satisfatório que permita eliminar, ou mesmo, reduzir de forma significativa as variáveis que afetam a resposta superovulatória (Gonsalves et al., 2002).

Hyttel et al. (1989 e 1991), relataram uma assincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear nos oócitos de vacas superovuladas, supondo ser conseqüência da assincronia intrafolicular causada pelo variável e baixo suporte sangüíneo entre os folículos superestimulados. Esta alteração no suporte sangüíneo causa uma variação nos níveis de FSH/LH circulante entre os múltiplos folículos (Ginther, 1992). Moor et al. (1984) relataram que o tratamento superovulatório em vacas pode causar distúrbios que afetam a maturação folicular e oocitária, diminuindo o número de oócitos normais ovulados e conseqüentemente o número de embriões viáveis.

Em um estudo realizado por Adams et al. (1993), foram avaliados 2.048 colheitas de embriões em diferentes vacas, chegando a uma média de 11,5 oócitos/embriões e 6,2 embriões transferíveis por vaca. Os

mesmos autores relataram que em média 24% das colheitas de embriões em vacas não resultam em embriões, 64% das vacas doadoras produzem menos embriões viáveis (transferíveis) que a média (4 – 6 embriões/vaca) e que 30% das colheitas produzem um total de 70% de embriões transferíveis. Nogueira (2001) observou em seu experimento que 43% das vacas nelore superovuladas apresentaram uma baixa taxa de embriões transferíveis ou nenhum embrião transferível.

O número de corpos lúteos e o nível plasmático de progesterona, podem estar correlacionados (Monniaux et al 1983), mas não o suficiente para afirmar precisamente o número de estruturas lúteas (Saumande, 1981).

A baixa resposta superovulatória e a baixa recuperação de embriões viáveis por colheita ainda podem estar relacionados a fatores individuais (raça, causas genéticas ou fisiológicas, estado nutricional, estação do ano e repetições sucessivas de tratamento superovulatório) e a fatores relacionados ao tratamento superovulatório (momento de se iniciar o tratamento com relação ao ciclo estral, tipo de gonadotrofina utilizada, relação FSH e LH nos preparados, duração do tratamento, dose de gonadotrofina e a via de administração) (Ginther et al., 1989; Totey et al., 1989; Gonzales et al., 1990; Carbodevila & Torquatis, 1991; Adans et al., 1992; Bo et al; 1993; Armstrong, 1993; Pérez, 1996).

Os fatores individuais relacionados à raça estão presentes entre os Bós indicus e os Bós taurus, havendo uma maior predisposição a uma melhor resposta superovulatória para as raças Bós taurus; porém, variações individuais podem existir, como é o caso do Bós taurus por apresentarem uma maior dificuldade na colheita dos embriões em consequência às características anatômicas do trato genital (Carbodevila & Torquatis, 1991). Chupim et al. (1987), sugerem que em vacas Holandesa requer um extrato mais purificado do que em vacas Charolais.

Os animais que não respondem aos estímulos superovulatórios ou o fazem de forma débil, tendem a não responder os tratamentos subsequentes. O inverso ocorre em vacas com boa resposta

superovulatória apresentando resultados favoráveis aos próximos tratamentos superovulatórios (Kohram et al., 1995). Estes fatores genéticos e fisiológicos também foram relatados por Armstrong (1993) onde este observou uma grande variação entre as vacas e suas linhagens, porém o número de folículos foram similares no início do tratamento para as vacas com alta ou baixa resposta superovulatória.

O estado nutricional das vacas também pode influenciar na resposta superovulatória, na taxa de ovulação e na fertilidade, sendo necessário um metabolismo basal positivo como a ingestão de rações com alto valor energético, resultando na estimulação dos centros hipotalâmicos e consequentemente na ativação ovariana (Carbodevila & Torquatis, 1991; Bó et al., 1994).

Quanto aos fatores individuais envolvidos na estação do ano, Chupin et al. (1984 e 1987) observaram em vacas da raça Brahman que na época do verão (fevereiro) a resposta superovulatória e o número de embriões viáveis são significativamente maiores que no inverno (julho), apresentando uma média de 19,2/5,9 corpos lúteos e 9,6/1,6 embriões recuperados respectivamente.

O momento do ciclo estral mais propício para se iniciar o tratamento superovulatório, é baseado em dados obtidos de vários experimentos científicos assim como dados de técnicos a campo, sugerindo ser iniciado entre o 8^o e 12^o dia pós – ovulação (Lindsell et al., 1986).

Os preparados utilizados nas tentativas superovulatórias em vacas são baseados em três tipos de gonadotrofinas de origem natural: as gonadotrofinas do extrato de pituitária de animais domésticos (suíno, ovino, eqüino, bovino), gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) ou gonadotrofina do soro da égua prenhe (PMSG) e a gonadotrofina da menopausa humana (hMG) (Boland et al., 1978; Carbodevila and Torquati., 1991; Wright & Malmo., 1992; Mantovani et al., 1994).

As gonadotrofinas do extrato de pituitária de origem animal, são encontradas em produtos comerciais com diferentes nomes (Folltropin-

V®; Ovaset®, Pluset®, Ovagem®, Superov®) e apresentando em suas bases, diferentes concentrações de LH em relação às concentrações de FSH ($\pm 15\%LH$, $\pm 5\%LH$, $\pm 50\%LH$, $0\%LH$, $0\%LH$ respectivamente) (Bó et al., 2000).

O eCG/PMSG são apresentados comercialmente como Novormon® 5000, Folligon®, Intergonam® e Pregmagon®, onde são constituídos de atividades variáveis de FSH e LH no preparado em consequência do estágio da gestação quando o soro for colhido das éguas (Murphy et al., 1984).

A superovulação em vacas é usualmente induzida pelo extrato de pituitária de origem animal (FSH) (Barros & Nogueira, 1997; Alfuraiji et al., 1993). A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) ou a gonadotrofina do soro da égua prenhe (PMSG) tem sido associada com um menor número de embriões transferíveis em comparação às vacas tratadas com FSH (Elsden et al., 1978).

Monniaux et al. (1983) compararam a resposta superovulatória entre o preparado de FSH/LH e o PMSG em vacas Charolais. Neste estudo foi observado uma maior taxa de ovulações e embriões transferíveis em vacas oriundas do tratamento superovulatório com o preparado do FSH/LH duas vezes ao dia por um período de quatro dias (11,1 e 4,4 respectivamente) quando comparado com a administração de PMSG em dose única (8,1 e 3,3 respectivamente).

Quanto à frequência na administração do FSH, é sugerido ser administrado duas vezes ao dia em oito aplicações, em consequência da vida média circulante deste hormônio ser curta ($\pm 5h$.) para a estimulação ovariana, mas ainda permanecendo na circulação por $\pm 12 h$ (Laster, 1972).

Já o eCG/PMSG é um complexo glicoproteico com uma vida média estimulatória ovariana prolongada ($\pm 40h$.), fazendo-se necessária apenas uma administração para eliciar a resposta superovulatória em vacas (Bó et al., 1994). Gonsalves et al. (2002) relatam que a vida média do eCG/PMSG varia de 8 a 14 dias.

Estudos que comparam a frequência na administração de FSH uma ou duas vezes ao dia, foram demonstrados por Boland & Roche (1992), havendo um maior número de embriões recuperados em vacas quando foi administrado duas vezes ao dia (8,8 embriões) em comparação a uma vez ao dia (5,0 embriões), confirmando a curta vida média do FSH, fazendo-se necessária a administração a cada 12h para que os níveis séricos desta gonadotrofina sejam mantidos, permitindo a ação superovulatória desejada (Laster, 1972, Gonsalves et al., 2002).

O mesmo foi relatado por Monniaux et al., (1983), quando compararam a frequência da administração do FSH/LH em uma (T1), duas (T2) e três (T3) vezes ao dia por um período de quatro dias, divididas em doses iguais. Os resultados demonstraram que a administração do FSH/LH duas e três vezes ao dia foram superiores a administração de uma vez ao dia, obtendo uma média de ovulações, embriões recuperados e embriões transferíveis de 10,2; 6,7 e 5,1 respectivamente para (T2); 10,0; 6,9 e 4,1 respectivamente para (T3) e 7,4; 3,6 e 1,8 respectivamente para (T1).

A prolongada vida média do eCG/PMSG administrado, provoca alguns problemas originários da permanente estimulação ovariana, como os folículos que não ovulam e luteinizam, levando a perfis endócrinos anormais (altos níveis de estrógeno) e embriões de baixa qualidade ou degenerados (Bó et al., 2000).

Para minimizar estes problemas, tem-se associado ao protocolo superovulatório com eCG/PMSG, um anti-soro anti-eCG/PMSG (Neutra-PMSG®) que é um anticorpo monoclonal anti-eCG/PMSG, sendo administrado no momento da primeira inseminação artificial, com o intuito de neutralizar a ação desta gonadotrofina na estimulação ovariana (Dieleman et al., 1987 e 1993; Alfuraiji et al., 1993; Bó et al., 2000).

A dose recomendada do eCG, varia entre 1.500 a 3.000 UI por administração, sendo usualmente utilizado na dosagem de 1.500 a 2.500UI em novilhas e vacas primíparas e 3.000UI para vacas múltíparas via intramuscular (Bó et al., 2000; Gonzales et al., 1994). Já o Folltropin-

V® e o Pluset® (FSHp) tem sido recomendada a administração de 150-250mg/350-600 UI em vacas de corte européias, 130-200 mg/300-450 UI em vacas de corte zebuínas, 200-400 mg/400-800 UI em vacas de leite respectivamente aos seu produtos (Lange & Reichenback, 1997; Barros & Nogueira, 1997; Fernandes & Santos, 2000).

A grande variação nas dosagens hormonais de FSH e eCG/PMSG, é decorrente das oscilantes respostas superovulatórias entre novilhas, vacas e entre diferentes raças (Santos Filho & Oliveira, 1998; Barros et al., 2000; Matoba et al., 2002).

Bó et al. (1994) compararam diferentes dosagens de FSH (Folltropin-V®), 200 mg, 400 mg, 600 mg e 800 mg por via subcutânea em vacas de corte, demonstrando uma maior taxa no número de corpos lúteos, oócitos fertilizados e embriões transferíveis quando utilizaram a dose de 400 mg.

No mesmo estudo, os autores compararam a administração de 400 mg do mesmo produto a base de FSH em dose única via subcutânea e em duas aplicações diárias por um período de quatro dias via intramuscular, concluindo não haver diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao número de corpos lúteos (26,8/20,7), ao número total de oócitos/embriões (9,0/11,3), ao número de oócitos fertilizados (3,6/6,3) e ao número de embriões transferíveis (2,5/4,8) respectivamente (Bó et al., 1994).

O mesmo tem sido relatado por outros autores entre as vacas Bos tauros, Bos indicus (Fernandes et al., 1993) e em búfalas (Kasiraj et al., 1992), porém quando o FSH foi administrado em dose única via intramuscular, a resposta superovulatória foi bem frustrante (Bó et al., 1991).

As diferentes concentrações de FSH e LH presentes nos mais variados produtos superovulatórios têm sido motivo de preocupação e de estudo (Barros et al., 2000), visto haver um efeito negativo no aumento das concentrações de LH na produção e na qualidade dos embriões em

vacas (Donaldson & Ward, 1986) sugerindo que os níveis máximos do LH não devem ser superiores a 15% e 20% (Mapletoft et al., (1992 e 1993).

Em contrapartida, uma quantidade mínima de LH no processo superovulatório é essencial em decorrência de sua ação no final da maturação folicular (Murphy et al., 1984; Chupin et al., 1987; Herrler et al., 1994). Contudo, Donaldson & Ward (1986) relataram que o preparado de FSH altamente purificado, reduz significativamente a taxa de ovulação.

O primeiro folículo dominante em novilhas depende da troca de ligações do FSH em LH para manter o seu desenvolvimento, havendo um aumento no número de receptores de LH ligados na célula da granulosa desde o sexto dia do ciclo estral (Ireland & Roche, 1987).

Em vacas não superovuladas o aumento nos níveis de LH é responsável pelo reinício da meiose dos oócitos pré-ovulatórios, contudo, o aumento excessivo ou a diminuição do LH contido no preparado gonadotrófico, demonstra alterar a atividade da maturação oocitária durante o processo superovulatório (Moor et al., 1984). Porém, há necessidade da presença do LH exógeno no preparado superovulatório, pois, o LH endógeno não se faz suficientemente para a estimulação final da maturação folicular e do desenvolvimento oocitário em múltiplos folículos (10-20 folículos) em vacas superovuladas (Kelly et al., 1997). Armstrong, (1993) relata que os folículos de ovelhas superovuladas, são menores que os de ovelhas não superovuladas.

Em decorrência destas variações, estudos têm demonstrado que os preparados gonadotróficos estão diretamente relacionados com as variações dos resultados nos tratamentos superovulatórios, visto que a alta concentração de LH causa efeitos deletérios na resposta superovulatória (Murphy et al., 1984; Donaldson & Ward, 1986; Gonzales et al., 1990) e na qualidade dos embriões (Kafi & McGowan, 1997), em consequência da luteinização folicular e da maturação prematura do oócito (Callesen et al., 1986).

Contudo, o efeito negativo do aumento dos níveis de LH na superestimulação ovariana, sugere a necessidade de diminuir o seu nível exógeno no processo final da superovulação (Donaldson & Ward, 1986).

Monniaux et al. (1983), na tentativa de minimizar o efeito deletério do LH exógeno, compararam a administração de um composto superovulatório (FSH/LH) com altas concentrações de LH em doses decrescentes e doses contínuas. Neste estudo os autores administraram uma dose total de 50 mg de FSH/LH duas vezes ao dia por um período de quatro dias, obtendo uma média de ovulações, embriões recuperados e de embriões transferíveis de 15,9 e 9,3; 12,2 e 5,8; 5,3 e 2,4 respectivamente aos protocolos superovulatórios em doses decrescentes e em doses contínuas.

Alvin et al. (2000) compararam dois produtos comerciais para superovulação em vacas, o Pluset® que é um produto com alta concentração de LH (1:1), e o Folltropin® que é um produto com baixa concentração de LH (15%). O número de estruturas coletadas e o número de estruturas viáveis foram de 15,32 e 6,89; 16,57 e 9,71 respectivamente ao Pluset® e ao Folltropin®.

O mesmo foi observado por Kelly et al., (1997), onde os tratamentos superovulatórios com o Pluset® comparado com o Folltropin, resultaram em um maior número de folículos (10 mm) e ovulações, porém com maior número de embriões degenerados e não fertilizados em comparação ao Folltropin®.

Os mesmos autores relataram que as novilhas superovuladas com Pluset® em apenas uma administração ao dia por quatro dias, apresentaram um maior nível de estrógeno em relação ao mesmo tratamento com o Folltropin®. Entretanto, quando as novilhas foram superovuladas com os mesmos produtos comerciais em duas administrações ao dia em dose decrescente por um período de quatro dias, não houve diferença significativa nos níveis de estrógeno.

Uma alternativa promissora para aumentar o recrutamento de folículos antes da superovulação é a utilização da somatotrofina

recombinante bovina (rbsT), que é capaz de estimular a síntese de IGF-I em vários tecidos, inclusive no ovário (Gong et al., 1996). Spicer & Geisert (1992) mostraram que folículos pequenos contêm menor quantidade de IGF-I do que folículos médios e grandes. Kuehner et al. (1993) relataram que a rbsT influencia na resposta superovulatória, visto que, este pode estimular a síntese de IGF-I e esta por sua vez é capaz de estimular as células da granulosa.

Contudo, a rbsT ainda é motivo de discussão entre os pesquisadores, sendo que, alguns deles têm relatado o aumento na resposta superovulatória (Niemann, 1991; Herrler et al., 1994; Gong et al., 1996) e outros não têm obtido o mesmo sucesso (Gray et al., 1993)

Alguns estudiosos têm observado a presença de um maior nível de estrógeno em vacas superovuladas, em decorrência ao maior número de ovulações que são expressas pelo número de corpos lúteos presentes no 6^o e 7^o dia pós-inseminação artificial (Callesen et al., 1990).

O elevado nível de LH presente nos compostos, conjugando com o aumento dos níveis de estrógeno, pode explicar o maior número de folículos pré-ovulatórios produzidos pelo Pluset®. Isto é decorrente a maior atividade estrogênica em relação ao aumento na produção de andrógeno nas células da teca (Kelly et al., 1997). As células da teca, produzem andrógenos em resposta ao LH e as células da granulosa convertem andrógeno em estrógeno através da enzima aromatase em resposta ao FSH (Bervers & Dieleman, 1987). Entretanto, as altas concentrações de LH presentes no Pluset®, podem estimular o aumento das concentrações de andrógenos nas células da teca que conseqüentemente eleva a produção de estrógeno nas células da granulosa (Kelly et al., 1997). Porém, os mesmos autores relatam que quando da administração do Pluset® em doses decrescentes, os níveis de LH exógeno foram menores e conseqüentemente uma menor produção de andrógenos e estrógeno.

Uma outra anormalidade superovulatória, pode ser decorrente ao desenvolvimento folicular acelerado culminando com a ovulação, antes

que o folículo tenha atingido o crescimento e o desenvolvimento adequado para completar o processo de maturação oocitária e das células da granulosa (Armstrong, 1993).

A redução do número de células da granulosa em vacas superovuladas podem também propiciar uma anormalidade oocitária (Armstrong, 1993). A célula da granulosa tem um papel essencial na nutrição do oócito presente no folículo em desenvolvimento (Anderson & Albertini, 1976; Armstrong, 1993). O sítio de comunicação entre as células da granulosa, as células do Cumulus e o oócito, forma uma rede de comunicação entre estas células intercomunicadas que provém de um sinal regulatório e nutricional do oócito (Anderson & Albertini, 1976).

A comunicação reduzida do sincício entre as células da granulosa e as células do Cumulus, simultaneamente com uma diminuição na duração da fase folicular em animais superovulados, podem levar a uma inadequada nutrição do oócito durante o período crítico do desenvolvimento pré-ovulatório, na qual a maturação citoplasmática é completada. Isto poderá resultar em uma deficiência biocinética e metabólica que comprometeria a capacidade de desenvolvimento dos oócitos (Armstrong, 1993). Anormalidades também foram encontradas por Moor et al. (1985) quanto à secreção de esteróides e aos padrões dos sítios protéicos no oócito de ovelhas superovuladas com PMSG, oferecendo suporte a hipótese de Armstrong (1993).

Vários autores têm relatado que repetições sucessivas do tratamento superovulatório tendem a diminuir a resposta ovariana, assim como uma irregularidade no ciclo estral, devido a produção de anticorpos ao hormônio exógeno, fazendo necessário intervalar as superovulações entre 56 e 60 dias (Pinheiro-Andrioli et al., 1995; Nogueira, 2001). Entretanto, em outros estudos não foram observadas qualquer diminuição no número de embriões viáveis até seis (6) repetições do tratamento superovulatório (Lamberson & Lamberth, 1986; Oikawa et al., 1998; Manciaux et al., 2000).

Pinheiro-Andrioli et al. (1995) estudaram a resposta superovulatória em 30 cabras depois de repetidos tratamentos com gonadotrofina hipofisária de suíno intervalados em 56 dias. Os autores constataram uma diminuição significativa na ocorrência do estro em cabras na 2^o e na 3^o indução superovulatória em relação a 1^o superovulação (36,5%, 41,1% e 83,3% respectivamente). Em relação a taxa de ovulação após repetidos tratamentos não houve diferença significativa (3,9; 3,4; 2,6 respectivamente a 1^o, 2^o e 3^o indução superovulatória).

Podemos concluir que a superovulação é uma técnica cosmopolita, todavia, complexa e que requer ainda intensos estudos para solucionar as suas incógnitas que em parte vêm sendo eficientemente solucionados com a interação entre as técnicas de punção folicular transvaginal e as biotécnicas da Fertilização in-vitro (FIV) e Transferência Intrafalópio de Gametas (GIFT).

2.9. Superovulação na espécie eqüina

As técnicas para otimizar a fertilidade na espécie eqüina têm sido limitantes em decorrência da maioria das éguas apresentar uma única ovulação por ciclo estral (McCue, 1996). A incidência de ovulações múltiplas espontâneas em raças européias, tem maximizado a eficiência da transferência de embriões (Sertich, 1989; Pascoe et al., 1987, Carmo et al., 2002a).

Squires et al. (1987a) relataram que a viabilidade dos embriões coletados de éguas com ovulações simples, ovulações múltiplas espontâneas e de ovulações múltiplas induzidas (superovuladas) são iguais. Dippert et al. (1994) observaram similares taxas de fertilidade entre embriões de éguas superovuladas e não superovuladas, entretanto, outros pesquisadores contradizem estes relatos (Woods & Ginther, 1984).

A transferência de embriões, visa elevar potencialmente o nível genético da progênie (Meira & Buratini, 1998) porém, é uma biotécnica

que requer investimentos, principalmente no que diz respeito às éguas receptoras de embriões, pelo fato destas terem que esperar vários ciclos para receberem o embrião (Squires & Seidel, 1995).

O tratamento superovulatório na espécie eqüina, assim como em ruminantes que apresentam ovulações simples, busca recrutar um maior número de folículos possíveis de uma onda folicular, estimulando o seu desenvolvimento até as ovulações (Meira & Buratini, 1998).

O principal objetivo da superovulação, é o de elevar a eficiência reprodutiva e econômica dos programas de transferência de embriões, visto que, com a multiplicação do número de ovulações e conseqüentemente do número de oócitos para a fertilização, teríamos um maior número de embriões por éguas doadoras a serem recuperados em uma única colheita (Andrade, 1986).

O processo superovulatório, também pode aumentar a taxa de fertilidade de garanhões subférteis (maior chance de fertilizar um oócito) e de éguas subférteis, por propiciar um maior número de ovulações e conseqüentemente uma maior expectativa para a fertilização (McCue, 1996).

Outras aplicações favoráveis a estimulação de múltiplos folículos, é o fato destas poderem aumentar a eficiência da colheita de oócitos para fins de fertilização in-vitro (FIV), transferência intrafalópio de gametas (GIFT) e injeção de espermatozóide intracitoplasmática (ICSI) (McCue, 1996).

Vários estudos têm relatado que a égua é refratária a todas as drogas rotineiramente utilizadas na tentativa superovulatória de outras espécies, como o FSH e o eCG (McCue, 1996). O Extrato de pituitária eqüina (EPE) é um preparado parcial de Gonadotrofina eqüina, e o único composto que consideravelmente induz ovulações múltiplas em éguas (Squires et al, 1999). Contudo, a resposta superovulatória é baixa (1-3 ovulações/égua) em relação a outras espécies (McCue, 1996).

Para se ter idéia desta baixa resposta fisiológica ovariana das éguas aos hormônios gonadotróficos, Douglas apud Andrade (1986)

induziu a superovulação em éguas com a gonadotrofina eqüina (Pitropin®), resultando em uma taxa de 2,3 ovulações, porém, em um outro experimento, o mesmo preparado foi capaz de induzir, aproximadamente, 30 ovulações em vacas (Andrade, 1986).

A otimização da dose do extrato de pituitária para induzir um maior número de ovulações é um ponto importante a ser considerado (Woods & Ginther, 1983). Vários pesquisadores têm estudado a dosagem e a frequência do EPE que mais se adaptam para a estimulação ovariana (Douglas, 1974 e 1979; Lapin & Ginther, 1977; Woods & Ginther, 1983; Alvarenga et al, 1999 e 2001).

A potência da dose é estimada por uma amostra de ovários de ratas superestimuladas com EPE, que são pesados e expressados em Fevold rat unit (Fevold, 1939), contudo, a padronização da dose a ser administrada é um fator árduo e limitante, em decorrência das constantes variações dos níveis de FSH e LH presentes no preparado (Squires et al., 1999).

Tem-se relatado que uma maior dose diária do EPE em éguas anovulatórias, resulta em uma maior taxa de ovulações (1125 Fevold unit/ 3,3 ovulações/égua e 750 Fevold unit/ 1,4 ovulações/éguas), porém, quando administrada na estação ovulatória, não foram observadas diferenças nas taxas de ovulações (750, 1500 e 2250 Fevold unit/ 2,7 ovulações/éguas) (Woods & Ginther, 1983).

Alguns estudos têm sido relevantes em avaliar o melhor momento para se iniciar o tratamento superovulatório (Woods & Ginther, 1983). As éguas tratadas na fase de anestro com o EPE, têm demonstrado uma média de 3,3 ovulações/éguas (Woods & Ginther, 1982), já na fase estral utilizando o mesmo produto superovulatório, tem sido comparado às éguas em fase do estro e do diestro (Lapin & Ginther, 1977). Na fase do estro a média de ovulações tem sido de 1,7/égua (Lapin & Ginther, 1977; Woods et al, 1982), porém, na fase do diestro, quando se iniciou o tratamento no 15^o dia pós-ovulação, a média foi de 2,9 ovulações/égua (Wood & Ginther, 1983).

O preparado comercial à base de FSH (Foltropin, Pluset) tem sido utilizado em éguas na tentativa de induzir as ovulações múltiplas (Fortune & Kimmich, 1993; Squires et al., 1986). Contudo, a resposta superovulatória é baixa, obtendo uma média de 1,6 ovulações por ciclo e um percentual de ovulações múltiplas de 65% das éguas tratadas (Sirois et al., 1992), o que limita a sua utilização em decorrência do seu alto custo e da necessidade de ser utilizada em altas doses (Mc Cue, 1996; Squires et al., 1999). A dose de FSH-p administrada em éguas, é aproximadamente 70 vezes a dose usualmente utilizada em vacas para promover a superovulação (Ginther et al., 1986 apud McCue, 1996).

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG é usualmente utilizada na superovulação de ruminantes, porém, em éguas tem sido demonstrado não haver efeito no desenvolvimento ou na ovulação de múltiplos folículos (Day, 1940; Allen, 1982; Ginther, 1992). Esta falha no desenvolvimento de múltiplos folículos com o eCG em éguas tem sido atribuída a uma limitada ligação do eCG aos receptores de FSH ao folículo de éguas não gestantes (McCue, 1996).

O GnRH também tem sido estudado na tentativa de melhorar a resposta superovulatória em éguas, obtendo um melhor resultado no período de anestro, em decorrência da presença do pico de FSH em resposta a sua administração (McCue, 1996). Johnson & Becker (1988), relataram a indução de ovulações múltiplas com o uso de GnRH em éguas no período de anestro, obtendo uma média de 1,3; 2,9 e 3,5 ovulações, utilizando uma dosagem farmacológica de 2, 20 e 100µg de GnRH/ hora respectivamente, através de uma “bomba de GnRH”, por um período médio de 11,4 dias. Já em éguas cíclicas, não houve sucesso na indução de ovulações múltiplas, devido ao efeito de feedback negativo para a liberação de FSH, ou seja, a inibina secretada pelos folículos em desenvolvimento impedem a liberação do FSH, que bloqueia o crescimento de pequenos folículos da onda folicular (McCue, 1996).

Algumas tentativas supressoras de inibina têm sido estudadas, com o intuito de impedir o seu efeito (Mckinnon, et al., 1992), através da

imunoneutralização de inibina, que consiste na utilização de fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade - α , o que promove o bloqueio do mecanismo de feedback negativo da liberação de FSH, permitindo a elevação dos níveis de FSH endógeno durante a fase folicular (McCue, 1996)

Um agonista da inibina, foi utilizado na tentativa de induzir as ovulações múltiplas em éguas (McKinnon, et al., 1992; McCue, et al., 1993). McKinnon, et al. (1992) relataram um aumento na taxa de ovulações duplas e triplas e na recuperação de embriões com a utilização deste agonista de inibina. Porém, o seu uso tem sido limitado em decorrência a relatos de choque anafilático e abscesso no sitio de administração, devido ao prolongado tempo de administração da droga, o qual é realizado em torno de duas ou mais semanas (Squires et al., 1999).

Como já dito anteriormente, o EPE é o único composto que consistentemente induz a superovulação em éguas. Alguns estudos têm demonstrado um aumento na taxa de ovulações em éguas superovuladas com a utilização deste composto, contudo, a taxa de recuperação de embriões é baixa (Palmer et al., 1993; Squires & Seidel 1995; Alvarenga et al., 1999; Carmo et al., 2002b). Dippert et al. (1992), relataram que apenas 43% das ovulações em éguas superovuladas resultaram na recuperação de embriões por lavado uterino, comparado com 74% do grupo controle não superovulado.

Douglas (1979) também relatou um baixo percentual de embriões recuperados por ovulações em éguas tratadas com EPE (35%) quando comparado com as ovulações simples não tratadas (67%). Squires et al., (1987a) entretanto não observaram diferença no percentual de embriões recuperados entre éguas superovuladas com EPE (54%) e éguas controle não superovulada (55%).

Ainda não está claro, se a baixa recuperação de embriões de éguas superovuladas ocorre devido à deficiência no desenvolvimento folicular (Dippert et al., 1994), na falha do folículo em liberar o oócito no momento da ovulação (Palmer et al, 1993), na produção de oócitos de

baixa qualidade (anormalidade na maturação folicular e oocitária) (Palmer et al., 1993; Dippert et al., 1994), ou na falha da captação dos oócitos para o interior do oviduto (Dippert et al., 1994). Dippert et al. (1994) também sugerem que o tratamento superovulatório pode alterar o tempo normal do trânsito dos embriões através do oviduto.

Embora nenhuma afirmativa concreta fora determinada quanto a retenção do oócito na fímbria do infundíbulo, alguns pesquisadores (Onuma & Ohnami, 1975) encontraram uma massa gelatinosa globular em 76% de 424 ovidutos estudados e deduziram que esta massa pode ter um papel em reter o oócito não fertilizado no oviduto. Dippert et al. (1994) descrevem esta massa, como sendo um filamento de secreção de muco das células da granulosa próximo da ovulação.

Durante a ovulação, esta secreção adere a fímbria do oviduto, ou migra para o interior do mesmo com o oócito, envolvendo o oócito sob uma grande camada de massa gelatinosa de origem folicular (Liu et al., 1991). Onuma & Ohnami, (1975) relataram que os oócitos são retidos mais freqüentemente ao oviduto, quando há presença desta massa globular. Liu et al. (1991) teorizaram que esta massa pode obstruir o lume do oviduto, interferindo no transporte do embrião, bem como, na aderência do oócito na fímbria do infundíbulo, impedindo a sua migração para o oviduto.

Tem sido sugerido, que embriões oriundos de animais submetidos ao tratamento superovulatório são menos competentes ao desenvolvimento, do que embriões de animais não superovulados (Elsden et al., 1976; Woods & Ginther, 1984; Hyttel et al., 1991;). Woods & Ginther (1984), relataram baixo sucesso na taxa de prenhez, decorrente de embriões transferidos de éguas com ovulações múltiplas (11/21) do que éguas com ovulações simples (7/8). Elsden et al. (1976) demonstraram que a taxa de prenhez foi ligeiramente superior para embriões de vacas não superovuladas, do que as vacas superovuladas (89% e 70% respectivamente).

A migração dos grânulos corticais da membrana plasmática é usada para avaliar o estágio final da maturação oocitária em mamíferos (Gran, 1989), e os componentes do fluido folicular variam durante o crescimento e maturação do folículo (Kenney et al., 1979; Watson & Hinrichs, 1988). Moor et al., (1985) e Loos et al., (1991), relataram que o tratamento hormonal exógeno, resulta na maturação heterogênea de folículos e oócitos em mamíferos. Nas éguas, a qualidade heterogênea de folículos e oócitos produzidos após o tratamento superovulatório, pode explicar o baixo sucesso da taxa de múltiplos embriões (Bézar et al., 1995).

Hyttel et al. (1991) relataram que 37% dos oócitos recuperados de vacas superovuladas sofrem maturação anormal comparado com apenas 11% em vacas não superovuladas. Alvarenga (2002) em relato pessoal, têm obtido bons índices de concepção de embriões coletados de éguas superovuladas com EPE. Trinque et al., (1997), relataram três prenhezess oriundas da colheita de três embriões de uma quádrupla ovulação.

Quanto ao período de retorno do cio pós superovulação (17,99 e 15,04 dias para as éguas superovuladas e não superovuladas) e a duração do estro (5,9 e 7,5 dias para as éguas superovuladas e não superovuladas) não há influência sobre a variável superovulatória (Douglas, 1979). Rosa et al. (1998) relataram que éguas superovuladas com EPE e com o com o EPE purificado obtiveram 6,6 e 7,0 dias em estro respectivamente, e éguas do grupo não tratado 7,0 dias do ciclo estral em estro.

A primeira tentativa de superovulação em éguas foi realizada por um pesquisador inglês (Day, 1940) utilizando tanto o PMSG quanto o hCG sozinho ou em combinação, e o extrato de pituitária eqüina (EPE) na dose de 800mg subdividido em uma administração ao dia por um período de 5 dias. Portanto, todas as tentativas para estimulação de múltiplos folículos foram acompanhadas de insucesso (Andrade, 1986).

Somente em 1974 foi publicado, foi publicado primeiro relato de uma indução de superovulação com sucesso em éguas, por Douglas et al.

(1974). Os autores induziram a superestimulação ovariana com EPE parcialmente purificado em duas administrações ao dia, através da administração em doses constantes por 14 dias consecutivos, em 29 éguas pôneis em sazonalidade anovulatória. Os resultados mostraram, que 25 (86%) das éguas tratadas obtiveram resposta a ativação ovariana, ocorrendo uma ou mais ovulações, e quatro (14%) éguas continuaram apresentando inatividade ovariana. Das éguas pôneis que ovularam, 58% apresentaram duas ou mais ovulações.

Lapin & Ginther (1977) relataram que a administração do EPE uma vez ao dia por um período de 14 dias, também induziu a atividade ovariana/ovulação em 11 de 11 éguas pôneis em sazonalidade anovulatória. A dose total administrada foi equivalente a 3.3U NIH-FSH-S₁ por Kg/PV. Seis de 11 éguas receberam 2.000UI de hCG após a última administração do EPE. O número médio de ovulações por éguas foi de 1,6; 1,8 e 0 para as éguas que receberam apenas EPE; EPE+hCG e o grupo controle não tratado, respectivamente.

A indução a atividade ovariana/ovulação (ovulações simples) em éguas pôneis anovulatórias, também foi demonstrada com a administração do GnRH intervalado a cada 8h por 14 dias, mantidas em um manejo de 16h luz e 8h de escuridão (Bailey & Douglas, 1977).

O primeiro relato de ovulações múltiplas em éguas cíclicas, foi publicado por Lapin & Ginther (1977). Foram utilizadas 21 éguas pôneis subdivididas em três grupos (estro, diestro e controle), onde receberam o EPE (2U NIH-FSH-S₁) uma vez ao dia, por seis dias via subcutânea, durante o 11^o e 16^o dia pós-ovulação ou durante os dias 1^o e 6^o do estro. Duas ou mais ovulações ocorreram em quatro das setes éguas em diestro e três das sete éguas tratadas durante o estro. Não houve ovulações múltiplas em sete éguas controle. O número médio de folículos nas fases de diestro e estro, foram de 2,8 e 1,7 por éguas respectivamente.

Douglas (1979) tratou oito éguas cíclicas com EPE, administrando uma dose diária de 750 Fevold-Hisaw rat-units, via subcutânea durante os dias 14 e 20 pós-ovulação. Foi utilizado 4.000 UI de hCG via subcutânea

no último dia do tratamento superovulatório. A dose administrada e o dia em que se iniciou o tratamento superovulatório, foram baseados em resultados preliminares, entre as doses diárias de 475 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 6-12 pós-ovulação, 750 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 10-16 pós-ovulação, 475 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 12-18 pós-ovulação e 750 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 14-20 pós-ovulação.

Os resultados do experimento do Douglas (1979) demonstraram que o número de ovulações ($2,3 \pm 1,0$ e $1,0 \pm 0$) e o número de éguas com mais do que uma ovulação (6/8 e 0/6) foi maior ($p > 0,05$) em éguas tratada com EPE+hCG do que nas controle. Houve duas éguas que não apresentaram ovulações múltiplas no grupo EPE+hCG, resultando em ovulações simples. A maioria das ovulações ocorreu no mesmo dia, onde somente uma égua apresentou sincronismo inter-ovulatório de um dia.

Alguns autores têm relatado a necessidade da administração da Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) se o tratamento superovulatório for iniciado no diestro, com a finalidade do estro e das ovulações estarem sincrônicas, porem, se o tratamento for iniciado no final do diestro, não há necessidade da administração da $PGF_{2\alpha}$ (Douglas, 1979; Woods & Ginther, 1983).

No experimento de Lapin & Ginther (1977) houve folículos que não ovularam e se luteinizaram em éguas cíclicas, já no experimento de Douglas (1979) todas as éguas superovuladas resultaram em ovulações.

Woods & Ginther (1983) relataram que a administração ou não do hCG, não tem influência nas taxas de ovulações, porém, o sincronismo entre as ovulações é significativamente reduzido com a administração do hCG ($0,0 \pm 0,0$ e $1,4 \pm 0,4$ dia respectivamente), ou seja, as ovulações múltiplas ocorreram ao mesmo dia em 10/10 éguas tratadas com hCG comparado com 3/12 éguas não tratadas. Dippert et al. (1994), descrevem que em éguas superovuladas, o intervalo entre a 1^o e a última ovulação é menor quando tratadas com hCG antes da 1^o ovulação (0,0 dia) do que éguas tratadas pós 1^o ovulação (1,8 dias).

Em uma avaliação retrospectiva de quatro experimentos, Woods & Ginther (1983), relataram que 70% das éguas tratadas com EPE em fase cíclica resultaram em ovulações múltiplas, 28% em ovulações simples e 2% resultaram em inatividade ovariana. A média de ovulações múltiplas foi de 3,0/égua e o sincronismo entre as ovulações de 1,2 dias.

Squires et al. (1986) compararam o EPE (750 Fevold Rat unit / S.C. uma vez ao dia) e o FSH-p (150 mg / I.M. duas vezes ao dia) para a indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas. O tratamento iniciou-se quando houve a presença de um ou mais folículos maiores de 20 mm de diâmetro ($\pm$ 12 dias pós – ovulação), e receberam também uma dose de Prostaglandina F2 α no início do tratamento, e 3.300UI de hCG quando a maioria dos folículos chegou a um diâmetro de 35 mm. Neste experimento, foi observado que a taxa de ovulações foi maior para o tratamento com EPE (2,2) em 13 de 18 éguas, comparado com quatro de nove éguas para o tratamento com o FSH-p (1,6). O grupo controle obteve uma taxa de 1,0 ovulação/égua.

Squires et al. (1987a) verificaram o efeito do extrato de pituitária na indução das ovulações múltiplas e na recuperação de embriões em 28 éguas cíclicas. Foi administrada uma dose diária de 750 Fevold Rat unit em uma única administração, iniciando o tratamento no 12^o dia do ciclo estral e terminando quando dois ou mais folículos atingiram um diâmetro de 35 mm. Após o término do tratamento, foram administradas 3.300UI de hCG via endovenosa e realizadas as inseminações artificiais diariamente com 250×10^6 de espermatozoides móveis, até o desencadear das ovulações. Os resultados apresentaram uma média de 3,8 ovulações/égua (26/28 éguas) e 2,0 embriões recuperados no grupo superovulado, contra 1,2 ovulações/égua (5/40 éguas) e 0,65 embriões recuperados para o grupo controle (não superovulado). Obteve um sincronismo inter-ovulatório de “0” (zero) dias em 84% das éguas, e 1 a 2 dias em 16% das éguas tratadas. O período médio da administração do EPE foi de 5,5 dias. Neste mesmo experimento, foi relatado que quanto maior o número de corpos lúteos, maior é o nível de progesterona, visto

que, durante um período de sete dias pós-ovulação foram coletadas amostras de sangue para a dosagem de P4, obtendo uma média significativa para éguas com ovulações duplas ($55,2 \pm 10,2$ ng) em relação às de ovulações simples ($44,6 \pm 11,4$ ng). O diâmetro médio dos embriões coletados foi similar entre os grupos superovulados e controle quando as colheitas foram realizadas no 6º dia pós-ovulação (0,177 e 0,213mm respectivamente), porém, quando os embriões foram coletados no 8º dia pós-ovulação os embriões das éguas superovuladas demonstraram menores que os do grupo controle (0,567 e 0,903 respectivamente). Apesar das variações entre os diâmetros dos embriões coletados em diferentes tratamentos e períodos, foi relatado que todos foram viáveis a serem transferidos (Squires et al 1987a).

A resposta superovulatória ao tratamento com o EPE, parece estar relacionada com o tamanho do folículo no início do tratamento; as éguas em fase de anestro (transicional) o melhor resultado se deu na presença de um folículo de 30 mm de diâmetro; já em éguas cíclicas, a melhor resposta foi quando a população dos folículos apresentou uniformes e o maior destes foi de no máximo 25 mm de diâmetro (McCue, 1996).

A supressão do desenvolvimento folicular antes do tratamento superovulatório, tem sido investigada, com o intuito de identificar o dia da seleção do folículo ovulatório (Pierson & Ginther, 1990). Neste experimento, os autores utilizaram 36 éguas em fase cíclica, subdivididas em quatro grupos, em relação ao diâmetro folicular (15 mm; 20 mm; 25 mm; 30 mm). As éguas foram avaliadas pela ultra-sonografia transretal, onde ao ser observado um corpo lúteo, foi administrado 10 mg de prostaglandina F2 α e mantida com a administração diária de estrógeno (10 mg) e progesterona (150 mg) por um período máximo de 10 dias. O término da administração do estrógeno e da prostaglandina, e o início do tratamento superovulatório com EPE, foram adequados em relação ao diâmetro dos folículos presentes (15 mm; 20 mm; 25 mm; 30 mm). A dose diária administrada do EPE foi de 750 Fevolt – Hishow rat units por via

subcutânea, sendo previamente filtrada com o auxílio de um microfiltro de 0,22 μ m. O tratamento superovulatório foi encerrado quando a maioria dos folículos apresentou 35 mm de diâmetro ou quando ocorreu uma ovulação. Os resultados deste experimento, demonstraram que o tempo médio entre o final do tratamento com estrógeno mais progesterona e o início da administração do EPE em relação aos grupos (15 mm; 20 mm; 25 mm e 30 mm), foi de 1,3; 5,8; 7,7 e 11,0 dias respectivamente; o período médio de tratamento com EPE foi de 8,7; 6,3; 3,2 e 1,7 dia respectivamente, e o número médio de folículos >30 mm foram de 2,5; 2,2; 1,2 e 0,8 folículos respectivamente. Os autores observaram em um grupo de éguas com apenas a administração do estrógeno mais progesterona, que o número médio de folículos >30 mm, foram iguais aos das éguas superovuladas do grupo 30 mm (0,8 folículo). Ocorreram ovulações de folículos apresentando um diâmetro menor que 30 mm (uma égua no grupo 20 mm; duas éguas no grupo 25 mm; e duas éguas no grupo 30 mm).

Pierson & Ginther (1990), relataram que quanto maiores forem as diferenças entre o diâmetro dos dois maiores folículos no início do tratamento superovulatório com EPE, menor vai ser a resposta superovulatória.

Quando os folículos maiores do que 20 mm de diâmetro começam a decrescer e o diâmetro do maior e do segundo maior folículo da onda começam a divergir, é indicativo que a seleção fisiológica do folículo ovulatório ocorreu (Pierson & Ginther, 1990). A seleção do folículo dominante é manifestada durante o intervalo interovulatório, que é de aproximadamente seis dias antes da ovulação, quando o maior folículo apresenta uma média de 29,4mm (Pierson & Ginther, 1990). Tem sido hipotetizado que o recrutamento do folículo a ser ovulado, ocorre aproximadamente 12 dias antes da ovulação (Driancourt & Palmer, 1984).

Hofferer et al. (1991) usando um protocolo de superovulação com EPE, associado ou não a somatotrofina suína, concluíram que a adição desta não altera a taxa de ovulações. Mais recentemente, Bruck & Lehn-

Jensen (1997) apresentaram a proposta de utilizar a somatotrofina eqüina com o intuito de aumentar a produção do fator de crescimento Insulina-Like (IGF-1) que tem a finalidade de estimular o desenvolvimento folicular. Os autores observaram que o aumento de IGF-1 não aumentou o diâmetro médio dos folículos, e que não houve alterações nos níveis de estradiol, progesterona e LH durante ou imediatamente após o tratamento.

Dippert et al. (1994) estudaram a taxa de fertilidade em éguas superovuladas e em éguas com ovulações simples e múltiplas espontâneas. Foram utilizadas 28 éguas cíclicas de 3 a 15 anos de idade, subdivididas em dois grupos (superovulados e não superovulados). O tratamento superovulatório iniciou-se no 5^o dia pós-ovulação, com a administração de 40 mg de EPE via intramuscular uma vez ao dia. A prostaglandina F2 α , foi aplicada no 1^o e 2^o dia da administração do EPE. O tratamento com EPE foi interrompido quando a maioria dos folículos apresentou um diâmetro ≥ 35 mm ou uma ovulação, onde então foram administrados 3.300UI hCG. As inseminações artificiais foram realizadas diariamente após a administração do hCG, utilizando 1×10^9 de espermatozóide com motilidade progressiva. Dois dias após a última ovulação, os ovários e os ovidutos foram removidos, das éguas, via laparotomia com acesso ao flanco. Os resultados destes autores, demonstraram uma maior taxa de ovulações para o grupo tratado com EPE (3,6) do que para o grupo controle não superovulado (1,1). O intervalo entre a 1^o e a última ovulação foi similar entre os grupo tratado e não tratado (0,3 e 0,0 dias respectivamente) e o período de tratamento com EPE foi de seis dias. Um maior percentual de éguas tiveram ovulações múltiplas quando tratadas com EPE do que no grupo controle (92,9% "13/14" éguas e 21,4% "3/14" éguas respectivamente). O percentual de corpos lúteos (C.L.) resultante das ovulações foi similar entre os grupos tratados (92,7% "51/55") e não tratado (94,1% "16/17"). Cinco C.L. foram formados pela luteinização espontânea de folículos sem ovulação (04 C.L. do grupo tratado e 01 C.L. do grupo não tratado). Um

maior número de embriões foi recuperado de éguas superovuladas do que das éguas controle (2,0 e 0,7 respectivamente). Entretanto, o percentual de ovulações, resultando em embriões foi similar entre os grupos tratado e não tratado (57,1% "28/49" e 62,5% "10/16"). Estes autores, relatam que não há diferença na taxa de recuperação de oócitos não fertilizados do oviduto de éguas tratadas com EPE e o grupo controle não tratado. Foram recuperados 46 oócitos não fertilizados, sendo 41 classificados como oócitos de ciclos anteriores (19 oócitos de éguas tratadas com EPE e 22 oócitos de éguas controle) e cinco aparentando ser do presente ciclo experimental (04 oócitos das éguas tratadas com EPE e 01 oócito do grupo controle). Baseado no total de cinco oócitos não fertilizados e 28 embriões recuperados do presente ciclo experimental, foi observado um percentual de 87,5% (28/32) e 90,9% (10/11) de oócitos fertilizados entre o grupo tratado com o EPE e o grupo controle respectivamente. Dentre os 34 embriões recuperados, foram observados dois dias após a última ovulação, diferentes números de blastômeros entre o grupo superovulado (01 embrião com 02 células; 13 embriões com 04 células; 01 embrião com 06 células e 13 embriões com 08 células) e o grupo não superovulado (01 embrião com 04 células e 05 embriões com 08 células).

Bezard et al. (1995) estudaram o número de oócitos recuperados entre éguas pôneis superovuladas (tratamento longo e curto) e não superovuladas (controle) em fase cíclica, com idade de quatro a 17 anos, e 230 a 370 kg de peso vivo. O grupo do tratamento longo, consistiu em iniciar o tratamento superovulatório no 8^o dia pós-ovulação e terminar com a presença de dois ou mais folículos ≥ 35 mm de diâmetro; já o grupo do tratamento curto, iniciou-se com a presença de folículos com o diâmetro de no máximo 17 mm, e terminou quando dois ou mais folículos apresentaram 25 mm de diâmetro. A dose administrada do EPE foi de 0,75mg uma vez ao dia. A prostaglandina F2 α foi administrada no 7^o e 8^o dia pós-ovulação para ambos os grupos, e a indução da ovulação foi de 25 mg do EPE via venosa. A punção folicular foi realizada entre 34 e 35 h

pós-indução das ovulações. Os autores obtiveram uma média de 1,09 folículos no grupo controle, 2,29 para o tratamento longo e 2,8 para o tratamento curto. Quarenta e seis oócitos foram recuperados de 68 folículos pré-ovulatórios. A taxa de recuperação de oócito por folículo puncionado não houve diferença significativa entre os grupos controle (79%) e os grupos superovulados (61%), também não havendo diferença entre os tratamentos longo e curto (50% e 68% respectivamente). Já o número de oócitos por ciclo, foi significativamente menor no controle que no superovulado (0,66 e 1,17 oócitos respectivamente), com uma tendência ($p=0,06$) para um maior número de oócitos recuperados para o tratamento curto (1,58 oócitos) em relação ao tratamento longo (0,73 oócitos).

Rosas et al. (1998) compararam a eficiência de uma fração enriquecida de FSH eqüino (60,8 μ g de FSH/mg e 11,5 μ g de LH/ng) com o EPE (68,3 μ g de FSH/mg e 97,0 μ g de LH/ng) na indução de ovulações múltiplas e na taxa de embriões recuperados em 10 éguas durante a estação ovulatória. A dose diária administrada para ambos os grupos foi de 25 mg via intramuscular, iniciando o tratamento no 6^o dia pós-ovulação, e encerrando o mesmo quando dois ou mais folículos apresentaram um diâmetro ≥ 35 mm, sendo em seguida administrados 25 mg de EPE via venosa para induzir as ovulações. No 1^o e no 2^o dia de tratamento foram administrados 250 μ g de cloprostenol. As inseminações artificiais foram realizadas diariamente após a indução das ovulações com 500×10^6 de espermatozóides com motilidade progressiva. Neste experimento o número médio de administrações do hormônio folículo estimulante (eFSH) e do EPE foram de 7,6 e 8,0 dias respectivamente, e o intervalo do início do tratamento à 1^o ovulação ($p>0,05$) foi de 10,4 e 10,2 dias respectivamente. Não houve diferença significativa entre a proporção de éguas com duas ou mais ovulações em resposta ao tratamento com eFSH (0,8) e EPE (0,8), porém, a proporção de ambos os grupos tratados foram maiores que no grupo controle não superovulado (0,0). O número de ovulações por égua também foi maior para os grupos

eFSH (4,6) e EPE (3,6) ($p>0,05$), do que no grupo não superovulado (1,0) ($p<0,05$).

Estes pesquisadores observaram, que o número de embriões recuperados por éguas superovuladas foi similar entre os grupos eFSH e EPE (2,0 e 2,0 respectivamente), sendo superiores ao grupo não tratado (0,4 embrião). O diâmetro do maior folículo pré-ovulatório foi de 38,0 mm; 38,1 mm e 36,4 mm para os grupos eFSH; EPE e controle não superovulado respectivamente. As ovulações ocorreram 48 h após a administração de 25 mg de EPE via venosa. Entretanto, vinte e cinco anos se passaram e o protocolo utilizado para induzir as ovulações múltiplas em éguas consistia na administração de EPE uma vez ao dia (Alvarenga et al., 1999), portanto, até então nenhum estudo teria avaliado a resposta superovulatória de éguas cíclicas tratadas com EPE duas vezes ao dia (Alvarenga et al., 2001).

Baseado em prévios estudos onde o aumento da taxa superovulatória em éguas foi obtido quando houve um aumento na dose diária de EPE (Woods & Ginther, 1982), associado com o melhor resultado obtido em vacas, quando foi aumentada a frequência da administração do FSH (Monniaux et al., 1983).

Alvarenga et al., (1999) propuseram o tratamento com EPE duas vezes ao dia, relatando uma melhor resposta superovulatória em éguas utilizando o EPE em duas administrações ao dia. Neste experimento, os autores visando aumentar a resposta superovulatória em éguas cíclicas, compararam a administração do EPE em uma e duas aplicações ao dia e relataram que 25 mg do EPE administrados duas vezes ao dia, iniciando o tratamento no mesmo dia da injeção da $\text{PGF2}\alpha$ (entre os dias seis e oito do diestro) e encerrando quando a presença de folículos ≥ 35 mm de diâmetro, induz a uma resposta superovulatória significativamente maior do que a administração uma vez ao dia (6,1 e 2,0 folículos/ ciclo respectivamente), contudo o índice de recuperação dos embriões foi insatisfatório.

Em um experimento subsequente, Alvarenga et al. (2001) utilizando o mesmo protocolo, porém, iniciando o tratamento superovulatório com folículos ≤ 20 mm de diâmetro, constataram uma melhor resposta superovulatória e um maior número de embriões recuperados. O número de ovulações foi de 1,2 para os ciclos controle não tratados, 2,4 e 7,1 para os grupos tratados com a administração do EPE uma e duas vezes ao dia respectivamente. O número de embriões recuperados por égua foi de 1,6 e 3,5 para os grupos tratados uma e duas vezes ao dia respectivamente. Os dias de tratamento e o intervalo do início do mesmo à primeira ovulação foi em média de 6,6 e 8,3 dias respectivamente. Não havendo diferença entre o percentual de embriões recuperados por ovulações entre os diferentes tratamentos (69% e 49% para os grupos tratados uma e duas vezes ao dia respectivamente).

Seguindo a mesma linha de pensamento, Scoggin et al. (2002) estudaram em 58 ciclos de diferentes éguas, o efeito do aumento da frequência ou da dose do EPE. Foram administradas 25 mg 1 x/dia, 50 mg 1 x/dia, 12,5mg 2 x/dia e 25 mg 2 x/dia por um período médio de 7,2; 6,1; 8,2 e 7,0 dias respectivamente, sendo que o início do tratamento ocorreu no quinto dia do diestro, e a administração da PGF2 α no sétimo dia do diestro. O número médio de ovulações por égua e o percentual de éguas com maior ou igual a duas ovulações foram de 3,4 e 80%; 4,4 e 100%; 3,4 e 60%; 4,7 e 90% respectivamente. O número médio de embriões por égua e o percentual de embriões recuperadas por ovulações foi de 1,2 e 35,3%; 1,5 e 36,4%; 2,6 e 67,6%; 2,1 e 43,2% respectivamente.

Em um outro estudo, os mesmos autores verificaram o efeito da administração do EPE duas vezes ao dia em doses decrescentes. A dose do EPE foi iniciada com 35 mg por administração, decrescendo a mesma em 10 mg ao dia, mantendo as ultimas 10 mg de tratamento por um período médio de 6,7 dias. O número de folículos ≥ 35 mm de diâmetro e o número de ovulações por égua foi de 4,0 e 3,3 respectivamente. O percentual de éguas com ≥ 2 ovulações foi de 88,9%; o número de

embriões recuperado por égua foi de 2,3; o percentual de embriões recuperado por ovulações e o percentual de éguas com ≥ 2 embriões recuperados foi de 60% e 75% respectivamente.

No primeiro estudo de Scoggin et al. (2002) o EPE apresentou em seu composto um nível de 1,41mg eFSH/ml e 3,37mg eLH/ml; já no segundo estudo estes níveis foram de 2,01mg eFSH/ml e 5,95mg eLH/ml.

A superovulação na espécie eqüina açoitou a entusiasmada cosmovisão científica de alguns pesquisadores. Entretanto, é uma biotécnica que fascina o intelecto de vários estudiosos (Day, 1940; Douglas et al, 1974/1979; Lapin & Ginther, 1977; Woods & Ginther, 1983; Squires et al., 1987a; Palmer et al., 1993; Dippert et al., 1994; McCue, 1996; Rosas et al., 1998; Alvarenga et al. 1999 e 2001; Scoggin et al., 2002; Carmo et al., 2002b) que buscam desvendar uma das mais empolgantes charadas da fisiologia da reprodução eqüina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação do extrato de pituitária eqüina

As Pituitárias foram adquiridas no matadouro de eqüinos (Pomar Ltda.) localizado na cidade de Araguari, no estado de Minas Gerais. Elas foram removidas através de um corte oblíquo caudo/cranial na região caudal ao pavilhão auricular e mandíbula; após remoção do encéfalo a pituitárias puderam ser visualizadas alojadas nas células túrsicas, de onde foram removidas com o auxílio de uma espátula.

As pituitária extraídas foram lavadas com solução fisiológica, sendo em seguida armazenadas em pacotes plásticos e conservadas a uma temperatura de -20° C por duas semanas, quando então foram transportadas para o laboratório do Departamento de Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, estado de São Paulo, em caixa térmica contendo gelo seco.

O extrato de pituitária eqüina foi preparado segundo o método proposto por Guillon & Combarnous, (1983). Depois de descongeladas, as pituitárias foram banhadas em água destilada/deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com solução de 40% de etanol, “álcool etílico P.A. (Laboratório Dinamica®)”, e 6% de acetato de amônia (Laboratório Synth®). A fração ativa foi precipitada e aumentou-se a concentração de etanol em 80%, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20° C.

Ao ser utilizado, o EPE liofilizado foi diluído em solução fisiológica na proporção de 10 mg/mL, sendo conservado em refrigerador a 5° C no período máximo de sete dias.

Os níveis de FSH e LH presentes no EPE, foram avaliados na Universidade da Califórnia – Davis – EUA pela Dr(a) Jeneth Rose, através da técnica de radioimunoensaio (R.I.A.) – LH 493 μ g / FSH 331 μ g - (60% e 40% respectivamente).

3.2. Fase pré-experimental

Nesta fase pré-experimental foi comparado o efeito da estimulação ovariana em hamster, utilizando-se o extrato de pituitária equina através das administrações de doses constantes e doses decrescentes. Este experimento objetivou utilizar um modelo animal de baixo custo, para verificar a eficiência do EPE produzido em nosso laboratório, bem como verificar se esta espécie é um bom modelo experimental para os estudos com o EPE.

O experimento foi conduzido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP campus de Botucatu, utilizando – se 84 fêmeas hamsters oriundas do Biotério Central da UNESP – campus de Botucatu, com idade entre 60 a 85 dias de vida, pesando entre 120 a 150gr e submetidas a fotoperíodo de 14 horas de luz ao dia, em temperatura média de 22° C de acordo com Bavister (1989).

Foram avaliados sete grupos, no delineamento inteiramente casualizado em três repetições por grupo, com a utilização do eCG em dose única e do EPE em dose constante ou dose decrescente, duas vezes ao dia durante quatro dias consecutivos, distribuídos nos seguintes grupos: G.1) EPE constante, G.2) EPE decrescente, G3) eCG, G4) EPE constante + hCG, G.5) EPE decrescente + hCG, G6) eCG + hCG, G.7) controle (solução fisiológica). As dosagens utilizadas nos grupos foram: eCG (25 UI); EPE em doses constantes (0,01 mg / aplicação); EPE decrescente (0,016 mg; 0,012 mg; 0,008 mg; 0,004 mg / aplicações), solução fisiológica, por via subcutânea. O hCG foi administrado via subcutânea em dose única de 25 UI para todos os grupos de tratamento, sendo que o mesmo foi aplicado 48 h após a administração do eCG e 12h após a última aplicação dos grupos tratados com EPE.

Todos os animais foram eutanasiados 15h após a administração do hCG pelo método de deslocamento da região cervical, sendo em seguida

posicionados em decúbito dorsal e higienizados o ventre com algodão embebido em álcool 70%. Foi realizada uma pequena incisão na pele perpendicular à linha média, estendendo-a até completa exposição do útero e ovários.

Com o auxílio de tesoura, os ovidutos e ovários foram removidos e colocados em placas de Petri descartáveis individuais contendo DPBS (Dulbelco Modificado – Nutricell, Campinas-SP) (Bavister, 1989).

Através da utilização de um estereomicroscópio com aumento de 20 vezes, os ovidutos foram dilacerados com uma agulha 30x08 permitindo a saída dos oócitos envoltos em massa celular do cumulus oóphorus sendo então transportados para uma outra placa de Petri contendo DPBS. Os oócitos foram avaliados e contados. Os ovários foram totalmente limpos dos restos de lipídios, pesados e computados o número de estruturas lúteas e folículos maiores ou iguais a 1 mm.

3.2.1. Análise estatística

Foi utilizada para a análise estatística, a análise de variância para o delineamento inteiramente ao acaso seguido do método de Tukey para comparações múltiplas. Tendo sido as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.3. Fase experimental

3.3.1. Animais:

3.3.1.1. Éguas

Seis éguas sem raça definida (mestiças) em bom estado geral de saúde, com idade variando entre quatro a 15 anos, massa corpórea entre 400 a 500 Kg e com históricos reprodutivos normais foram utilizadas

durante o período compreendido entre 01 de novembro de 2001 e 05 de março de 2002.

O experimento foi conduzido no Posto de Monta da Fazenda Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu (LAT.22° S e LONG. 48° W), estado de São Paulo, onde as éguas foram mantidas em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo e suplementação mineral, Centauro® (Guabi – São Paulo, SP), em um consumo médio diário de 70g. A ração Cavalil® (Socil Guyomarc'h – São Paulo SP) com os seguintes níveis de garantia por quilo do produto de: Umidade (máx.) 13%; Proteína Bruta 13%; Matéria Mineral 15%; Matéria Fibrosa 18%; Extrato Etéreo (min.) 2%; Cálcio (máx.) 1,6%; Fósforo (min.) 0,5%; enriquecida com vitaminas A, D3, E, B1, B2, B12, foi fornecida no cocho duas vezes ao dia em um total de cinco quilos/égua, o feno de coast - cross (*Cynodon dactylon*) foi ofertado três vezes ao dia, em um total de doze quilos/égua.

3.3.1.2. Garanhão

Foi utilizado nas inseminações artificiais das éguas superovuladas, sêmen de um único garanhão da raça Árabe com bom histórico de fertilidade.

O sêmen foi colhido com o auxílio de uma vagina artificial modelo Botucatu (Papa & Alvarenga, 1984) sendo então analisado o ejaculado em microscópio com contraste de fase e posteriormente diluído em meio Kenney (Kenney, 1975) na proporção de 1:1, realizando-se a inseminação com 1×10^9 de espermatozoides viáveis, em um volume de 30 a 40ml.

Dez meses antes do início do experimento e durante o mesmo, a qualidade do sêmen foi avaliado semanalmente (2 a 3 vezes/semana) Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros médios das avaliações dos ejaculados do garanhão utilizado nos períodos compreendidos entre os 10 meses que antecederam o experimento e durante a realização do mesmo.

PARÂMETROS	ANTES EXPERIMENTO	DURANTE EXPERIMENTO
Motilidade total subjetiva (%)	80	86
Vigor (1 a 5)	3,5	4
Volume (ml)	41	45
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	180	148
Supra – Vital (%)	75	80
Motilidade total computadorizada (%)	85	87
Motilidade progressiva computadorizada (%)	40	43

3.4. Monitorização das éguas

A ultra-sonografia uterina e ovariana foi realizada com auxílio de ultra-som Pie-Medical, modelo 450 com transdutor de 5,0MHZ. As éguas com alterações visíveis nas imagens ultra-sonográfica foram descartadas, utilizando apenas as que apresentaram útero e ovários normais ao exame ultra-sonográfico e citologia negativa.

Seis ciclos estrais consecutivos de cada égua selecionada foram utilizadas, sendo o primeiro ciclo para detecção do dia da ovulação (D0), o segundo ciclo a ser superovulado (dose constante ou dose decrescente), o terceiro e o quarto ciclos monitorados para detecção do intervalo entre ovulações. O quinto ciclo estral foi superovulado (dose constante ou dose decrescente) e o sexto ciclo estral monitorado para a verificação do intervalo inter-ovulatório.

O cio das éguas foi realizada diariamente e individualmente em troncos de contenção, com o auxílio de um rufião.

Apartir da manifestação do cio, a ultra-sonografia foi realizada diariamente para detectar a ovulação (D0). Antes de iniciar o tratamento

superovulatório no sétimo dia do ciclo estro, foi realizada nova avaliação uterina e ovariana; neste momento uma exploração minuciosa do útero visou verificar a presença de conteúdo e/ou edema uterino, onde na presença destes, não se executaria o protocolo superovulatório. Na exploração ovariana, verificou-se a presença de corpo lúteo e folículos, sendo estipulado para o início do tratamento superovulatório a presença de um corpo lúteo bem evidente e a presença de folículos com diâmetro menor ou igual 25 mm.

O acompanhamento ultra-sonográfico persistiu a cada 24h desde o início do tratamento superovulatório (D7) até a última ovulação. Todos os folículos com diâmetro maior ou igual a 10 mm presentes no início do tratamento foram medidos diariamente após a imagem ultra-sonográfica ser congelada, utilizando-se a função de medição eletrônica disponível no aparelho, até a detecção da última ovulação.

No dia da colheita dos embriões (D8), realizou-se uma exploração ultra-sonográfica para verificar a presença dos corpos lúteos e a mensuração dos mesmos, e avaliar as condições do útero. Após a realização da colheita dos embriões, as éguas foram submetidas a monitorização ultra-sonográfica diariamente por dois ciclos estrais subsequentes. Sete dias após o final do segundo ciclo, iniciou-se outro protocolo superovulatório, seguindo a mesma linha da monitorização ultra-sonográfica do ciclo anteriormente superovulado (Figura 1).

O último ciclo estral após a colheita dos embriões do segundo protocolo superovulatório foi acompanhado para verificar o intervalo inter-ovulatório bem como o diâmetro do folículo pré-ovulatório.

3.5. Protocolos superovulatórios

As mesmas éguas foram submetidas aos dois protocolos superovulatórios, dose constante e dose decrescente do EPE, em dois ciclos estrais distintos. A escolha do protocolo a ser iniciado foi escolhido aleatoriamente através de sorteio para a primeira égua que entrou em

estro, as éguas subsequentes que entraram em estro acompanharam em ordem inversa ao protocolo proposto para a égua anterior; por exemplo: primeira égua que entrou em estro foi utilizado o protocolo superovulatório em dose constante, a segunda égua que entrou em estro utilizou o protocolo superovulatório em dose decrescente, a terceira égua que entrou em estro utilizou o protocolo superovulatório em dose constante, e assim sucessivamente alternado para as demais éguas. No segundo ciclo estral a ser superovulado foi estabelecido o protocolo superovulatório inverso ao primeiro ciclo estral superovulado (Figuras 2 e 3).

3.5.1. Descrição dos protocolos superovulatórios

As éguas foram tratadas com extrato de pituitária eqüina em doses constantes e doses decrescentes, onde se iniciou o tratamento superovulatório no sétimo dia do ciclo estral. O tratamento foi interrompido quando a maioria (>50%) dos folículos atingiu 35mm de diâmetro, administrando-se 3000UI de Gonadotrofina Corionica Humana “hCG” (Vetecor® - Laboratório Calier, São Paulo-SP) endovenosa, e realizando a primeira inseminação artificial. Esta foi repetida diariamente utilizando um bilhão de espermatozóides viáveis até que tivessem ocorrido as ovulações em um intervalo ovulatório máximo de três dias.

A administração do EPE nos protocolos superovulatórios poderiam ser estendidos no máximo em dez dias de tratamento se os folículos dominantes estabelecidos não atingissem o diâmetro estabelecido. No final do sétimo dia do tratamento superovulatório, a dose total do EPE foi padronizada em 350 mg para ambos os protocolos. A PGF2 α (250 μ g/dia de cloprostenol), foi administrada no sétimo e oitavo dia do ciclo estral, via intramuscular.

3.5.1.1. Dose Constante (fig.2)

- **Primeiro dia do tratamento (7º dia pós - ovulação):** iniciou-se no período da manhã (7:00 h) administrando-se 25mg/IM do EPE e após uma hora e meia a PGF2 α 250 μ g/IM. No período da tarde (18:00 h), aplicou - se 25mg/IM do EPE.
- **Segundo dia do tratamento:** pela manhã (7:00 h), administrou-se 25 mg/IM do EPE e uma hora e meia mais tarde a PGF2 α (250 μ g). No período da tarde (18:00 h) aplicou-se 25mg/IM do EPE.
- **Do terceiro dia a no máximo dez dias de tratamento:** aplicou-se o EPE pela manhã (7:00 h) e à tarde (18:00 h) sempre utilizando 25mg/IM.

3.5.1.2. Dose Decrescente (fig. 3)

- **Primeiro dia do tratamento:** iniciou-se o tratamento no período da manhã (7:00 h) do sétimo dia pós-ovulação administrando-se 40mg/IM de EPE. Uma hora e meia mais tarde, foi feita uma aplicação de 250mg/IM de PGF2 α , e no período da tarde (18:00 h) administraram-se 40mg/IM;
- **Segundo dia do tratamento:** aplicação de 35mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e uma hora e meia mais tarde 250mg/IM de PGF2 α . A tarde (18:00 h) administrou-se somente o EPE (35mg/IM);

- **Terceiro dia do tratamento:** administraram-se 30mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e 30mg/IM à tarde (18:00 h);
- **Quarto dia do tratamento:** administraram-se 25mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e 25mg/IM à tarde (18:00 h);
- **Quinto dia do tratamento:** administraram-se 20mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e 20mg/IM à tarde (18:00 h);
- **Sexto dia do tratamento:** administraram-se 15mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e 15mg/IM à tarde (18:00 h);
- **Sétimo dia do tratamento:** administraram-se 10mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e 10mg/IM à tarde (18:00 h).
- **Do oitavo ao décimo dia do tratamento:** administraram-se 10mg/IM do EPE pela manhã (7:00 h) e 10mg/IM à tarde (18:00 h).

3.6. Colheita dos embriões

A colheita dos embriões foi realizada no oitavo dia após a primeira ovulação detectada, no intuito de recuperar embriões em estágio de mórula a blastocisto expandido (D6, D7 e D8).

Antes da colheita dos embriões, a égua foi previamente avaliada com o auxílio do ultra-som via trans-retal, para verificar as condições uterina (tonicidade, presença ou não de conteúdo) e o número de estruturas lúteas e o diâmetro destas. O períneo foi higienizado com água e sabão neutro e a cauda enfaixada com uma atadura, e por último desinfetado o períneo com “Kilol” (Laboratório Quinabra, São José dos Campos-SP).

Para o procedimento da técnica da colheita dos embriões, foi utilizada uma sonda de Foley modelo Bivona® (Bivona Medical Technologies, Gary, IN, EUA) acoplada a um frasco de Ringer com Lactato de Sódio (J.P. Indústria Farmacêutica-Ribeirão Preto-SP), (Alvarenga et al., 1993). Após a introdução via cervical para o corpo do útero, o balonete de “cuff” localizado no ápice da sonda foi inflado com 45 ml de ar, bloqueando a abertura cervical e impedindo desta forma o retorno do líquido infundido no útero.

Foram realizados inicialmente três lavados uterinos de um litro/lavado, onde cada litro infundido para o interior do útero, teve seu refluxo para dentro de um filtro coletor de 0,75 µc. Após os três lavados, o filtro foi levado ao laboratório e acrescido de 10 ml do meio Ham-F 10 + BSA, com o intuito de nutrir o meio onde se encontra os embriões. O conteúdo do filtro foi então despejado em uma placa de Petri de 45x25 com o fundo quadriculado, lavando o filtro novamente com 20 ml de Ham-F 10 + BSA com o auxílio de uma seringa de 20 ml e uma agulha 30x0,8, para remoção de todo o conteúdo presente no filtro para dentro da placa.

A placa de Petri foi conduzida à lupa, e submetida a uma rigorosa inspeção com o aumento de 20 x e 40x. Localizados os embriões, estes foram banhados em quinze gotas do meio Ham-F 10 + BSA presentes em

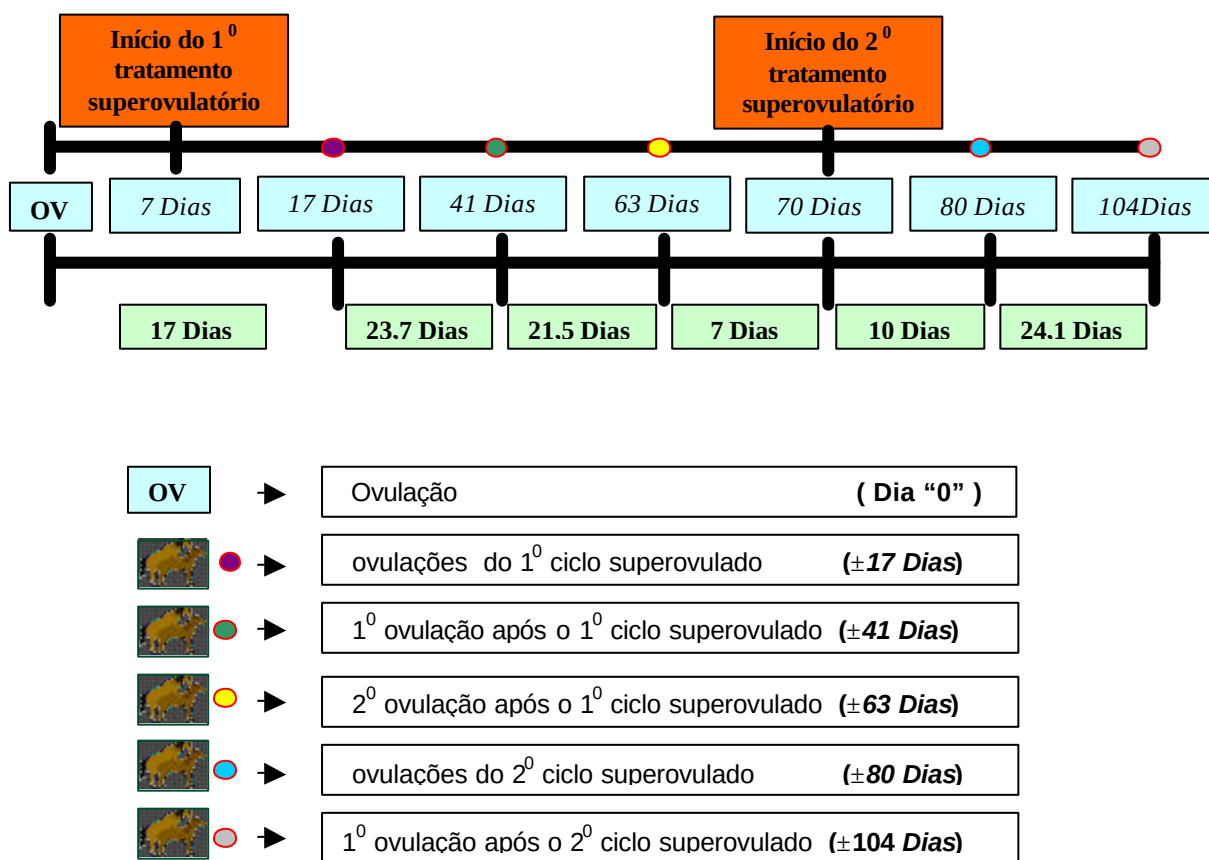
uma placa de petri 40 x 25, com a finalidade de remover restos de descamação uterina que possam estar aderidos ao embrião.

Dois outros lavados de um litro/lavado, foram realizados para obtenção de embriões que, por ventura, não tenham sido recuperados nos três primeiros lavados uterinos. Seguiu-se o mesmo procedimento laboratorial descrito anteriormente.

Sete dias após a colheita de embriões, realizou-se um exame ultra-sonográfico minucioso, para diagnosticar-se uma possível gestação de embrião que por ventura não fora recuperado nos lavados uterinos. Portanto, não foi administrada a prostaglandina $F_{2\alpha}$ logo após a colheita dos embriões.

3.7. Análise estatística

O teste “t de Student” foi utilizado com a finalidade de comparar o tratamento em doses constantes e o tratamento em doses decrescentes para o número de ovulações por égua, embriões recuperados por égua e embriões recuperados por ovulações. O teste de Chi-quadrado e o de Goodman foram utilizados para comparar proporções de éguas com diferentes números de ovulações entre os tratamentos. Para estudo das correlações entre o número de folículos e de ovulações, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Figura 1 – Intervalos entre os tratamentos superovulatórios.

4. Resultados

4.1. Fase pré-experimental

Os resultados do pré-experimento com 84 hamster superovuladas com o EPE em doses constantes, EPE em doses decrescentes e eCG, estão presentes na tabela 3 (três), e em uma forma mais detalhada no anexo “A”.

Os grupos tratados com o eCG e solução fisiológica, foram delineados para servir de referência aos estudos com o EPE, a despeito que o eCG é um hormônio de eleição na superovulação de hamster, e a solução fisiológica é uma solução aleatória que não influencia na resposta ovariana.

Tabela 3 – Média e desvio padrão referente às variáveis: número de folículos, número de corpos lúteos, total de estrutura no ovário, número de oócitos e peso do ovário, segundo grupos.

Grupos	Variáveis				
	Nº Folículos	Nº Corpos lúteos	Total de estruturas no ovário	Nº Oócitos	Peso do ovário (g)
EPE (Const.)	74,3 ± 15, 1 ab	49,7 ± 19,5 b	124,0 ± 11,2 a	8,7 ± 3,5 ab	0,14 ± 0,01 c
EPE (Dec.)	89,0 ± 6,3 a	29,3 ± 9,7 c	118,3 ± 13,7 b	14,3 ± 12,4 ab	0,12 ± 0,01 d
eCG	39,0 ± 26,1 b	145,3 ± 74,8 ab	184,3 ± 49,4 a	30,0 ± 26,2 ab	0,20 ± 0,009 abc
EPE (Const.) + hCG	34,0 ± 13,9 c	105,3 ± 30,8 abc	139,3 ± 17,2 a	18,7 ± 11,5 ab	0,20 ± 0,02 bc
EPE (Dec.) + hCG	36,7 ± 3,8 b	87,3 ± 16,2 abc	124,0 ± 19,5 ab	54, ± 5,5 ab	0,20 ± 0,03 bc
EcG + hCG	22,0 ± 12,1 c	166,0 ± 62,2 a	188,0 ± 50,9 a	56,7 ± 33,2 a	0,30 ± 0,05 a
Sol. Fisiol.	8,3 ± 0,6 c	24,0 ± 4,0 c	32,3 ± 4,5 b	6,7 ± 0,6 b	0,09 ± 0,01 d

* EPE – Extrato de pituitária equina

* Const. – Constante

* Dec. – Decrescente

* hCG – Gonadotrofina corionica humana

* Sol. Fisiol. – Solução fisiológica

* eCG – Gonadotrofina coriônica equina

Figura 4 – Número médio de corpos lúteos (CL) e oócitos recuperados de hamsters superovuladas com extrato de pituitária equina em doses constantes (EPEc) e doses decrescentes (EPEd), e com a gonadotropina coriônica equina (eCG).

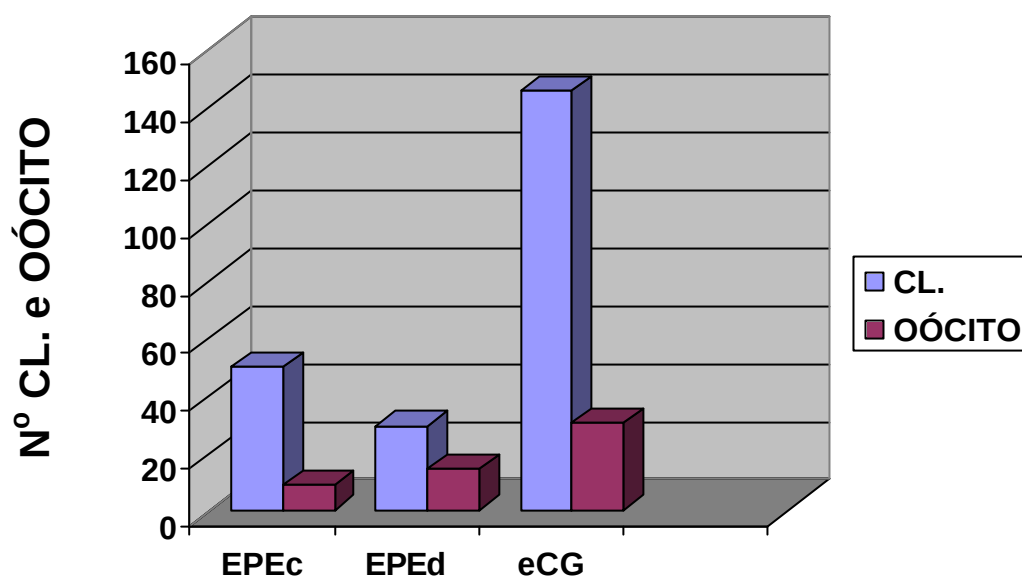
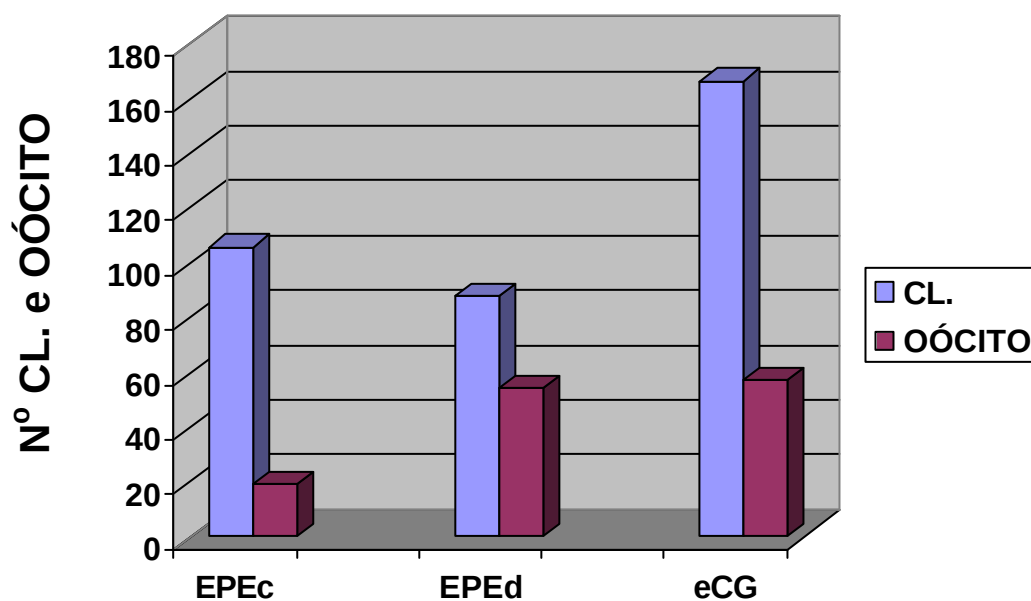


Figura 5 - Número médio de corpos lúteos (CL.) e oócitos recuperados de hamsters superovuladas com extrato de pituitária equina em doses constantes (EPEc) e doses decrescentes (EPEd), e com a gonadotropina coriônica equina (eCG), induzidas às ovulações com hCG.



4.2. Fase experimental

Foram recuperados em 12 ciclos estrais de 06 (seis) éguas superovuladas com EPE entre os dois grupos tratados (doses constantes e doses decrescentes) 18 embriões (07 e 11 embriões respectivamente) de 51 ovulações (21 e 30 ovulações respectivamente), perfazendo um índice de recuperação embrionária geral de 36%. Quando comparamos separadamente os grupos tratados em doses constantes e doses decrescentes, a média de ovulações por égua foi de 3,5 e 5,0, e os índices de recuperação embrionária foram de 30% e 38% respectivamente.

O diâmetro médio entre os folículos pré-ovulatórios antes do primeiro tratamento superovulatório, do primeiro e segundo ciclo pós primeiro tratamento e do primeiro ciclo pós segundo tratamento superovulatório, não houve diferença estatística significativa (39,3 mm; 37,5 mm; 39,8 mm e 41,8mm respectivamente). O crescimento diário dos folículos pré-ovulatórios foi semelhante entre os tratamentos superovulatório, apresentando uma dinâmica de crescimento médio de 2,6 mm por dia.

A duração do primeiro e segundo ciclo estral após o primeiro tratamento superovulatório e do ciclo estral que sucedeu o segundo tratamento superovulatório foi de 23,7; 21,5 e 24,1 dias respectivamente ($p>0,05$). O intervalo em dias do início do tratamento superovulatório com o EPE à administração do hCG, e o tempo de ação do hCG em horas, foi de 8,0 dias e 40h respectivamente para o grupo tratado em doses constantes e 7,7 dias e 41,5h respectivamente para o grupo tratado em doses decrescentes ($p>0,05$).

Foi observado um baixo número de ciclos que apresentaram ovulações em intervalo de tempo menor que 24h após a administração do hCG entre os grupos 01 e 02, tendo sido observado no grupo em dose constante em duas éguas; na primeira égua (égua 3) foi observado em 1 (um) de 4 (quatro) ovulações, e na segunda égua (égua 5) em 2 (duas) de

3 (três) ovulações. No grupo em dose decrescente em duas éguas; na primeira égua (égua 1) foi observado em 1 (uma) de 4 (quatro) ovulações, e na segunda égua (égua 6) em 2 (duas) de 6 (seis) ovulações.

O mesmo foi observado após as 48h da administração do hCG, onde uma égua (égua 4) no grupo em dose constante apresentando 3 (três) de 6 (seis) ovulações, já no grupo em dose decrescente, duas éguas ovularam após às 48h; para a primeira égua (égua 2) foi observado em 1 (uma) de 4 (quatro) ovulações, e para a segunda égua (égua 5) em 1 (uma) de 3 (três) ovulações.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando comparado o percentual de éguas com ≥ 2 ovulações entre os grupos tratados em dose constante (83% 5/6 éguas) e dose decrescente (100% 6/6 éguas), e entre os períodos do primeiro tratamento (100% 6/6 éguas) e do segundo tratamento (83% 5/6 éguas). Também não houve diferença ($p>0,05$) quando comparado o percentual de éguas com um ou mais embriões recuperados entre os grupos superovulados com dose constante (50% 3/6 éguas) e com dose decrescente (83% 5/6 éguas), e entre os períodos do primeiro (83% 5/6 éguas) e do segundo tratamento superovulatório (50% 3/6 éguas).

Apenas em um ciclo de uma égua (égua 1), não houve resposta ao tratamento superovulatório no grupo em dose constante, ocorrendo a emergência de apenas um folículo pré-ovulatório acarretando em ovulação, entretanto não resultando na recuperação do embrião. Em outras duas éguas que responderam ao tratamento superovulatório também não houve recuperação dos embriões. Na primeira égua (égua 4) que respondeu ao tratamento superovulatório (em dose constante) foram observadas 06 (seis) ovulações, entretanto nenhum embrião foi recuperado; na segunda égua (égua 6) também não houve a recuperação de embriões.

Para esta segunda égua (égua 6), a não recuperação dos embriões foi observada em ambos os tratamentos superovulatórios (dose constante e dose decrescente) de 02 (duas) e 06 (seis) ovulações

respectivamente, porém, um outro ciclo que sucedeu o último tratamento superovulatório foi monitorado e realizada a inseminação artificial conforme executado nos protocolos superovulatórios, com 1×10^9 de espermatozóides viáveis e do mesmo garanhão, realizando a colheita do embrião também no 8º dia pós-ovulação, o que resultou na recuperação de um embrião, o que vem nos confirmar a fertilidade da égua.

Em duas éguas (uma em dose constante “égua 1” e outra em dose decrescente “égua 4”) foram observadas no segundo dia do início do tratamento com o EPE a ovulação de um folículo em cada égua, com um diâmetro de 25,2 mm e 25,5 mm respectivamente. A maioria dos folículos pré-ovulatórios chegou à ovulação, entretanto, em apenas uma égua (égua 2) onde foi observado a presença de sete folículos pré-ovulatórios, ocorreu a ovulação de somente cinco destes (diâmetro médio de 35,1mm). Três dias após a ovulação dos cinco folículos, os dois folículos restantes luteinizaram (diâmetro médio de 39,7mm).

Não houve diferença ($p > 0,05$) no número de inseminações artificiais por égua entre os grupos superovulados em doses constantes e doses decrescentes.

Foram realizados no processo da colheita dos embriões, inicialmente três lavados uterinos e após a avaliação destes, foram realizados mais dois lavados procedendo a mesma técnica dos anteriores. Nestes dois últimos lavados uterinos houve apenas a recuperação de 1 (um) dos 3 (três) embriões da “égua 3”, que foi tratada em doses constantes.

Sete dias após a colheita dos embriões, foi realizada em todas as éguas uma avaliação uterina com o auxílio do ultra-som com o propósito de verificar uma possível gestação referente a não recuperação do embrião dos lavados uterinos, entretanto nenhuma prenhez foi diagnosticada.

Os resultados que comparam os tipos de tratamentos superovulatórios com o EPE em doses constantes e doses decrescentes, estão sumariados nas tabelas 4 a 15, e as diferenças entre o primeiro e

segundo período de tratamento nas tabelas 14 e 15. As tabelas 16 e 17 demonstram os resultados obtidos entre o primeiro e segundo período de tratamento, independente do tipo do tratamento (dose constante ou decrescente). Já nas tabelas 18 e 19, estão caligrafadas as classificações morfológicas e o grau de integridade celular dos embriões recuperados entre os dois tipos de tratamento.

Tabela 4 - Média e desvio - padrão das variáveis segundo doses constantes e decrescentes

Variável	Constante	Decrescente	Valor de p
Dias de tratamento	$8,0 \pm 2,3$	$7,7 \pm 1,4$	0,78
Intervalo do início trat. à 1º ovulação (dias)	$9,8 \pm 2,9$	$9,8 \pm 1,5$	1,00
Intervalo da 1º à última ovulação (dias)	$1,5 \pm 1,9$	$1,2 \pm 1,7$	0,75
Diâmetro médio do folículo pré-ov.(mm)	$34,9 \pm 4,6$	$33,4 \pm 4,0$	0,68
Nº ovulações pós-I.A.	$3,5 \pm 1,9$	$5,0 \pm 2,2$	0,26
Nº embriões	$1,2 \pm 1,3$	$1,8 \pm 1,3$	0,24
Percentual de recuperação embrionária	$30,2 \pm 34,9$	$37,8 \pm 19,7$	0,63

Figura 6 – Número médio de ovulações (OV) e de embriões recuperados (EMB), segundo os tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária eqüina em doses constantes (EPEc) e doses decrescentes (EPEd).

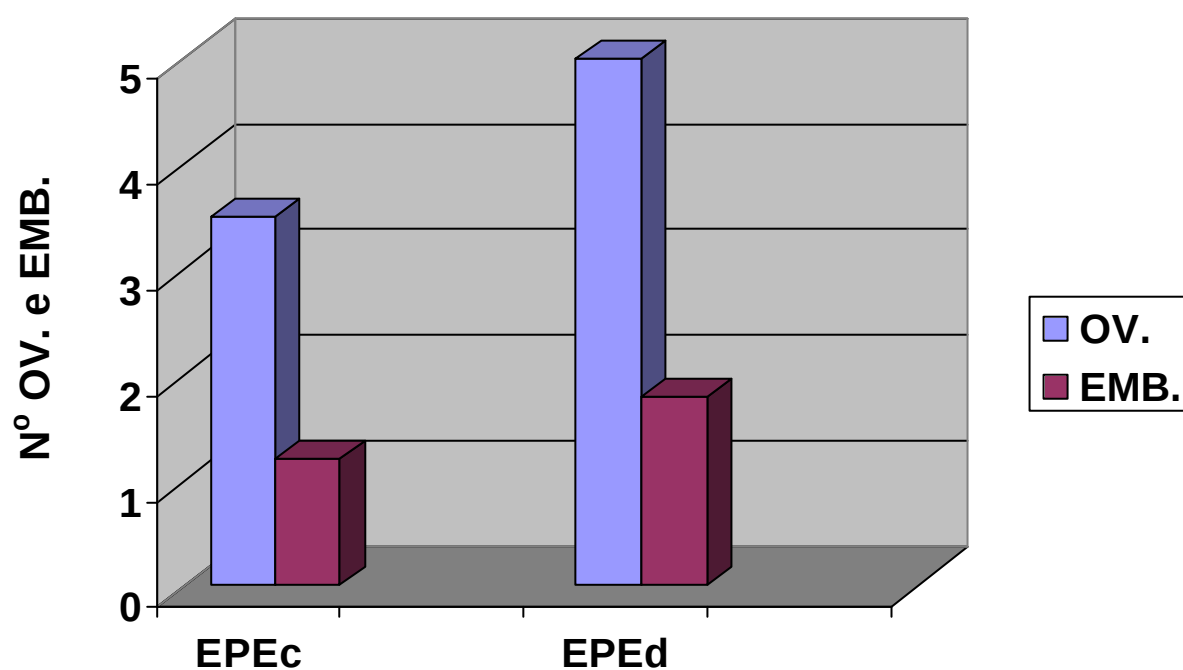


Tabela 5 – Resposta superovulatória em éguas tratadas com o extrato de pituitária eqüina em doses constantes e doses decrescentes segundo número de ovulações pós-inseminação artificial, número de embriões e percentual de recuperação embrionária.

Éguas	Grupos	Número Ovulações após I.A.	Número Embriões	Percentual Recuperação Embrionária
1	CONST DEC.	1,0	0,0	0%
		4,0	2,0	50%
2	CONST DEC.	5,0	2,0	40%
		4,0	2,0	50%
3	CONST DEC.	4,0	3,0	75%
		9,0	4,0	44%
4	CONST DEC.	6,0	0,0	0%
		4,0	2,0	50%
5	CONST DEC.	3,0	2,0	66%
		3,0	1,0	33%
6	CONST DEC.	2,0	0,0	0%
		6,0	0,0	0%

Tabela 6 - Número e percentual de éguas com ovulações múltiplas e embriões recuperados, segundo grupos.

Ovulações	Grupos		Valor de p.
	Constante	Decrescente	
< 2 Ovulações	1 (16,7)	- (0,0)	1,00
≥ 2 Ovulações	5 (83,3)	6 (100,0)	
≥ 1 Embrião recuperado	3 (50,0)	5 (83,3)	1,00
≥ 2 Embrião recuperado	3 (50,0)	4 (66,6)	

Tabela 7 – Correlação linear entre o número de folículos (10 –15 mm e 16 – 20 mm) e o número total de ovulações segundo grupo em doses constantes

Égua	Nº fol. 10 –15mm	Nº fol. 16 – 20 mm	Total	Nº Ovulações
1	2	5	7	1*
2	2	3	5	5**
3	4	3	7	4
4	3	7	10	6
5	6	3	9	3
6	7	0	7	2
Total	24	21	25	21

* Uma ovulação no segundo dia do tratamento superovulatório (folículo com diâmetro de 25,2 mm no início do tratamento), não sendo computado no número total de ovulações.

** Entre as 5 (cinco) ovulações, uma foi de um folículo mensurando 25 mm no início do tratamento superovulatório.

Nº Folículos	Correlação (r)	Valor de p
10 – 15 mm	-0,30	0,56
16 – 20 mm	0,43	0,39

Não houve correlação linear entre o número de folículos e o número de ovulações total

Tabela 8 – Correlação linear entre o número de folículos (10 – 15 mm e 16 – 20 mm) e o número total de ovulações segundo grupos em doses decrescentes

Égua	Nº fol. 10 – 15mm	Nº fol. 16 – 20mm	Total	Nº Ovulações
1	8	4	12	4
2	2	5	7	4
3	4	5	9	9*
4	4	3	7	4**
5	5	2	7	3
6	7	0	7	6
Total	30	19	49	30

* Dentre as 9 (nove) ovulações, uma foi de um folículo com diâmetro médio de 15 mm, que emergiu no quarto dia do tratamento superovulatório.

** Uma ovulação no segundo dia do tratamento superovulatório (folículo com diâmetro de 25,5 mm no início do tratamento), não sendo computado no número total de ovulações.

Nº Folículos	Correlação (r)	Valor de p
10 – 15 mm	-0,04	0,94
16 – 20 mm	0,19	0,72

Não houve correlação linear entre o número de folículos e o número de ovulações total

Tabela 9 – Correlação linear entre o número de folículos (10 – 15 mm e 16 – 20 mm) e o número total de ovulações segundo os dois grupo estudados

Égua	Nº fol. 10 – 15 mm	Nº fol. 16 – 20 mm	Total	Nº Ovulações
1	10	9	19	5*
2	4	8	12	9**
3	8	8	16	13***
4	7	10	17	10****
5	11	5	16	6
6	14	0	14	8
Total	54	40	94	51

* Uma ovulação no segundo dia do tratamento superovulatório (folículo com diâmetro de 25 mm no início do tratamento), não sendo computado no número total de ovulações.

** Dentre as nove ovulações, uma foi de um folículo mensurando 25 mm no início do tratamento superovulatório

*** Uma ovulação de um folículo que emergiu no quarto dia do tratamento superovulatório.

**** Uma ovulação no segundo dia do tratamento superovulatório (folículo diâmetro de 25,5 mm no início do tratamento), não sendo computado no número total de ovulações.

Nº Folículos	Correlação (r)	Valor de p
10 – 15 mm	-0,42	0,40
16 – 20 mm	0,20	0,69

Não houve correlação linear entre o número de folículos e o número de ovulações total

Tabela 10 – Correlação linear do número de folículos entre 10 – 15 mm e 16 – 20 mm que culminaram com ovulações segundo grupo em doses constantes.

Égua	Nº fol. 10 – 15 mm	Nº Ovulações	Nº fol. 16 – 20 mm	Nº Ovulações
1	2	1	5	0
2	2	1	3	3
3	4	2	3	2
4	3	3	7	3
5	6	1	3	2
6	7	2	0	0
Total	24	10	21	10

Nº Folículos	Correlação (r)	Valor de p
10 – 15 mm	0,11	0,82
16 – 20 mm	0,44	0,39

Não houve correlação linear entre o número de folículos e o número de ovulações total

Tabela. 11 – Correlação linear do número de folículos entre 10–15 mm e 16 – 20 mm que Culminaram com ovulações segundo grupo em doses decrescentes

Égua	Nº fol. 10 – 15 mm	Nº Ovulações	Nº fol. 16 – 20 mm	Nº Ovulações
1	8	2	4	2
2	2	0	5	4
3	4	4	5	5
4	4	3	3	1
5	5	2	2	1
6	7	6	0	0
Total	30	17	19	13

Nº Folículos	Correlação (r)	Valor de p
10 – 15 mm	0,56	0,25
16 – 20 mm	0,89	0,02

Não houve correlação linear entre o número de folículos (10 – 15mm) e o número de ovulações, havendo uma correlação positiva e significativa para o número de folículos de 16 – 20mm em relação ao número de ovulações

Tabela. 12 – Correlação linear do número de folículos 10 – 15 mm e 16 – 20 mm que culminaram com ovulações segundo os dois grupos estudados

Égua	Nº fol. 10 – 15 mm	Nº Ovulações	Nº fol. 16 – 20 mm	Nº Ovulações
1	10	3	9	2
2	4	1	8	7
3	8	6	8	7
4	7	6	10	4
5	11	3	5	3
6	14	8	0	0
Total	54	27	40	23

Nº Folículos	Correlação (r)	Valor de p.
10 – 15 mm	0,62	0,19
16 – 20 mm	0,62	0,19

Não houve correlação linear entre o número de folículos e o número de ovulações total

Tabela. 13 - Número total de folículos, ovulações e o percentual de ovulações segundo diâmetro folicular em diferentes grupos.

Grupos	N ^o folículos 10-15mm (ov)	% de ov (10-15 mm)	N ^o folículos 16 – 20 mm (ov)	% de ov. (16-20 mm)	N ^o total de ov	% total de ov
Constante	24 (10)	42%	21 (10)	48%	21*	47%
Decrescente	30 (17)	53%	19 (13)	68%	30	61%
Total	54 (27)	48%	40 (23)	58%	51	54%

* Uma ovulação de um folículo mensurando 25 mm no início do tratamento superovulatório.

ov. → ovulações

Tabela. 14 - Número e percentual do total de ovulações segundo os grupos no 1º e 2º período de tratamento

Grupos	1º Tratamento	2º Tratamento
CONSTANTE (EPEc)	12 (46,2%) ^a A	9 (36,0%) ^a A
DECRESCENTE (EPEd)	14 (53,8%) ^a A	16 (64,0%) ^a A
Total	26 (100,0)	25 (100,0)

P = 0,57

(1) Percentuais seguidos de diferentes letras minúsculas na comparação dos tratamentos dentro de cada dose, diferem estatisticamente.

(2) Percentuais seguidos de diferentes letras maiúsculas na comparação das doses dentro de cada tratamento, diferem estatisticamente

Figura. 7 – Número de ovulações segundo os grupos no 1º e no 2º período de tratamento.

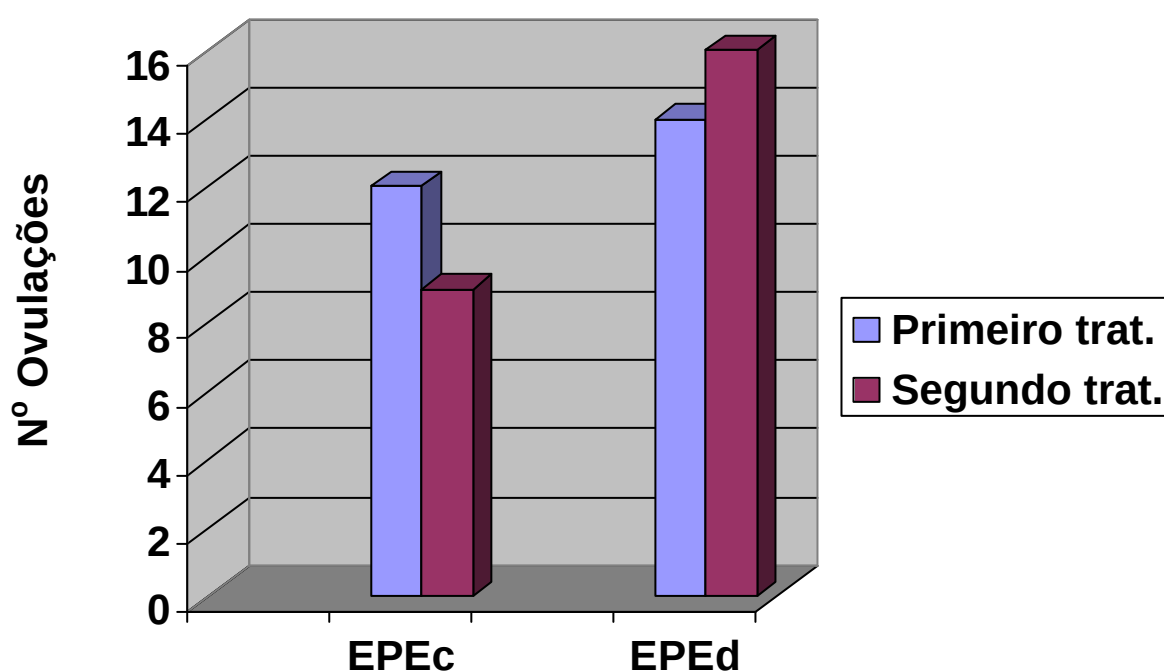


Tabela. 15 - Número e percentual total de embriões recuperados segundo os grupos no 1^o e 2^o período de tratamento

Grupos	1 ^o Tratamento	2 ^o Tratamento
CONSTANTE (EPEc)	7 (63,6%) ^a A	0 (0,0%) ^b B
DECRESCENTE (EPEd)	4 (36,4%) ^b B	7 (100,0%) ^a A
Total	11 (100,0)	7 (100,0)

P = 0,013

(1) Percentuais seguidos de diferentes letras minúsculas na comparação dos tratamentos dentro de cada dose, diferem estatisticamente.

(2) Percentuais seguidos de diferentes letras maiúsculas na comparação das doses dentro de cada tratamento, diferem estatisticamente.

Figura. 8 – Número de embriões recuperados segundo os grupos no 1^o e 2^o período de tratamento.

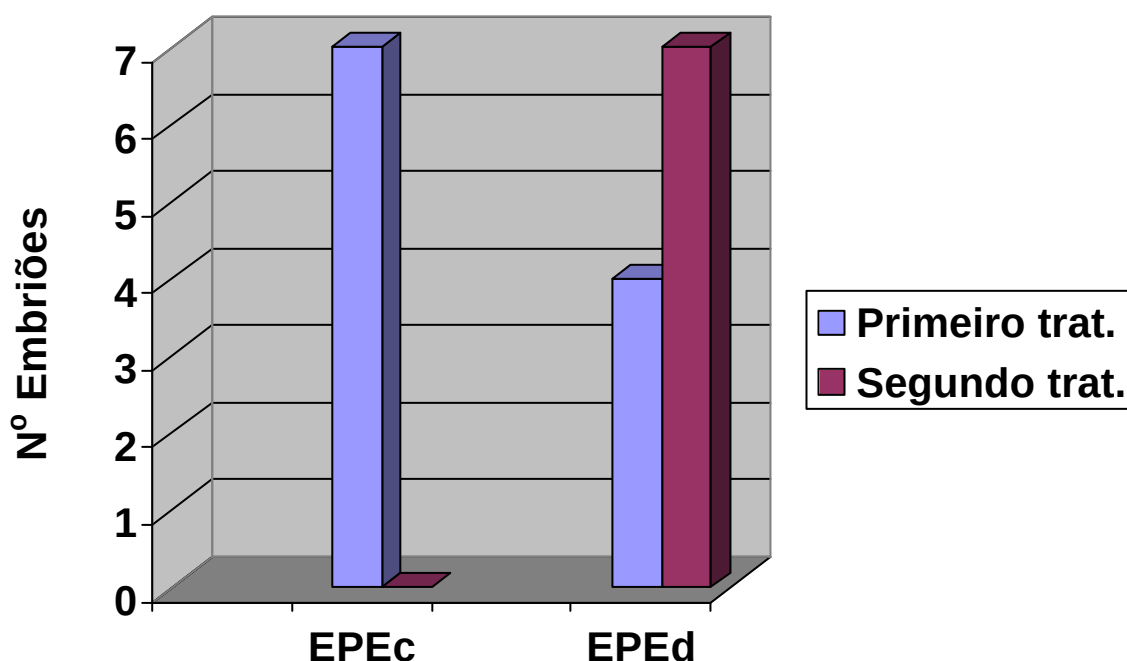


Tabela. 16 - Média e desvio padrão das variáveis segundo 1° e 2° período de tratamento

Variável	Tratamento		Valor de p
	1° Período	2° Período	
Dias de tratamento	7,2 ± 1,5	8,4 ± 2,1	0,31
Intervalo do início trat. à 1° ovulação (dias)	9,0 ± 1,8	10,7 ± 2,3	0,18
Intervalo da 1° à última ovulação (dias)	1,0 ± 0,6	1,7 ± 2,1	0,52
Diâmetro médio do folículo pré-ov.(mm)	30,9 ± 2,5	37,2 ± 2,8	0,02*
N° ovulações após - I.A.	4,3 ± 1,0	4,2 ± 2,9	0,90
N° embriões	1,8 ± 0,9	1,2 ± 1,6	0,24
Percentual de recuperação embrionária	52,7 ± 28,2	21,2 ± 23,8	0,0009*

Trat. – Tratamento

OV. - Ovulatório

I.A. – Inseminação Artificial

Tabela. 17 – Resposta superovulatória em éguas tratadas com o extrato de pituitária eqüina segundo o período de tratamento

Éguas	Tratamentos	Número Ovulações pós I.A.	Número Embriões	Percentual Recuperação Embrionária
1	1 ^o Trat.	4,0	2,0	50%
	2 ^o Trat.	1,0	0,0	0%
2	1 ^o Trat.	5,0	2,0	45%
	2 ^o Trat.	4,0	2,0	50%
3	1 ^o Trat.	4,0	3,0	75%
	2 ^o Trat.	9,0	4,0	44%
4	1 ^o Trat.	4,0	2,0	50%
	2 ^o Trat.	6,0	0,0	0%
5	1 ^o Trat.	3,0	2,0	66%
	2 ^o Trat.	3,0	1,0	33%
6	1 ^o Trat.	6,0	0,0	0%
	2 ^o Trat.	2,0	0,0	0%

Tabela. 18 - Classificação morfológica dos embriões entre os grupos tratados em doses constantes e doses decrescentes

Grupos	Mo (Mórula)	Bi (Blastocisto inicial)	Bl (Blastocisto)	Bx (Blastocisto expandido)	Nº Total Embriões
CONSTANTE	0	0	2	5	7
DECRESCENTE	0	0	1	10	11

P = 0,53

Tabela. 19 - Grau de classificação embrionária entre os grupos tratados em doses constantes e doses decrescentes

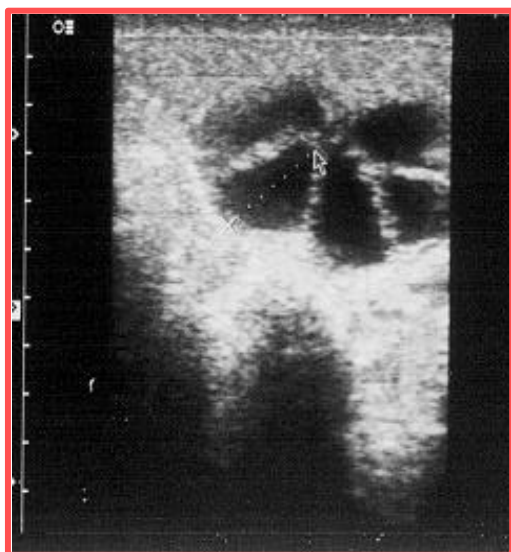
Grupos	G.I (Excelente)	G.II (Bom)	Nº Total Embriões
CONSTANTE	7	0	7
DECRESCENTE	9	2	11

P = 0,50

(1) Não houve embriões com grau de classificação G.III (Regular); G.IV (Ruim); G.V (Degenerado)

Figura. 9 – Resposta ovariana de égua tratada com extrato de pituitária equina ao terceiro dia com folículo de diâmetro médio de 25 mm (A), quinto dia com folículo de diâmetro médio de 30 mm (B) e ao oitavo dia com folículo de diâmetro de 35 mm (C) após o início do tratamento superovulatório.

A.



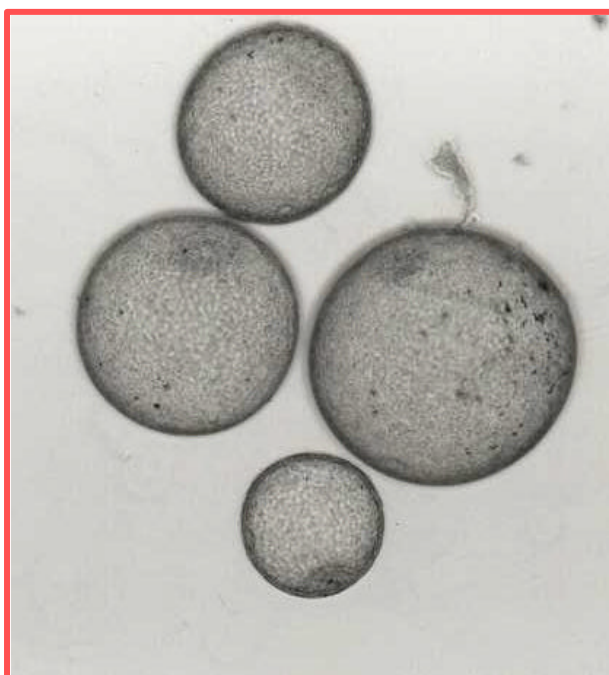
B.



C.



Figura. 10 – Embriões recuperados de égua uma égua superovulada com extrato de pituitária eqüina



5. Discussão

5.1. Fase pré-experimental

As tentativas de superovulação em hamster realizadas, resultaram em uma satisfatória resposta superovulatória. O grupo tratado com o eCG obteve uma maior resposta superovulatória, apesar de não ter apresentado uma diferença estatística significativa entre as variáveis, confirmando a eficácia deste hormônio na superestimulação ovariana em hamster, assim como relatado por Schellander et al. (1989) e Truelson et al. (1996).

Quando foi comparada a administração do EPE entre os grupos em doses constantes e doses decrescentes, observamos que as hamster que receberam o EPE em doses constantes apresentaram um número de corpos lúteos e peso ovariano significativamente superior ao das que receberam o EPE em doses decrescentes, sugerindo ser em consequência da constância da manutenção dos altos níveis de LH administrados, induzindo desta forma a ovulação precoce e/ou luteinização dos folículos. Fevold (1939) relatou que quanto maior o número de estruturas lúteas presentes no ovário, maior foi o peso ovariano.

A despeito da diferença no número de folículos não ter sido significativa entre os grupos tratados com o EPE, nós observamos que a administração em doses decrescentes teve um efeito menos deletério ao desenvolvimento folicular, sendo o mesmo observado por Carmo et al. (2001) em estudo com 61 hamster e por Monniaux et al., (1993) em vacas.

Assim como observado por Truelson et al., (1996), o hCG foi eficiente em induzir a ovulação em hamster. Foram observadas diferenças estatísticas apenas quando comparados o número de folículos com o grupo EPE (Dec.) + hCG, e o peso ovariano com os grupos tratados com o EPE (Const./Dec.) + hCG.

Apesar de não ter sido demonstradas estatisticamente diferenças significativa quanto ao número de oócitos recuperados entre os grupos tratados com o EPE (Const.), EPE (Dec.), EPE (Const.) + hCG e EPE (Dec.) + hCG, observamos um aumento no número médio de oócitos recuperados quando a administração do EPE procedeu-se em ambos os grupos tratados em doses decrescentes. Para os grupos tratados com EPE sem a administração do hCG, o número médio de oócitos recuperados foi de aproximadamente o dobro para o tratamento em doses decrescentes (14,3 oócitos) quando comparado com o tratamento em doses constantes (8,7 oócitos) ($p>0,05$); por outro lado, foi observado um maior número de corpos lúteos para o tratamento em doses constantes (49,7) do que em doses decrescentes (29,3) ($p<0,05$). Estas observações nos levam a sugerir que o tratamento em doses constantes acarretou em uma luteinização precoce dos folículos, impedindo a liberação do oócito (ovulação).

Já nos grupos tratados com o EPE + hCG, o número médio de oócitos recuperados também foi maior no tratamento em doses decrescentes do que no tratamento em doses constantes, chegando quase ao triplo de oócitos recuperados (54,0 e 18,7 respectivamente), apresentando inversamente a estes valores nos respectivos tratamentos, o número médio de estruturas lúteas presentes nos ovários (87,3 e 105,3) ($p>0,05$).

Podemos correlacionar esta melhor resposta do número de oócitos recuperados quando o EPE foi administrado em doses decrescentes, com os achados de Monniaux et al., (1983) em vacas, onde os autores observaram que um composto superovulatório com altas concentrações de LH, resultou em um maior número de embriões recuperados e viáveis, quando a administração foi realizada em doses decrescentes ao invés da administração em doses constantes (12,2 e 3,8; 5,3 e 2,4 embriões respectivamente), em consequência a uma melhor maturação folicular e oocitária.

Em todos os grupos das hamster superovuladas, houve um ou outro animal que não respondeu ao tratamento; acreditamos que a não totalidade de resposta positiva, deve-se ao não acompanhamento das fases do ciclo estral, conforme preconizado por Bousquet & Brackett (1982) e Bavister (1989) onde as fêmeas deveriam estar em fase de metaestro.

5.2. Fase experimental

Os valores médios, 4,25 ovulações e 1,5 embriões por égua obtida nos tratamentos superovulatórios dos dois protocolos estudados (dose constante e dose decrescente), onde 84% das éguas apresentaram múltiplas ovulações, nos permitem concluir que o EPE superestimulou com eficiência a atividade ovariana em éguas cíclicas, apresentando entretanto, baixas taxas de recuperação embrionária.

Dentre as informações disponíveis, alguns achados merecem destaque, Lapin & Ginther (1977) relataram que 57% das éguas superovuladas no período do diestro e 43% das éguas superovuladas no período do estro, respondem ao tratamento, obtendo uma média de 2,8 e 1,7 folículos pré – ovulatório por égua nos respectivos momentos; Douglas, (1979) observou que 75% das éguas superovuladas, responderam a estimulação ovariana, apresentando uma média de 2,3 ovulações; Squires et al. (1987a) relataram uma média de 3,8 ovulações/égua e 2,0 embriões recuperados em 92% das éguas superovuladas. Já Alvarenga et al. (2001) obtiveram o melhor resultado superovulatório até os nossos dias, utilizando o EPE em éguas, com uma nova proposta em fazer as administrações duas vezes ao dia, obtendo neste experimento 7,1 ovulações e 3,5 embriões recuperados por égua.

A baixa taxa na recuperação embrionária tem sido uma grande incógnita no processo da superovulação na espécie eqüina, levando-nos a suspeitar de uma influência na maturação oocitária dos folículos recrutados da onda folicular oriunda da superestimulação ovariana com a

utilização de uma droga que apresenta altos níveis de LH. O efeito deletérico dos altos níveis de LH foi observado por Donaldson et al. (1986) em vacas superovuladas utilizando fármacos com altas concentrações de LH. Desta forma o alto nível de LH é preocupante e mais agravante na espécie eqüina, pois, para esta, a maturação oocitária é precedida pelo aumento dos níveis de LH na fase estral, o que é uma fase longa (7 dias) quando comparado com os ruminantes.

Hyttel et al. (1989 e 1991) acreditam haver uma assincronia dos níveis circulantes de FSH e LH entre os folículos superestimulados em decorrência do fluxo sanguíneo intra-folicular não ser homogêneo entre estes folículos, o que pode acarretar em uma assincronia no desenvolvimento e na maturação entre os oócitos.

Outras sugestões relacionadas à baixa taxa de recuperação de embriões foram levantadas por Onuma & Ohnami (1975) e Liu et al. (1991), onde foram pertinentes em propor uma falha na captação dos oócitos pela fimbria do infundíbulo em decorrência do líquido folicular apresentar uma consistência gelatinosa, o que pode reter o oócito, impedindo-o de cair para o interior do infundíbulo ou mesmo bloqueando o lúmen do oviduto impedindo que o embrião migre do oviduto para o útero. Palmer et al. (1993) acreditam que a baixa taxa na recuperação de embriões é consequência da não fertilização do oócito, em função da falha do folículo em liberá-lo e/ou a produção do mesmo de baixa qualidade.

Na tentativa de compreender melhor a baixa taxa de embriões recuperados, procuramos minimizar o efeito deletérico do LH, através da administração do EPE duas vezes ao dia em doses decrescentes, tendo como grupo controle a administração do mesmo em doses constantes, assim como relatado por Alvarenga et al. (1999 e 2001). Não observamos diferença estatística em nenhuma das variáveis avaliadas quando comparados os diferentes tipos de tratamentos.

A nossa hipótese de poder haver uma melhora significativa em consequência da diminuição dos níveis circulantes de LH no processo

final da superovulação, foi baseada no observado por Monniaux et al. (1993) na espécie bovina, que constataram uma melhora significativa na taxa de ovulações e de embriões recuperados quando administraram um produto com altos níveis de LH em doses decrescente.

Um outro trabalho seguindo a mesma linha de raciocínio foi relatado por Alvin et al., (2000), onde observaram que o Pluset®, produto comercial com altas concentrações de LH, apresenta uma menor taxa de embriões recuperados e de embriões viáveis (15,3 e 6,8 respectivamente) quando comparado com um outro produto comercial, Foltropin®, que apresenta baixos níveis de LH em seu composto (16,5 e 9,7 respectivamente).

Os valores encontrados em nosso experimento quando comparados os grupos doses constantes e doses decrescentes, foram de 3,5 e 5,0 ovulações e 1,2 e 1,8 embriões recuperados, obtendo um percentual de embriões recuperados de 30,2% e 37,8% respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas. Entretanto, mesmo não tendo sido observada diferença significativa, as diferenças numéricas foram evidentes entre os tratamentos superovulatórios; provavelmente o pequeno número de animais tenha interferido nos resultados. Nossos resultados quanto a utilização do modelo experimental hamsters, demonstraram que doses constantes de EPE induzem a luteinização dos folículos, inibindo a liberação do oócito. Apesar de termos observado por ultra-som as ovulações, pode ter ocorrido um distúrbio na maturação folicular e oocitária que levou a uma baixa taxa de recuperação embrionária.

Em relação a estes valores podemos por em discussão o caso de uma égua (égua 6) que em ambos os tratamentos apresentou ovulações múltiplas, porém nenhum embrião foram recuperadas, sendo que, para o tratamento em dose constante foi constatado 2 (duas) ovulações contra 6 (seis) ovulações para o tratamento em doses decrescentes. Uma outra particularidade foi a égua “1” (um) que não respondeu ao segundo tratamento superovulatório (dose constante).

As variações individuais têm sido observadas entre a espécie bovina (Armstrong, 1993; Kohram et al., 1995), sendo que, 43% das vacas que respondem ao tratamento superovulatório, apresentam uma baixa taxa de embriões recuperados transferíveis ou nenhum embrião transferível (Nogueira, 2001). Adans et al. (1993) observaram que 24% das colheitas de embriões não resultaram em embriões, 64% produzem menos embriões transferíveis que a média (4 a 6 embriões/vaca) e que 30% das colheitas resultam em 70% dos embriões transferíveis.

A despeito de, na espécie bovina, serem eventualmente encontradas estruturas não fertilizadas e degeneradas no lavado uterino, nos eqüinos isso não é comum, todos os embriões degenerados e não fertilizados permaneceram retidos no oviduto. Isto foi identificado por Dippert et al. (1994) nos ovidutos de éguas superovuladas, éguas com ovulações múltiplas espontâneas e éguas com ovulações simples.

Nós observamos que os embriões recuperados apresentaram no dia da colheita (D8) um desenvolvimento retardado, sendo o mesmo observado por Armstrong, (1993) em embriões de vacas superovuladas. Esta incompatibilidade do tamanho dos embriões em relação ao dia da colheita, pode estar relacionada ao fato de que os oócitos não maduros no momento da ovulação, completem o seu desenvolvimento no oviduto (Armstrong, 1993).

Entretanto, todos os embriões recuperados em ambos os tratamentos foram classificados como embriões excelentes e bons. Squires et al. (1987a) observaram que a viabilidade dos embriões oriundos de éguas com ovulação simples, ovulações múltiplas espontâneas e ovulações múltiplas induzidas, é a mesma. Segundo Alvarenga (2003) (informação pessoal), a transferência de embriões proveniente de éguas superovuladas com EPE administrado duas vezes ao dia, resulta em bons índices de gestação.

Uma melhor resposta superovulatória foi observada nas éguas que apresentaram folículos entre 10 e 20 mm no início do tratamento, sendo

semelhante ao observado por Person & Ginther, (1990). Um achado importante a ser discutido, é pelo fato do percentual de ovulações entre os folículos de 10 a 20 mm ter sido maior para o grupo tratado em dose decrescente (61%) do que em dose constante (47%). Este achado pode ter relação com o desenvolvimento e a maturação folicular, por haver a necessidade de um maior nível de FSH no início do tratamento superovulatório do que no final do mesmo, como observado por Ginther et al. (1996) em vacas. Monniaux et al. (1983) também relataram uma melhor resposta superovulatória em vacas, quando foram realizadas as administrações em doses decrescentes de um produto com altos níveis de LH em seu composto, atribuindo-se ao propósito da necessidade de um maior nível de FSH no início do tratamento superovulatório de que no final do mesmo.

A média e o desvio padrão entre os dias de tratamento com o EPE ($8,0 \pm 2,3$ e $7,7 \pm 1,4$ dias), o intervalo entre o início do tratamento e a primeira ovulação ($9,8 \pm 2,9$ e $9,8 \pm 1,5$ dias), o intervalo interovulatório ($1,5 \pm 1,9$ e $1,2 \pm 1,7$ dias) e o diâmetro dos folículos pré-ovulatório ($34,9 \pm 4,6$ e $33,4 \pm 4,0$ mm) segundo doses constantes e decrescentes respectivamente, não demonstraram haver diferença estatística. A taxa de crescimento folicular ao dia (2,6 mm) foi superior ao relatado por Palmer et al. (1993) em éguas Pôneis (2,1 mm) superovuladas com o EPE, e inferior a descrição de Moura & Merkt (1996) (3,0 mm). Ginther (1986) também relatou um crescimento folicular ao dia de 3,0 mm em éguas não superovuladas.

Estes valores foram semelhantes aos encontrados por Dippert et al. (1994), quando avaliaram o período entre o início do tratamento e a primeira ovulação (7,0 dias), entretanto, Rosa et al. (1998) observaram um período mais longo (10,2 dias) do que os nossos achados. Alvarenga et al. (2001) relataram um período de 8,3 dias entre o início do tratamento à primeira ovulação. O intervalo interovulatório dos nossos resultados (1,5 dias constante e 1,2 dias decrescente), foram aquém dos relatados por Woods & Ginther (1983), Squires et al. (1987a) e Dippert et al. (1994),

onde demonstraram um sincronismo interovulatório de “0” (zero) dias, contudo, este intervalo não influenciou na recuperação dos embriões, pois a colheita destes foi realizada no oitavo dia pós-ovulação.

Rosa et al. (1998) descrevem a presença de folículos pré-ovulatórios com o diâmetro médio de 38,1 mm em éguas superovuladas utilizando doses constantes, sendo semelhante aos nossos achados quando as éguas foram tratadas em doses decrescentes (37,2 mm) porém, maiores do que as éguas tratadas em doses constantes (30,9 mm).

Porém, observamos que o diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios no primeiro período de tratamento, foi significativamente menor (30,9 mm) do que no segundo tratamento (37,2), o que pode ter sido consequência de uma maior ativação dos receptores de FSH nas células da granulosa, com a finalidade de sintetizar a produção da enzima aromatase para converter os altos níveis de andrógeno produzido pelas células da teca em estrógeno, em resposta ao acúmulo de LH presente nas células da teca do tratamento superovulatório anterior e atual.

Na literatura existem relatos do aumento das concentrações de andrógenos nas células da teca e conseqüentemente uma elevação dos níveis de estrógeno, quando vacas são superovuladas com um produto com altas concentrações de LH (Kelly et al., 1997).

Com relação ao percentual de embriões recuperados por ovulações, os nossos resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos tratados (30,2% constante e 37,8% decrescente). Scoggin et al. (2002) relataram um percentual de embriões recuperados de 60% utilizando doses decrescente do EPE, sendo superior aos nossos achados. Contudo, a média entre os nossos dois tratamentos (34%) foi compatível com os dados demonstrado por Scoggin et al. (2002) em um outro estudo, quando administrou o EPE uma vez ao dia em doses constantes, utilizando 25 ou 50 mg (35,3% e 36,4% respectivamente). Estes mesmos autores observaram uma melhora no percentual de embriões recuperados quando administrado o EPE duas vezes ao dia em 12,5 mg ou 25,0 mg (67,6% e 43,2% respectivamente). Alvarenga et al.

(2001) observaram um percentual de 69% e 49% de embriões recuperados por ovulação quando administradas 25 mg uma e duas vezes ao dia respectivamente.

Como já relatado anteriormente, o baixo percentual de embriões recuperados, também pode ter sido influenciado pelo baixo número de animais (6 éguas) e de ciclos tratados, sendo que Scoggin et al. (2002) utilizaram no programa superovulatório 58 ciclos de diferentes animais. Um outro fator importante a ser analisado, diz respeito aos trabalhos citados na literatura superovulatória eqüina, que não têm avaliados a influência da repetibilidade superovulatória em relação ao percentual de embriões recuperados como descrito em nossos estudos.

A despeito desta repetibilidade, observamos diferença estatística significativa no percentual de embriões recuperados entre o primeiro e o segundo período de tratamento ($52,7 \pm 28,2$ e $21,2 \pm 23,8$ respectivamente). Hofferer et al. (1991) utilizaram o EPE durante dois ciclos sucessivos sem a interrupção da administração ou com a interrupção por sete dias da mesma após a ovulação, e observaram a estimulação de múltiplos folículos, porém com baixa taxa na recuperação de embriões. Em estudos com vacas nelore na Índia, Chandra et al. (2002) atribuíram a capacidade de superovular quatro ciclos consecutivos com a utilização do FSHp e do implante vaginal CIDR-B (P4) que foi utilizado para sincronizar a onda folicular, e observaram que não há influência na resposta superovulatória e nem no número de embriões recuperados, entretanto, a taxa de fertilização dos embriões recuperados diminuiu após o 3^o ciclo tratado.

O número e o percentual de éguas que apresentaram ovulações múltiplas, ou seja, ≥ 2 ovulações não foi significativo entre os grupos, contudo, observamos que as éguas tratadas com doses decrescentes apresentaram 100% (6 éguas) de múltiplas ovulações, quanto que uma das éguas superovuladas em doses constantes não responderam ao tratamento 83,3% (5 éguas). Quanto ao número e o percentual de égua com ≥ 2 embriões, também não houve diferença significativa, onde em

66,6% (4 éguas) das éguas tratadas em doses decrescentes foram recuperados múltiplos embriões, contra 50% (3 éguas) das éguas tratadas em doses constantes.

Um dado significativo foi observado quando nós comparamos o número e o percentual de embriões recuperados segundo a administração de EPE em doses constantes e doses decrescente no primeiro e segundo período de tratamento. Foram recuperados das éguas tratadas em doses constantes no primeiro período de tratamento 7/11 embriões, ou seja, 63,6% dos embriões recuperados no primeiro período foram oriundos do tratamento em doses constantes, contra 36,4% dos embriões recuperados em doses decrescente (4/11 embriões). Já no segundo período de tratamento 100% (7/7 embriões) dos embriões recuperados foram originados do tratamento em doses decrescentes.

Repetições sucessivas do tratamento superovulatório tendem a diminuir a resposta superovulatória, tal qual a qualidade e a quantidade de embriões em vacas (Donaldson et al., 1986; Gonzalez et al., 1990). O grupo tratado em doses constantes no segundo período de tratamento, pode ter sofrido consequência dos altos níveis de LH, visto que este aumento pode causar efeito deletério na qualidade dos embriões, devido a uma maturação prematura do oócito (Murphy et al., 1984; Callesen et al., 1986; Kafi et al., 1997), mesmo tendo seguido o modelo do protocolo superovulatório em bovinos, onde se obedece um intervalado de dois ciclos estrais entre os tratamentos superovulatórios (Pinheiro-Andrioli et al., 1995). Para estes achados há necessidade de um maior número de estudos, a despeito do baixo número de repetições em nosso experimento (3 éguas em cada tratamento para o primeiro e segundo período). Os períodos do ciclo estral correspondentes ao pós-tratamento superovulatório não sofreram interferência do tratamento superovulatório com EPE, assim como observado por Douglas (1979) e Rosa et al. (1998), tendo sido o intervalo interovulatório médio de 23,7 e 21,5 dias para o primeiro e o segundo ciclo respectivamente, após o primeiro

tratamento superovulatório e 24,1 para o primeiro ciclo após o segundo tratamento superovulatório.

Quando foi comparado o número e o percentual de ovulações segundo os grupos em doses constantes e doses decrescente no primeiro e no segundo período de tratamento, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Sustentando relatos literários, como já citado anteriormente, que não observaram interferência no percentual de ovulações em vacas superovuladas, quando se intervalou dois ciclos entre uma e outra superovulação (Pinheiro-Andrioli et al.,1995).

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente experimento, podemos concluir que:

- 1) O Extrato de pituitária eqüina produzido em nosso laboratório foi eficaz em induzir ovulações múltiplas em éguas, com conseqüente aumento da produção de embriões por ciclo.
- 2) Os resultados do pré-experimento com hamsters, sugerem que doses constantes de EPE induzem a luteinização de um maior número de folículos, alterando o mecanismo de ovulação.
- 3) Não foi observada diferença estatística significativa na resposta superovulatória em éguas com a administração do extrato de pituitária eqüina entre doses constantes e doses decrescentes, entretanto, as diferenças numéricas da média de ovulações e de embriões recuperados, favoráveis ao grupo em dose decrescente, foram evidentes.
- 4) O tratamento com doses decrescentes de EPE propiciou uma recuperação média de aproximadamente 2 (dois) embriões/égua, o que é altamente desejável em um programa de transferência de embriões em eqüinos.
- 5) O número e o percentual de embriões recuperados entre o primeiro e o segundo período de tratamento superovulatório foi inferior no grupo tratado em doses constantes do extrato de pituitária eqüina.
- 6) A maioria dos folículos entre 16 e 20 mm presentes no ovário no início do tratamento superovulatório, culminou com ovulação. Sendo este parâmetro um bom indicativo do número de ovulações.

- 7) Estudos futuros são necessários para se determinar as razões do baixo índice de recuperação embrionária em éguas superovuladas com o EPE.

- 8) Sugerimos um estudo mais aprofundado dos mecanismos que envolvem a maturação oocitária em éguas superovuladas, assim como, dos mecanismos de ovulação e captação oocitária para o interior do infundíbulo, bem como do transporte deste através do oviduto e do embrião para o útero.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Anim. Reprod. Sci.** Amsterdam, v.30, p. 259 – 271, 1993.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, London, v.94, p.177 – 188, 1992.

ALFURAIJI, M.M.; ATKINSON, T.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.SM. Superovulation in cattle using PMSG followed PMSG-monoclonal antibodies. **Anim. Reprod. Sci.** Amsterdam, v.33, p.99-109, 1993.

ALLEN, W.R. Embryo transfer in the horse. In: Adams, C.E. (Ed): **Mammalian egg transfer**. Boca Raton, CRC Press, 1982. p. 135 – 154.

ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superestimulation in mares treated with EPE twice daily. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, suppl. 27, p. 197, 1999.

ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory. Response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, Los Angeles, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recovery equine embryos. **Equine Vet. J.** London, v.15, p.111-112, 1993.

ALVIM, M.T.T.; MATOS, S.P.M.; SALIBA, W.P.; BELISÁRIO, H.; BRANDÃO, F.Z.; PALHARES, M.S.; SILVA FILHO, J.M. Effect of two commercial products (Pluset®VS Folltropin®) on the superovulatory

response and the production of embryos in nelore cows. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Poto Alegre, v.28, p.189, 2000.

ANDERSON, E.; ALBERTINI, D.F. Gap junction between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **J. Cell Biol.** New York, v.71, p.680-686, 1976.

ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: **Fisiologia e manejo da reprodução eqüina**. 2^o ed, Recife, 1986, p. 57 – 63.

ARMISTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**. Los Altos, v.39, p.7 – 24, 1993.

AUSTIN, C.R; SHORT, R.V. Germ cells and fertilization. In: **Reproduction in mamals**. Book 1, Germ cells and fertilization, 2 ed., editora Cambridge University Press, 1982, p.101.

AYALON, D.; TSAFRIRI, A.; LINDNER, H.R.; CORDOVAT, T.; HARREL, A. Serum gonadotropin levels in pro-estrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, London, v.31, p.51-58, 1972.

BAILEY, V.E.; DOUGLAS, R.H. Induction of ovulation in seasonally-anovulatory mares with GnRH. **American Society Animal Science Meeting. Abstr.** p.133, 1977.

BARROS, B.J.P.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation nelore cows with 250IU of follicle stimulating hormone, **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.25, p.175, 1997.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; ANDREUSSI, P.A.T. Superovulation and fixed-time artificial insemination. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.28, p.49-60, 2000.

BAVISTER, R.D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of Golden hamster eggs. **Gamete Res.**, New York., v.23, p139 – 158, 1989.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biol. of Reprod.**, Madison., v. 28, p. 235 – 247, 1983.

BECKERS, J.F.; DRION, P.V.; FIGUEIREDO, J.R.; GOFFINN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: in vivo grow and in vitro culture. **Reprod. Dom. Anim.** Berlin., v. 31, p. 543-548, 1996.

BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, London., v.38, p. 87 – 98, 1989.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Superovulation of cows with PMSG: variations in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortizol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. **Anim. Reprod. Sci.** Amsterdam., v.15, p.37-52, 1987.

BEZARD, J.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Preovulatory maturation of follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Biol. Reprod.** Madison, v. 1, p. 261 – 271, 1995.

BO, G.A.; HOCKLEY, D.; TRIBULO, H.; JOFRE, F.; TRIBULO, R.; BUSSO, N.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin-V in the cow, **Theriogenology**, Los Altos., v.35, p.186, 1991.

BO, G.A.; MAETINEZ, M.; NASSER, L.F.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. Follicular dynamics in Bos-Indicus and Bos-Taurus beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: **10th Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, (Abstr.) v.2, p.221, 1993.

BO, G.A.; HOCKLEY, D.K.; NASSER, L.F.; AND MAPLETOFT. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of follitropin-V in beef cattle. v.42, p.963-975, 1994.

BO, G.A.; BIELANSKI, A.; PALASZ, A.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R. **Octavo curso de superovulación, colección y transferencia de embriones**. Cordoba: Instituto de reproducción animal Córdoba (IRAC), 2000, p.113.

BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v. 10, p. 175, 1978.

BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Embryo production in vitro: problems and prospects. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F. **Embryonic development and manipulation in animal production**, p.195-206, 1992.

BOUSQUET, D.; BRACKETT, B.G. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. **Theriogenology**, Los Altos, v. 17, p.198 – 213, 1982.

BRANNSTROM, M. AND HELLBERG, G.P. Bradykinin potentiates LH-induced follicular rupture in the rat ovary perfused in vitro. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 4, p. 475 – 481, 1989.

BRUCK, I.; LEHN-JENSEN, H. Multiple concepti after spontaneous multiple ovulation in a mare. In: **IV International Symposium on Equine Transfer and Other Advanced Technique**, Reims, France, 4, 1997. (abstract)

BURATINI JR. J. Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando a ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de Progesterona e hormônio Luteinizante. **Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista UNESP – Botucatu**, p. 27 – 39, 1997.

BYSKOV, A.G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. **Physiol Rev.** Los Altos, v. 66, n.1, p. 72 – 117, 1986.

CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; BÓ, G.A. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in beef cattle treated with CIDR-B, estrogen and progesterone. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, p.403, 1999.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.25, p.71-86, 1986.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; BAK, A.; GOTFREDSON, P.; HOLM, P. Preovulatory plasma estradiol-17 β concentrations and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. **Theriogenology**, Los Altos, v.34, p.251-258, 1990.

CARBODEVILA, J.; TORQUATI, S. Factores que modifican la respuesta superovulatoria en bovinos, **Rev. Arg. Prod. Animal**. Buenos Aires, v.11, n.1, p.57 – 78, 1991.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biol. Reprod.** Madison, v. 1, p. 209 – 214, 1995.

CARMO, M.T.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; LEÃO, E.S.C.; SIQUEIRA, E.S.C.; ALVARENGA, M.A. Superovulação em hamster utilizando extrato de pituitária equina com doses constantes e doses decrescentes. In: **5^o Amostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu, anais**, Botucatu (UNESP), p. 60, 2001.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões.. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, pg. 252 – 254, 2002a

CARMO, M.T.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; MACHADO, M.S.; MEDEIROS, A.S.L.; LEÃO, K.M.; GOMES, G.M.; CARVALHO, L.R.; ALVARENGA, M.A. In: Superovulatory response of mare treated twice daily with equine pituitary extract utilizing constant and decreasing doses – Preliminary Results – **Annual meeting of Society for Theriogenology, Proceedings**, Colorado Springs, CO, USA, 2002b

CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C.; MAULEON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fertil.** Londol, v. 55, p. 27 – 36, 1979.

CHANDRA, Y.R.; NARAYAN, P.G.; RAJIV, S.; SUMANT,V.; SUNDER,S.S. Repeated superovulation in cattle using CIDR-B and porcine FSH. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, n.1, p. 772, 2002.

CHUPIM, D.; COGNIE, Y.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.21, p.229, 1984.

CHUPIM, D.; COGNIE, Y.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R.; SAUMANDE, J. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: ROCHE, J.F.; O'CALLAGHAN, D. (Eds). **Follicular growth and ovulation rate in farm animal**. Martinus Nijhoff: Hague, 1987, p.66 – 72.

DAY, F.T. Clinical and experimental observation on reproduction in the mare. **J. Agric. Sci. Camb.** v.30, p.244-261, 1940.

DEANSLEY, R.Y. Germ cell development and the meiotic prophase in the fetal horse ovary. **Journal Reproduction Fertility**. London, v. 23, p. 547 – 552, 1978.

DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.;VAN TOL, H.T.M.; WILLEENSE, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 10, p. 275 – 292, 1986.

DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; GIELEN, J.TH. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. **Theriogenology**, Los Altos, v.27, p.222, 1987.

DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M.; DE LOOS, F.A.M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, p.25-41, 1993.

DIMMICK M.A, GIMENEZ T, SCHILAGER R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian v.s., Quarter Horse mares. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 31, p. 123 – 129, 1993.

DIPPERT, K.D.; JASKO, G.E.; SEIDEL, JR.; SQUIRES, E.L. Fertilization rate in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41, p. 1411-1423, 1994.

DIPPERT, K.J.; HOFFERER, S.; PALMER, E.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, Los Altos, v. 38, p. 695-710, 1992.

DONALDSON, L.E.; WARD, D.N. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. **Vet. Rec.** London, v.119, p.625-626, 1986.

DOUGLAS, R.H.; NUTI, L.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, Los Altos, v.2, p.133-142, 1974.

DOUGLAS, R.H.; Review of induction of suproovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, Los altos, v.11, p.33-46, 1979.

DOWNS, S.M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, Los altos, v. 39, p. 65 – 79, 1993.

DRIANCOURT, M.A.; PALMER, E. Time of ovarian follicular recruitment in cyclic pony mares. **Theriogenology**. Los Altos, v. 21, p. 591-600, 1984.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 35, p. 55 – 72, 1991.

DRIANCOURT, M.A.; GOUGEON, A.; ROYERE, D. et THIBAUT, C. La fonction ovarienne. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C. (ED.), **La Reproduction chez les Mammiferes et L'homme**. Paris, 1991, p. 273 – 298.

ENDERS, A.C.; LIU, I.K.; BROWERS, J.; LANTZ, K.C.; SCHLAFKE, S.; SUAREZ, S. The ovulated ovum of the horse: Cytology of nonfertilized ova to pronuclear stage ova. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 37, p. 452 – 466, 1987.

ELSDEN, R.P.; HASLER, J.F.; SEIDEL, G.E.JR.; Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**. Los Altos, v. 06, p. 523-529, 1976.

ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D.; SEIDEL, G.E.JR. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, Los Altos, v.9, p.1-26, 1978.

ELVIN, J.A.; YAN, C.; MATZUK, M.M. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. **Mol. Cell. Endocrinol**, Limerick, v. 159, p.1-5, 2000.

EPPIG, J.J. Growth and development of mammalian oocytes in vitro. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.116, p. 379 – 382, 1992.

EPPIG, J.J. AND O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. of Reprod.**, Madison, v. 54, p. 197 – 207, 1996.

ERICKSON, G.F. An analysis of development and ovum maturation. **Sem. Reprod. Endocrinol.**, New York, v. 4, p. 233 – 254, 1986.

ESPEY, L.L. Ovarian contractility and its relationships to ovulation: a review. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 22, p. 73, 1978.

FARINASSO, A.; DE FARIA, A.; MARIANTE, S.; DE BEM, A.R. Embryo technology applied to the conservation of equids. **Equine Vet. J.** London, suppl. 8, p. 84 - 86, 1989.

FERNANDES, C.A.C.; SANTOS, I.C. Follitropin-v dose-response to superovulation on cattle heifers. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.28, p.238, 2000.

FERNANDES, M.; SANCHEZ, L.; ALVAREZ, F.S.; VAZQUEZ, C.; IGLESIAS, A. Superovulation in rubia gallega cows with a single subcutaneous injection of FSH. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, p.217, 1993.

FEVOLD, H.L. Extraction and standardization of pituitary follicle stimulating and luteinizing hormones. **Endocrinology**, Baltimore, v. 24, nº 4, p. 435 – 446, 1939.

FIGUEIREDO, J.R. **Isolament, characterization et culture de follicules preantaux chez les bovins.** 1995, p.113. Tese (Doutorado) Universete de Liege, Liege.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; FIGUEIREDO, J.B.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Porto Alegre, v. 39, n.3, p. 485-487, 1987.

FORTUNE, J.E.; KIMMICH, T.L. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. **Equine Vet. J.**, London, v.15 (suppl), p.95-98, 1993.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 50, p. 225 – 232, 1994.

FRITZ, M.A.; SPEROFF, L. The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. **Fertil. Steril.**, v. 38, p. 509 – 529, 1982.

GINTHER, O.J.; MEIRA, C.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biology Reproduction**, Madison, p. 862-867, 2002.

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 90, p. 311 – 320, 1990.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Equine Vet. Sci.**, Wildomar, v. 9, p. 4 – 12, 1989.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v.87, p.223 – 230, 1989.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare**. Basic and applied aspects, 2^o ed. Cross Plains: Equiservices, 1992, 640p.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 99, p. 105 – 111, 1993.

GINTHER, O.J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos and type of embryos fixation in mares. **Journal Equine Veterinary Science**. Wildomar, v. 7, p. 82 – 88, 1987.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, P.M.; FRICKE, J.R.; GIBBONS, L.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, Madison, v.55, p. 1187 – 1194, 1996.

GUILLOU F.; COMBARNOUS Y. Purification of equine gonadotrophins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. **Biochem. Biophys Acta**, Amsterdam, v. 755, p. 229 – 236, 1983.

GINTHER, O.P. **Ultrasound imaging and reproductive events in the mare**. Madison: Equiservice, 1986. p.377.

GONG, J.G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, Los Altos, v.45, p.611-622, 1996.

GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**. Los Altos, v.33, p.519 , 1990.

GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Follitropin: a new preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, Los Altos, v.33, p.519-529, 1990.

GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v.35, p.158-162, 1994.

GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas:** Aplicações á Reprodução Animal. São Paulo: Varela, 2002, p. 340.

GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **J. Zool.**, London, v. 2, p. 169 – 175, 1987a.

GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. **J. Zool.** London, v. 211, p. 157 – 168, 1987b.

GOUDET, G.; BEZÁRD, J.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicular size and hormonal environment. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 57, p. 232 – 245, 1997.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, N. Maturation-promoting factor (MFP) and mitogen activated protein Kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Mol. Hum. Reproduction.** Oxford, v. 4, p. 563 – 570, 1998.

GORDON, I. Recovering the primary oocyte. In: Gordon, I. **Laboratory production of cattle embryos.** Cambridge: Raven Press, 1994. p. 71-82.

GRAN, D.G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** Colchester, n.38, p. 49-62, 1989.

GRAY, B.W.; STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, M.G.; RIDDELL, K.P.; DAVENPORT, G.; WRIGHT, J.C. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, p.227, 1993.

GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRUCK, I.; VIUFF, D.; BEZÁRD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. IN-VITRO production of equine embryos. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 1, p. 299 – 307, 1995.

HAFES, E.S.E **Reproduction in farm animal**. 5^a ed., Philadelphia. Lea & Febiger, 1987, 649p.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**., São Paulo, Manole, 1995, 582p

HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 126, p.242 – 252, 1988.

HENRY, M.; CORYN, M.; VANDEPLASSCHE, M. Multiple ovulation in the mare. **Zbl. Vet. Med. A**. Berlin, v. 29, p. 170 – 184, 1982.

HERRLER, A.; EINSPANIER, R.; SCHAMS, D.; NIEMANN, H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. **Theriogenology**, Los Altos, v.41, p.601-611, 1994.

HOFFER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **J. Reprod. Fertil.** London, v. 44, p. 341-349, 1991.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. In: Proc. Ann. Conv. of Am. Assn of Equine Practitioners, San Francisco, **Proceeding**, San Francisco, 1972, p. 119 - 148.

HULSHOF, S.C.J. **Bovine preantral follicles and their development in – vitro**. 1995, p.108, Yalelaan – Utrecht of Veterinary Medicine, Yalelaan, p. 108, 1995.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, p. 23 – 32, 1997.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **J. Reprod Fertil**, Madson, v.76, p.645 – 656, 1989.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and spermtransport in superovulated cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.35, p.91 – 108, 1991.

HIRSHFIELD, A.N. Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepuberal and mature rats. **Biol. Reprod.**, Madson, v. 32, p. 979 – 987, 1985.

HIRSHFIELD, A.N. Heterogeneity of cell populations the contribute to the formation of primordial follicles in rats. **Biol. Reprod.**, Madson, v. 47, p. 466 – 472, 1992.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Ver. cytol**, New York, v. 124, p. 43 – 101, 1991.

HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **J. Reprod. Fert.** Colchester, Suppl. n.44, p. 341 – 349, 1991.

IRELAND, J.J.,Control of follicular growth na development. **J. Reprod. Fertil.**,Colchester, suppl. v. 34, p. 39 – 54, 1987.

IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: ROCHE, J.F.; O`CALLAGHAN, D. **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Boston: M. Nijhoff, 1987, p. 1-18.

JANSON, P.O. Effects of luteinizing hormone on blood in the follicular rabbit ovary as measured by radioactive microspheres. **Acta Endocrinol.** v.79, p.122-123, 1975.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors and the culture of small preantral follicles of domestics cats. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, p. 889 – 895, 1996.

JOHNSON,A.L.; BECKER, S.E. Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrus mare. **J. Equine Vet. Sci.** Wildomar, , v. 8, nº 02, p. 130-134, 1988.

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reprod. Science**, Amisterdan, v.48, p.137-157, 1997.

KASIRAJ, R.; MUTHA RAO, M.; RANGAREDDI, N.S.; MISRA, A.K. Superovulatory response in buffaloe following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. **Theriogenology**, Los Altos, v.37, p.234, 1992.

KELLY,P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth ovulatory response and endocrine patterns. **Anim. Reprod. Sci**, Amisterdan, v.46, p. 1-14, 1997.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares. In: **ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONER**, v.21, p. 327-336, 1975.

KENNEY, R.M.; CONDON, W.; GARJAN, V.K.; CHANNING, C.P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their of viability or atresia. **J. Reprod fertil**, Colchester, v.27, 163-171, 1979.

KOHRAN, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUIBAULT, L.A. Follicular status and superovulations in cattle: a field trial. **Theriogenology**, Los Altos, v.43, p. 252, 1995.

KUEHNER, L.F.; RIEGER, D.; WALTON, J.S.; ZHAO, X.; JOHNSON, W.H. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, Los Altos, v.40, p.1003-1013, 1993.

LAPIN, D.R. AND GINTHER, O.J. Introduction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with na equine extract. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.44, p.834-842, 1977.

LAMBERSON, W.R.; LAMBERTH, V.A. Repeatability of response to superovulation in Brangus cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 26, p. 643-649, 1986.

LANGE, H.; REICHENBACH, H.D. Bovine superovulatory treatments: follicle stimulating hormone (FSH) preparations and superovulation treatment protocols as sources of variation in embryo transfer practice. suppl. 25, p.127, 1997.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Produção IN-VITRO de embriões equinos: Avanços e Limitações. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, suppl. v.27, n.1, p.54-89, 1999.

LASTER, D.B. Disappearance of na uptake of (125I) fsh in the rat, rabbit, ewe and cow. **J. Reprod. Fertil.** London, v.30, p.407-415, 1972.

LINDSELL, C.E.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of estrous cycle. **Theriogenology**, Los Altos, v.26, p.209-219, 1986.

LIU, I.K.M.; LANTS, K.C.; SCHLAFKES, S.; BOWERS, J.M.; ENDERS, A.C. Clinical observations of oviductal masses in the mare. **Proc. Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract**, Lexington, p.41-45, 1991.

LOSINNO, L.; AGUILAR, J.J. AND LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. **Equine Embryo Transfer**. v. 03, p. 81 – 83, 2000.

LOOS, de F.A.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMEN, S.J.; KRUIP, T.A.M.

Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation.

Theriogenology, Los Altos, v. 35, p. 537-545, 1991.

MANCIAUX, L.; PONSART, C.; GRISOUARD, D.; HUMBLLOT, P. Sources

of variation in embryo production following superovulation in the

Montbeliard breed. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, p. 502, 2000.

MANTOVANI, R.; MARCOLIN, G.; SILVESTRELLI, L.; BITTANTE, G.

Superovulatory response and subsequent reproductive performance. In:

Meeting of the european embryo transfer association. Lyon, 10, 1994,

p.214. Proceedings.

MAPLETOFT, R.J.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; DEL CAMPO, M.R. The

effect of lh content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. PROC. 12th

Int. Congr. Anim. Reprod., De Hague, v.1, p. 237-239, 1992.

MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in

the cow: practical considerations. **Embryo Transfer NewsI**, v. 11, p.15-24, 1993.

MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for

superovulation. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, Princeton Junction, v. 16, p. 127 – 141, 1994.

MASUI, Y.; MARKERT, C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. **J. Exp. Zool.**, New Yorkv.177,

p. 129 – 146, 1971.

MATOKA, S.; KAWATA, K.; MASAKI, K.; KUDO, S.; SAITO, N. Results

repeated superovulation in young holstein heifers using FSH and estradiol benzoate, and following fertility, **Theriogenology**, v.57, p.767, 2002.

MC CUE, P.M. Superovulation. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Los

Altos, Philadelphia, v.12, n.1, p.1-11, 1996.

MC CUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASHLEY, B.L. Effect on ovulation rate of possible immunization of mares against inhibin. **Equine Vet. J.** London, v.15 (suppl), p.103-106, 1993.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; COOOK, V.M. Equine embryo transfer: A review. **Comp Cont Educ Pract Vet.**, Princeton Junction, v.10, p. 343 – 355, 1988.

MCKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASSION, R.L. Increased ovulation rate in mares after immunization against recombinant bovine inhibin α -subunit. **Equine Vet. J.** London, v.24, p.144-146, 1992.

MCKINNON, A.O. AND VOSS, J.L. The estrous cycles. In: Mckinnon, **Equine Reproduction.**, Malvern: Lea & Febizer, 1993. p. 114 – 189.

MCKINNON, A.O. AND CARNEVALE, E.M. Ultrasonography. In: McKinnon, A.O. **Equine Reproduction.** Malvern: Lea & Febiger, 1993, p. 211-220.

MCNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; SMITH, P. Control of early ovarian follicular development. **J. Reprod. Fertil.** London, v. 54, p. 3 – 16, 1999.

MEIRA, C.; HENRY, M. Evolution of two non-surgical equine embryo transfer methods. **J. Reprod. Fertil.** Colchester, supl. 44, p. 712 – 713, 1991.

MEIRA, C.; AND BURATINI, JR. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.26, n.1, p.125-140, 1998.

MILLER, K.F.; BERG, S.L.; SHARP, D.C. Concentrations of circulating gonadotrophins during various reproductive states in mare. **Biol. Reprod.**, Madison, v.22, p.744-750, 1980.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial.** 5 ed. Porto Alegre: Sulina v.1, , 1982.

MONNIAUX, D.; MARIANA, J.C.; COGMIÉ, Y.; RABAHI, F.; MONGET, P.; MERMILLOD, P.; BARIL, G.; TOMANEK, M.; PISSELET, C.; CHUPIN, D.; POULIN, N.; BREBION, P.; BOSC, M.; NICOLE, A.; FONTAINE, J.; DURAND, P. Controle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammifères domestiques. **Contracept. Fertil. Sex.**, Paris, v. 21, p.403 – 407, 1993.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.19, p.55-81, 1983.

MOOR, R.M.; KRUIP, TH.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. **Theriogenology**. Los Altos, v.21, p.103-116, 1984.

MOOR, R.M.; OSBORN, J.C.; CROSBY, I.M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **J. Reprod. Fertil.** London, v.74, p.167-172, 1985.

MOURA, J. C. A.; MERKT, H. **A ultra-sonografia na reprodução equina**. 2 ed., Salvador: Universitária America, 1996, p.162.

MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W.D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, Los Alto, v.21, p.117-125, 1984.

MURRAY, A.W. The cell cycle as a cdc2 cycle. **Nature**, London, v. 342, p. 14 – 15, 1989.

NEELY D.P.; KIU, I.K.M.; HILLMAN R.B. Endocrinologia Reproductiva y Fertilidad en La Yegua. **Reproduccion equina**, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 1989, p. 1 – 25.

NIEMANN, H. Better results the superovulation of donor cows. **Tierzuchter**, v.43, p.34-35, 1991.

NOGUEIRA M.F.G. **Superovulação associada à inseminação artificial com tempo pré determinado em vacas da raça Nelore**. 2001, p.67. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

NUTTINCK, F.; COLLETE, L.; MASSIP, A.; DESSY, F. Histologic and autoradiographic study of in vitro effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicle: preliminary investigation. **Theriogenology**, Los Altos, v.45, p.1235 – 1245, 1996.

OHNO, S. The Y-linked testis determining gene and HY plasma membrane antigen gene: are they one and the same? **Endocrine Reviews**, Colchester, v. 6, p. 421 – 431, 1985.

OIKAWA, T.; NUMABE, T.; KIKUCHI, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Repeated induction program of superovulation in cattle throughout one-year using a progesterone device and porcine (p) FSH. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, p. 382, 1998.

OKTAY,K.; BRIGGS,D.; GOSDEN, R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** Bethesda, v. 82, p. 3748 – 3751, 1997.

OGURI, N. , TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and na attempt at nonsurgical egg transfer in horse. **J Reprod. Fertil.** London, v. 31, p. 187, 1972.

OGURI, N. , TSUTSUMI, Y. Nonsurgical egg transfer in mares. **J. Reprod. Fertil.** London, v.41, p. 313, 1974

ONUMA, H.; OHNAMI, Y. Retention of tubal eggs in mares. **J. Reprod. Fertil.** Colchester, suppl, 23, p. 507-511, 1975.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic ecography in equine gynecology, **Theriogenology**., Los Altos, v. 21, p. 471 – 483, 1980.

PALMER, E.; HAJMELI, G.; DUCHAMPS, G. Gonadotrophin treatment increase ovulation rate but not embryo production from mares. **Equine Vet. J.** suppl. London, v. 15, p. 99-102, 1993.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Revista Hippius**, São Paulo, v. 62, p. 62-64, 1984.

PARR, E.L. Rupture of ovarian follicles at ovulation. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 22, p. 1 – 22, 1975.

PASCOE, R. R.; PASCOE, D.R.; WILSON, M.C. Influence of follicular status on twinning rate in mares. **J. Reprod. Fertil.** Suppl. Colchester, v. 35, p. 183 - 189, 1987.

PASTORELLO, M.; MEIRA, C.; FLEURY, J.J.; DUARTE, M.C.G. Transferência não cirúrgica de embriões em éguas de hipismo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. Porto Alegre, v. 24, p. 212, 1996.

PÉREZ, F.P. Avances en trasplantes de embriones y su repercusion en la produccion de alimentos para el hombre. **Anales de La Academia Nacional de Medicina de Madri**. v.113, p. 115 – 149, 1996.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.** Jouy - en - Josas, v. 16, p. 271 – 278, 1976.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**. Los Altos, v. 55, p. 193 – 210, 2001.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycles of the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, London, v. 14, p. 219 – 231, 1987.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular response of mares to na equine pituitary extract after suppression of follicular development. **Anim. Reprod. Sci.**, London, v.22, p.131-144, 1990.

PIMENTEL, C.A.; TAROUCO, A. K. J.; HAMMES, A. M. Ovulações múltiplas em éguas abatidas em Pelotas. **A.R.S. Veterinária**, Jaboticabal, v.10, p. 253, 1994.

PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: McDonald, L.E. & Pineda, M.H. (ed), **Veterinary endocrinology and reproduction**. Raven Press, Philadelphia, London, 1989, p.303-354.

PINHEIRO-ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; VISINTIN, J.A.; SOARES, A.T. Resposta superovulatória em caprinos após repetidos tratamentos com gonadotrofina hipofisária suína. **A.R.S. Veterinária**, Jaboticabal, v.11, p.116, 1995.

PRICE, A.C AND SMITH, L. Maturação oocitária, ovulação. **Tópicos Avançados em Reprodução, FMRP-USP**, p.64-121, 1997.

RONDELL, P. Follicular pressure and distensibility. **Amer J. Physiol**, Baltimore, v.207, p.590-594, 1964.

ROSAS, C.A.; ALBERIO, R.H.; BARANÃO, J.L.; AGUERO, A.; CHAVES, M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, p. 1257-1264, 1998.

ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fert. Steril**. Birmingham v. 59, p. 783 – 790, 1993.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.**, v. 24, p. 77 – 92, 1983.

SANTOS FILHO, A.S.; OLIVEIRA, M.A.L. Superovulation of 5/8 girolando cows with different doses of FSHp, **Arq. Fac. Vet UFRGS**, Porto Alegre, v.26, p.365, 1998.

SAUMANDE, J. Ovogenese et folliculogenese. **Rec. Med. Vet.**, Maisons, v.157, p. 29 – 38, 1981

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod Fertil**, London, v.83, p.663 – 671, 1988.

SCHELLANDER, K.; BRACKETT, B.G.; HISHINUMA, M.; ABASMAZNI, O, MORI, Y.; KANAGAWA, H. Preliminar study of buffalo sperm penetration into zona-free hamster egg after treatment with calcium ionophore A23187. **Japan J. Vet. Res.**, Sapporo, v.37, p.181 – 186, 1989.

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

SETICH, P.L. Transcervical embryo transfer in performance mares. **Journal of the American Association.**, v. 195, p. 940 – 944, 1989, n.7.

SCHAMS, D.; MENZER, CH.; SCHAL LENBERGER, E.; HOFFMAN, J.; HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: Sreenan J.M. (ed), **Control of Reproduction in the Cow**. Hagre: Martinus Nijhoff, The Hague, 1978, p.122-142.

SIROIS, J.; BALL, B.A.; FORTUNE J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycles and after hemiovariectomy in mares. **Equine Vet. J.**, suppl. New market suffolk, v. 8, p. 43 – 48, 1989.

SIROIS J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 37, p. 300, 1992.

SPICER, L.J.; GEISERT, R.D. Concentrations of insulin-like growth factor-1, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.37, p.749-760, 1992.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL JR, G.E, Superovulation in collection and transfer of equine embryos. **Anim, Reprod. Biotechnol. Lab. Bull.** n.8, p.32-8, 1995.

SQUIRES, E.L; GARCIA, M.G; GINTHER, O.J; VOSS, J.L; SEIDEL, G.E.JR. Comparasion of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.26, p.661-670, 1986.

SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O, CARNEVALE, E.M.; MORRIS, R.P.; NETT, T.M. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. Cochester, v. 35, p. 399 – 403, 1987a.

SQUIRES, E.L.; MCCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; MCKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, Los Altos, v. 28, p. 609 – 613, 1987b.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 91 – 104, 1999.

STABENFELDT, G.H.;HUGHES J.P.; EVANS J.W. Ovarian activity during the estrous cycles of the mare. **Endocrinology**., Baltimore, v. 90, p. 1379 – 1383, 1972.

SMITH, P.W.S.; BRAW-TAL, R.; CORRIGAN, K.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carriers or non-carriers of the Fec^B gene. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 98, p. 41 – 54, 1994.

SMITH, L.D. AND ECKER, R.E. The interation of steroids with Rana pipiens oocytes in the induction of maturation. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 25, p. 232 – 247, 1971.

TISDALL, D.J.; WATANABE, K.; HUDSON, N.L.; SMITH, P.; MCNATTY, K.P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. **J. Mol. Endocrinol.** Bristol, v. 15, p. 273 – 281, 1995.

TOTEY, S.M.; GURPREET, S.; TALWAR, G.P. Superovulatory response in lactating Bos Indicus X Bos Taurus cows primed with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. **Theriogenology**, Los Altos, v.31, p.268, 1989.

TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M; ARRUDA,R.P.; COSTA NETO,J.B.F. Spontaneous multiple ovulations end pregnancies after embryo transfer in a mare Brasileiro de Hipismo Breed (Equestrian Sports Horse). **Arq. Fac. Vet. UFRGS, Supl.**, Porto Alegre, v.25, n.1, p.315, 1997.

TRUELSON, S.L.; GRAHAM, J.K.; MORTIMER, R.G.; FIELD, T.G. In vitro penetration into bovine oocytes and zona-free hamster oocyte by bull spermatozoa treated with liposomes. **J. Dairy. Sci.**, Champaing, v. 79, p. 991 – 999, 1996.

VANDERWALL, D.K.; Ealy embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.** Philadelphia, v. 12, n.1, p. 61 – 83, 1996.

VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterisation of bovine follicles and their environment in vivo. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 55, p. 1003 – 1011, 1996.

WARSAWSKY, L.F.; PARKER, W.G.; FIRST, N.L.; GINTHER, O.J. Gross changes of internal genitalia during the estrous cycle in the mare. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 33, p. 19 – 26, 1972.

WATSON, E.D.; HINRICHS, K. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mares after administration of hCG. **J. Reprod. Fertil.** London, v. 84; p. 557-561, 1988.

WEBB,R.; CAMPBELL, B.K.; GRVERICK.; H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **J. Reprod Fertil Suppl.** Colchester, v.54, 33-48, 1999.

WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 21, p. 461-469, 1984.

WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Recent studies relating to the collection of multiple embryos in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.19, p.101-108, 1983.

WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Ovarian response, pregnancy rate, and incidence of multiple fetuses in mares treated with na equine pituitary extract. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 32, p.167-172, 1982.

WOODS, G.L.; SCRABA, S.T. AND GINTHER, O.J. Prospects for induction of multiple ovulation and collection of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, Los Altos, v.17, p.61-72, 1982.

WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacologic manipulation of fertility, **Vet. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.8, n.1, p.57 – 89, 1992.

URWIN, V.E.; ALLEN, W.R. Follicle stimulating hormone, luteinising hormone and progesterone concentrations in the blood of Thoroughbred mares exhibiting singles and twin ovulations. **Equine Vet. J.** London, v. 15, p. 325 – 329, 1983.

XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 53, p. 951 – 957, 1995.

YUAN, W.; LUCY, M.C.; SMITH, M.F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 5, p. 1045 – 1054, 1996.

CARMO, M.T. Comparison between constant and decreasing doses of equine pituitary extract for the induction of superovulation in mares. Botucatu, 2003. 152p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu - SP. 2003. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

ABSTRACT

Several studies have reported the is unresponsive to all the routinely used drugs aiming the superovulation in other species, such as the FSH and the eCG. The equine pituitary extract (EPE) is a partial equine gonadotropin preparation, and the only compound which consintently induces multiple ovulation in mares; however, the superovulatory response has been low (1-3 ovulations/mare). More recent studies demonstrate some improvement in the percentage of multiple ovulation in superovulated mares with the EPE administration twice a day (4-7 ovulations/mare), nevertheless with a low rate of embryo recovery. This fact can be related to the low quality oocyte production (abnormality in the follicular and oocytyary maturation), the follicular failure in releasing the oocyte and its collection towards the inner part of the oviduct, as its or the embryo traffic through the oviduct. The improvement on embryo recovery rate has been shownin cows with the utilization of decreasing doses of FSH. The present experiment aimmed to compare the ovulatory answer and embryo production of mares treated twice daily with constant and decreasing doses of EPE. Six mares in good nutrition status, with ages ranging from four and 15 years old and weighing from 400 to 500 Kg, together with a good reproductive history, were monitored daily through the preiods between the months of november/2001 to march/2002. Two estrous cytrous cycles were used from each mare and subdivided into two groups: constant doses and decresing doses;however between the treatments na interval of two estrous cycles was given. The experiment was carried out in the riding station (UNESP), placed in Lageado, a farm in the city of Botucatu – SP. For both groups, the treatment was started in the seventh

post-ovulatory day, presenting a very evident corpora lutea and follicles equal or under 25 mm of diameter in the ultra-sound evaluation. In group 1 (constant doses) 25 mg of EPE were administered every 12 h until the moment when most follicles reached the size of 35 mm of diameter. In group 2 (decreasing doses) 40 mg of EPE were administered every 12 h; 35 mg every 12 h; 30 mg every 12 h; 25 mg every 12 h; 15 mg every 12 h; 10 mg every 12 h; mentioning the fact that the treatment was interrupted when most follicles reached the diameter of 35 mm. In both groups, the hCG administered on the 3,000 UI dosage in end of the treatment. The embryo flushes were carried out at the eighth day after the first detected ovulation, aiming the recovery of embryos in the development stage from morula to expanded blastocyst. For the statistical analysis, the *t test of student* was used to evaluate the number of ovulations and recovered embryos per mare, and number of recovered embryos per ovulations. The *chi-square test* and the *Goodman test* were carried out in order to compare the ratio of mares with different number of ovulation between the treatments. For the study of correlation between the number of follicles and ovulations, the Pearson correlation coefficient was used. The results demonstrated that there was no statistical difference between the groups treated with constant doses and the ones treated with decreasing doses, when compared to the interval of days in the treatment (8,0 and 7,7 respectively), the interval in days from the beginning of the treatment to the first ovulation (9,8 and 9,8 respectively), the interval in days from the first to the last ovulation (34,9 and 33,4 respectively), the number of ovulations and recovered embryos (3,5 and 1,2; 5,0 and 1,8 respectively). We concluded that the use of decreasing doses of EPE provided a numerical improvement, though not mathematically significant in the ovarian superstimulation and in the embryo recovery rates. Nevertheless, it is necessary to have a higher number of studies aiming to clarify the reasons for the low rates for embryo recovery, as the superovulatory response rates were good and the number of recovered embryos per ovulation were unsatisfactory, by means of a deeper studies

of the mechanisms which involve the oocyte maturation in superovulated mares, and also the mechanisms of ovulation and oocyte collection to the infundibulus. Also, its transportation through the oviduct and the transportation of the embryo to the uterus.

Keywords: Superovulation, Multiple ovulation, Equine pituitary extract, Embryo transfer, Mares.

ANEXO. A - Resposta superovulatória em hamster utilizando diferentes protocolos

Variável	EPE (CONST)	EPE (DEC)	eCG	EPE (CONST) + hCG	EPE (DEC) + hCG	eCG+ hCG	Solução Fisiológica
Nº ANIMAIS	12	12	12	12	12	12	12
Nº OVÁRIOS	24	24	24	24	24	23	23
Nº FOLÍCULOS ($\geq 0,1$ mm)	223	267	117	102	110	66	25
Nº CORPO LÚTEO	149	88	436	316	262	498	72
Nº ESTRUTURAS OVARIANA	372	355	553	418	372	564	97
Nº OÓCITOS	26	43	90	56	163	170	20
PESO OVARIANO (g)	0,424	0,387	0,619	0,535	0,469	0,753	0,278

* EPE – Extrato de pituitária eqüina

* Const. – Constante

* Dec. – Decrescente

* hCG – Gonadotrofina coriônica humana

* eCG – Gonadotrofina coriônica eqüina

Anexo. B – Resposta superovulatória em éguas tratadas com o Extrato de Pituitária Eqüina em dose constante e dose decrescente

ÉGUAS	GRUPOS	DIAS DE TRAT.	INTERVALO EM DIAS DO INICIO DO TRAT. Á 1º OV.	INTERVALO EM DIAS DA 1º OV Á ULTIMA OV.	DIAMETRO MÉDIO DO FOLÍCULO PRÉ-OV. (Mm.)	Nº OV. PÓS I.A.	Nº EMBRIÕES	PERCENTUAL RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA
1	CONST DEC.	12,0	14,0	<u>apenas uma ov.</u>	40,0	1,0	0,0	0%
1		8,0	11,0	1,0	30,4	4,0	2,0	50%
2	CONST DEC.	5,0	6,0	2,0	33,5	5,0	2,0	40%
2		9,5	12,0	3,0	34,5	4,0	2,0	50%
3	CONST DEC.	8,0	10,0	1,0	34,0	4,0	3,0	75%
3		6,5	9,0	0,0	35,5	9,0	4,0	44%
4	CONST DEC.	7,0	8,0	5,0	34,75	6,0	0,0	0%
4		6,0	8,0	0,0	30,0	4,0	2,0	50%
5	CONST DEC.	7,5	9,0	1,0	27,5	3,0	2,0	66%
5		7,0	9,0	2,0	39,8	3,0	1,0	33%
6	CONST DEC.	8,5	12,0	0,0	39,5	2,0	0,0	0%
6		9,0	10,0	1,0	30,0	6,0	0,0	0%
MÉDIA ± DP	CONST	8,0 ± 2,30	9,85 ± 2,86	1,50 ± 1,87	34,89 ± 4,58	3,50 ± 1,87	1,17 ± 1,33	30,17 ± 34,99
MÉDIA ± DP	DEC.	7,67 ± 1,40	9,83 ± 1,47	1,17 ± 1,17	33,28 ± 3,97	5,00 ± 2,19	1,83 ± 1,33	38,83 ± 19,68
MÉDIA ± DP	CONST+DEC	7,83 ± 1,83	9,84 ± 2,17	1,33 ± 1,50	34,08 ± 4,16	4,25 ± 2,10	1,50 ± 1,31	34,00 ± 27,36

* DP. – Desvio Padrão

* CONST. – Tratamento em doses constantes

* DEC. – Tratamento em doses decrescentes

* OV. - Ovulação

* **apenas uma ov.** – A égua 1 (um) não respondeu ao segundo tratamento superovulatório, apresentando apenas um folículo pré – ovulatório.

Anexo. C – Resposta superovulatória em éguas tratadas com o extrato de pituitária equina segundo os períodos de tratamento (1^o e 2^o períodos)

ÉGUAS	TRATAMENTO	DIAS DE TRAT	INTERVALO EM DIAS DO INÍCIO DO TRAT. Á 1 ^o OV.	INTERVALO EM DIAS DA 1 ^o OV Á ÚLTIMA OV.	DIAMETRO MÉDIO DO FOLÍCULO PRÉ-OV. (mm.)	N ^o OV. PÓS I.A.	N ^o EMBRIÕES	PERCENTUAL RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA
1	1 ^o Trat.	8,0	11,0	1,0	30,4	4,0	2,0	50%
1	2 ^o Trat.	12,0	14,0	<u>apenas uma ov.</u>	40,0	1,0	0,0	0%
2	1 ^o Trat.	5,0	6,0	2,0	33,6	5,0	2,0	75%
2	2 ^o Trat.	9,5	12,0	3,0	34,5	4,0	2,0	50%
3	1 ^o Trat.	8,0	10,0	1,0	34,0	4,0	3,0	75%
3	2 ^o Trat.	6,5	9,0	0,0	35,0	9,0	4,0	44%
4	1 ^o Trat.	6,0	8,0	0,0	30,0	4,0	2,0	50%
4	2 ^o Trat.	7,0	8,0	5,0	34,8	6,0	0,0	0%
5	1 ^o Trat.	7,5	7,5	1,0	27,5	3,0	2,0	66%
5	2 ^o Trat.	7,0	7,0	2,0	39,8	3,0	1,0	33%
6	1 ^o Trat.	9,0	10,0	1,0	30,0	6,0	0,0	0%
6	2 ^o Trat.	8,5	12,0	0,0	39,5	2,0	0,0	0%
MÉDIA ± DP	1 ^o Trat.	7,25 ± 1,47	8,75 ± 1,89	1,00 ± 0,63	30,92 ± 2,46	4,33 ± 1,03	1,83 ± 0,98	52,67 ± 28,15
MÉDIA ± DP	2 ^o Trat.	8,42 ± 2,08	10,33 ± 2,73	1,67 ± 2,07	37,27 ± 2,75	4,17 ± 2,93	1,17 ± 1,60	21,17 ± 23,82
MÉDIA ± DP	TOTAL	7,83 ± 1,83	9,54 ± 2,39	1,33 ± 1,50	34,09 ± 4,15	4,25 ± 2,09	1,50 ± 1,31	36,92 ± 29,81

* DP. – Desvio Padrão

* Trat. – Tratamento

* OV. - Ovulação

* **apenas uma ov.** – A égua 1 (um) não respondeu ao segundo tratamento superovulatório, apresentando apenas um folículo pré-ovulatório.

Anexo. D – Diâmetro médio dos folículos no início do tratamento superovulatório com o EPE em doses constantes em relação ao numero de ovulações pós-Inseminação Artificial por égua

ÉGUA	N° fol. 10-15 mm no início trat. (N° ov.)	N° fol. 16-20 mm no início trat. (N° ov.)	N° fol. 21-25 mm no início trat. (N° ov.)	N° fol. >25 mm no início trat. (N° ov.)
1	2 (1)	5 (0)	3/0	-
2	2 (1)	3 (3)	1 (1)	1 (1)
3	4 (2)	3 (2)	-	-
4	3 (3)	7 (3)	-	-
5	6 (1)	3 (2)	-	-
6	7 (2)	0	-	-
TOTAL	24 (10)	21 (10)	4 (1)	1 (1)

Anexo. E – Diâmetro médio dos folículos no início do tratamento superovulatório com o EPE em doses constantes em relação ao numero de ovulações pós-Inseminação Artificial por égua

ÉGUA	N° fol. 10-15 mm no início trat. (N° Ov.)	N° fol. 16-20 mm no início trat. (N° ov.)	N° fol. 21-25 mm no início trat. (N° ov.)	N° fol. >25mm no início trat. (N° ov.)
1	8 (2)	4 (2)	-	-
2	2 (0)	5 (4)	-	-
3	4 (3)	5 (5)	-	-
4	4 (3)	3 (1)	-	1/1
5	5 (2)	2 (1)	-	-
6	7 (6)	0	-	-
TOTAL	30 (16)	19 (13)	-	1/1

ANEXO E: Preparação do extrato de pituitária eqüina

- 1) **Primeiro dia:** Colocar as pituitárias em uma solução contendo água deionizada e bidestilada + álcool etílico + 6% amonia. Deixar refrigerado (5°C por 24h).
- 2) **Segundo dia:** Centrifugar o preparado em uma centrífuga refrigerada (5°C). Separar o sobrenadante do precipitado, sendo este eliminado e o sobrenadante diluído em álcool etílico. Deixar refrigerado (5°C) por 24h.
- 3) **Terceiro dia:** Aspirar o sobrenadante deixando apenas o precipitado, que vai ser centrifugado em uma centrífuga refrigerada (5°C). Eliminar o sobrenadante e resuspender o precipitado em água bidestilada. Colocar esta solução em membrana de diálise, e em seguida armazená-la em água bidestilada.
- 4) **Quarto dia:** Trocar a água bidestilada onde está presente a membrana de diálise.
- 5) **Quinto dia:** Centrifugar todo o conteúdo presente na membrana de diálise em uma centrífuga refrigerada (5°C). Separar o sobrenadante do precipitado. Elimina-se o precipitado, ficando apenas o sobrenadante, o qual é o extrato de pituitária.
- 6) **Sexto dia:** Liofilizar o extrato.