

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA SULPIRIDA NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM ÉGUAS**

FERNANDO DAL SASSO MENDONÇA CRUZ

BOTUCATU-SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA SULPIRIDA NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM ÉGUAS**

FERNANDO DAL SASSO MENDONÇA CRUZ

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal (Área de concentração: Reprodução Animal) para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Dell`Aqua Junior

BOTUCATU-SP

2014

NOME DO AUTOR: Fernando Dal Sasso Mendonça Cruz

TÍTULO: Efeito da administração da sulpirida no desenvolvimento folicular em éguas.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Antônio Dell`Aqua Junior (Presidente e Orientador)

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dra. Silvia Ferrari

Departamento de Reprodução Animal
Universidade Anhembi Morumbi

DATA DA DEFESA: 26 de junho de 2014

Dedico este trabalho à família e aos amigos, os quais me apoiaram incondicionalmente em todos os momentos de minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. José Dell'Aqua, que aceitou iniciar esse projeto comigo me ajudando e orientando para poder conquistar essa etapa.

Aos meus pais e irmão, pela dedicação, confiança e amor em todas as etapas da minha vida, sempre me apoiando e fazendo o impossível para que eu pudesse sempre seguir crescendo.

À minha esposa, Nathalia, que sempre ao meu lado me apoiou com muito amor e dedicação, sempre presente nas horas difíceis para que eu pudesse superar e seguir em frente.

A Guta e todos seus colaboradores que sempre me ajudaram fazendo com que eu crescesse profissionalmente e aprendesse muito.

À Fernanda e Luiz Fernando, por sempre estarem me ajudando para que eu pudesse concluir esse projeto, além da ajuda profissional agradeço por serem amigos presentes e companheiros.

A Fernanda Jordão, que sempre foi companheira e amiga me ajudando quando preciso.

Aos meus colegas de pós graduação que sempre foram solícitos e amigos e contribuíram para o meu aprendizado e projeto.

Aos professores da UNESP que ministraram as disciplinas que participei e foram de enorme importância para o meu conhecimento.

A equipe do departamento de pós graduação que sempre me ajudou quando preciso.

Aos estagiários, funcionários, e animais que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto.

Aos professores Marco Alvarenga e Silvia Ferrari que aceitaram fazer parte desta banca e sempre trouxeram críticas construtivas.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

FSH - Hormônio folículo estimulante

FSH-s - FSH suíno

FSH-e - FSH equino purificado

EPE - Extrato de pituitária equina

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

LH - Hormônio luteinizante

P4 - Progesterona

PGF2 α - Prostaglandina F2 α

FSH-rh - FSH humano recombinante

FSH-re - FSH recombinante equino

mm - Milímetros

mg – Miligramas

μ g - Microgramas

SID – Uma vez ao dia

BID – Duas vezes ao dia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados absolutos ou médios e desvios padrão para as variáveis entre o grupo controle e o grupo tratado para obtenção de múltiplas ovulações em éguas.....18

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Introdução -----	1
Hipótese -----	2
Objetivos -----	2

CAPÍTULO 2

Revisão de literatura -----	4
1. Fisiologia do ciclo estral das éguas-----	4
2. Agentes estimulantes da atividade ovariana -----	5
2.1 Extrato de Pituitária Equina (EPE)-----	6
2.2. FSH equino (FSH-e)-----	7
2.3. FSH suíno (FSH-s)-----	8
2.4. FSH equino recombinante (FSH-re)-----	9
2.5. GnRH-----	10
2.6. Sulpirida-----	11

CAPÍTULO 3

Efeito da administração da sulpirida no desenvolvimento folicular em éguas-----	21
---	----

CAPÍTULO 4

Conclusões Gerais-----	33
------------------------	----

ANEXOS

RESUMO

CRUZ, F.D.S.M. **Efeito da administração da sulpirida no desenvolvimento folicular em éguas.** Botucatu. 2014 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A indução de múltiplas ovulações nas espécies domésticas é de extrema importância para a melhoria dos resultados e custos de biotécnicas como a transferência de embriões, inseminação com sêmen de baixa fertilidade, transferência de oócitos, entre outras. Este estudo teve como objetivo determinar se a sulpirida poderia induzir multiplas ovulações em éguas. Dezesete éguas foram aleatoriamente utilizadas nos dois grupos experimentais. No grupo de éguas tratadas com sulpirida 1mg/kg (IM) a cada 12 horas, o protocolo foi iniciado apenas em éguas que alcançaram um folículo de 24 mm $\pm$ 2mm de diâmetro e um segundo folículo $\geq 20 \pm 2$ mm de diâmetro. No grupo controle, utilizou-se o mesmo protocolo de início do tratamento porém as éguas foram tratadas com solução salina 0,9% (IM) a cada 12 horas. Em ambos os grupos, se durante as avaliações ultrassonográficas era verificado crescimento folicular concomitante de dois ou mais folículos, o tratamento perdurava até quando o menor folículo atingisse no mínimo 33 mm de diâmetro. Neste momento a ovulação foi induzida com 1500 UI de hCG. A inseminação artificial foi realizada 24 horas após a indução, e os embriões foram coletados no oitavo dia após a primeira ovulação. As variáveis estudadas foram analisadas utilizando o teste t de Student e teste exacto de Fisher. No grupo tratado, 35% das éguas tiveram mais que uma ovulação e uma média de 1,4 ovulações por ciclo enquanto que no grupo controle apenas 11% das éguas tiveram mais que uma ovulação e uma média de 1,1 ovulações por ciclo. No grupo tratado com sulpirida o tempo de início do tratamento até a primeira ovulação foi de $3,9 \pm 0,9$ dias enquanto que no grupo controle foi de $4,9 \pm 1,0$ ($P < 0,001$). A administração da Sulpirida durante o desenvolvimento folicular, estimulou a atividade ovariana e não contribuiu para um aumento significativo nas taxas de duplas ou triplas ovulações, entretanto algumas éguas apresentaram uma maior incidência de múltiplas ovulações quando submetidas ao protocolo proposto, sugerindo que novos estudos devem ser conduzidos para esclarecimentos desses resultados.

Palavras chave: dupla ovulação, égua, transferência de embrião.

ABSTRACT

CRUZ, F.D.S.M. Effect of administration of sulpiride in the follicular development in mares. Botucatu. 2013 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The induction of multiple ovulations in domestic species is of extreme importance to provide improvements of results and costs of biotechnologies such as embryo transfer, artificial insemination with poor quality semen, oocyte transfer among others. This study aimed to determine if sulpiride could induce multiple ovulations in mares. Seventeen mares randomly passed the two experimental groups. In the group of mares treated with sulpiride 1mg/kg (IM) every 12 hours, the protocol was initiated only in mares that have achieved a follicle of $24 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$ in diameter and a second follicle $\geq 20 \pm 2 \text{ mm}$ in diameter. In the control group, were used the same protocol, but the mares were treated with 0.9% saline solution (IM) every 12 hours. During the ultrasound evaluation if was observed the follicular growth the treatment even when the lower follicle reached at least 33 mm in diameter. At this time the ovulation was induced with 1500 IU of hCG. Artificial insemination was performed 24 hours after ovulation induction, and the embryos were collected on the eighth day after the first ovulation. The variables were analyzed using Student's t Fisher's exact test and test. In group treated, 35% of the mares had more than one ovulation and ovulation an average of 1.4 per cycle while in control group only 11% of the mares had more than one ovulation and ovulation an average of 1.1 per cycle. In the group treated with sulpiride the time of the treatment beginning to the first ovulation was $3,9 \pm 0,9$ days whereas the control group was $4,9 \pm 1,0$ ($P < 0,001$). Administration of Sulpiride during follicular development stimulated ovarian activity but did not contribute to a significant increase in the rates of double or triple ovulations, however some mares had a higher incidence of multiple ovulations when subjected to the proposed protocol, suggesting that further studies should be conducted for clarification of these results.

Keywords: double ovulation, mare, embryo transfer.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O mercado agropecuário é responsável por uma fatia importante da economia brasileira. O setor da equinocultura possui um giro de capital de mais de 7,8 bilhões de reais anuais sendo de extrema importância o crescimento e aprimoramento do mesmo. Por isso, pesquisas direcionadas às biotécnicas da reprodução estão em constante estudo como a transferência de embriões, técnica já aceita e amplamente utilizada pela maioria das associações de criadores de cavalos. Sendo o Brasil responsável por 43% dos embriões produzidos pelo mundo, ocupando o primeiro lugar em número de embriões transferidos (STROUD; CALLESEN, 2012)

A superovulação vem sendo estudada por décadas, com a finalidade de aumentar o número de ovulações por ciclo e conseqüentemente obter maior número de embriões por lavado uterino o que aumentaria a taxa de recuperação embrionária por ovulação para 100% visto que esta taxa gira em torno de 50%, com ovulações simples. (SQUIRES; MCCUE, 2011). Também para o congelamento de embriões a superovulação pode ser de grande interesse aumentando as taxas de recuperação embrionária no dia 6 ou 6,5 pós ovulação já que neste período existe um decréscimo de aproximadamente 10% desta taxa em comparação com os dias 7 e 8 (MCCUE, 2008).

Comparado às vacas, os protocolos e resultados da superovulação em éguas apresentam dificuldades, como a anatomia ovariana, a hipersensibilização da hipófise, a resposta individual e o período ideal para o início dos tratamentos além do alto valor e dificuldade na obtenção das drogas (ALVARENGA et al., 2008, CARMO et al., 2006, NAGAO et al., 2012).

Os protocolos de superovulação em éguas baseiam-se em manter níveis adequados do hormônio folículo estimulante (FSH) pela administração direta desta gonadotrofina ou pelo fornecimento de outra droga que estimule a secreção desta. Isso porque a grande dificuldade é manter o desenvolvimento de folículos que em um ciclo normal sofreriam atresia (PIERSON; GINTHER, 1990).

Os resultados ainda são inconstantes havendo uma grande variação individual na resposta superovulatória. As drogas mais estudadas são: O extrato de pituitária equina (EPE), o hormônio folículo estimulante equino purificado (FSH-e), o FSH recombinante humano (FSH-rh), o FSH recombinante equino (FSH-re) o FSH suíno (FSH-s) e o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), havendo a necessidade de novos estudos (SQUIRES; MCCUE, 2006; NAGAO et. al., 2012).

HIPÓTESE

A administração da Sulpirida em éguas cíclicas estimula a atividade ovariana, possibilitando a ocorrência de múltiplas ovulações.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta ovariana de éguas em estro tratadas com sulpirida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se administração da sulpirida interfere na dominância folicular e promove a estimulação de múltiplas ovulações em égua.

Capítulo 2

REVISÃO DE LITERATURA

1. FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL DAS ÉGUAS

O conhecimento da fisiologia da reprodução equina é fundamental para a elaboração de protocolos de superovulação.

As éguas são poliéstricas estacionais de dias longos, apresentando, portanto diversos ciclos na primavera e verão. Ou seja, a ciclicidade nesta espécie é regulada pela melatonina que estará diminuída no período fértil, este que se inicia com o aumento do tempo de exposição à luz. Durante este período, conhecido como estação de monta, as éguas apresentam ciclos de aproximadamente 21 dias sendo 5 – 7 dias de estro (fase estrogênica), caracterizado pelas altas concentrações de estrógeno e receptividade ao macho (sinais de cio) e 15 ± 4 dias de diestro (fase progestacional) caracterizada pela dominância de progesterona proveniente do corpo lúteo (CL) formado após a ovulação e final da fase anterior (HAFEZ; HAFEZ, 2004 e AURICH, 2011).

O ciclo estral é controlado pela interação entre a glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio (MCKINNON; VOSS, 1992). A retina dos olhos capta o aumento da luminosidade, este sinal neural é convertido em sinal hormonal diminuindo a secreção de melatonina e consequentemente aumentando a liberação de GnRH pelo hipotálamo (GINTHER, 1992). O GnRH age na hipófise anterior estimulando a produção e liberação das gonadotrofinas as quais atuam nas gônadas.

Nos ovários acontecem eventos dinâmicos e fenômenos cíclicos como emergência de ondas foliculares, crescimento folicular comum, divergência e dominância folicular além de ovulação, luteogênese e luteólise (SILVA, 2010). O hormônio folículo estimulante (FSH) é responsável pelo crescimento dos folículos e sua máxima concentração se inicia no período de emergência folicular atingindo seu pico com a presença de um ou mais folículos de aproximadamente 13 mm que produzem inibina levando a uma queda do FSH (GINTHER et al., 2003). O crescimento folicular ocorre em forma de ondas, as quais são definidas como vários folículos que emergem e iniciam o crescimento em sincronia, sob ação da liberação de FSH (GINTHER, 1992). Após a emergência de uma onda folicular inicia-se a fase de crescimento folicular comum, na qual todos os folículos apresentam taxa de crescimento semelhante, de

aproximadamente três milímetros por dia, sendo o FSH o principal hormônio responsável por esse crescimento. Esta fase termina após seis dias, em média, quando o maior folículo atinge cerca de 23 mm de diâmetro, e ocorre a divergência folicular, culminando com a determinação da dominância folicular (GINTHER et al., 2004). O folículo dominante é mais responsivo ao FSH e LH, possuindo maior quantidade de receptores para essas gonadotrofinas, com o seu crescimento ocorre um aumento de estradiol e inibina o que leva a uma atresia dos outros folículos, de menor tamanho e menor concentração de receptores (GINTHER, 1992).

Em um próximo estágio classificado como divergência folicular ocorre o desenvolvimento do futuro folículo dominante e atresia dos folículos subordinados (GINTHER et al., 2004). Nesta fase há uma maior ação do hormônio luteinizante (LH) que não está envolvido no início do processo de desvio folicular mas que é responsável pelo crescimento, maturação folicular e ovulação (GINTHER et al., 2001). Após a ovulação, a progesterona (P4) produzida pelo corpo lúteo (CL) inibe a liberação de LH cíclico, entretanto permanece o LH tônico (basal) estimulando o CL a secretar P4 (SQUIRES et al., 2003; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Não havendo o estabelecimento da gestação o endométrio é responsável pela secreção de prostaglandina $\text{PGF2}\alpha$ fazendo com que ocorra a lise do CL e retorno ao estro (AURICH, 2011).

2. AGENTES ESTIMULANTES DA ATIVIDADE OVARIANA

Os resultados dos tratamentos que visam induzir múltiplas ovulações nas éguas ainda são inconstantes existindo várias preparações diferentes (SQUIRES; MCCUE, 2006). Todas baseiam-se em manter elevados os níveis séricos de FSH para que não haja uma atresia dos folículos que se tornariam subordinados, resultando em um maior número de folículos em crescimento (GINTHER, et al. 2001). Nas pesquisas iniciais acreditava-se que uma maior estimulação da atividade ovariana, para obter um número elevado de ovulações acarretaria em maior número de embriões recuperados. Posteriormente comprovou-se que os protocolos com apenas duplas ovulações são mais eficientes, ou seja, acarretam em maiores taxas de recuperação embrionária por ovulação (CARMO et al., 2006; NAGAO et al., 2012).

A utilização de FSH suíno tem baixa resposta superovulatória em comparação ao EPE. Resultados similares foram encontrados nas taxas de ovulações e recuperações embrionárias de éguas tratadas com FSH-e (SQUIRES; MCCUE, 2006). O FSH-rh também foi estudado mostrando falhas nos protocolos e resultados insatisfatórios (THARASANIT et al., 2006). Em contrapartida o FSH-re demonstra resultados semelhantes ao EPE resultando em múltiplas ovulações em éguas ciclantes utilizado em diferentes doses (DELUCA et al., 2008). Protocolos de superovulação em mulheres geralmente envolvem o uso de agonistas do GnRH para ajudar a secreção de LH endógeno (SQUIRES; MCCUE, 2006). Resultado satisfatório na resposta superovulatória em éguas foi encontrado com a utilização de acetato de deslorelina, um agonista do GnRH (NAGAO et al., 2012). A sulpirida ainda não foi estudada quanto ao seu efeito em auxiliar nas taxas de duplas ou mais ovulações em éguas, porém acredita-se que ela pode estar ligada a produção de prolactina que age diretamente na população de receptores de FSH nos folículos podendo assim ajudar na indução de múltiplas ovulações desta espécie (TIBARY, 2011).

2.1. EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE)

O EPE pode ter concentrações distintas de gonadotrofinas variando conforme a época do ano e estágio fisiológico dos animais (SQUIRES; MCCUE, 2006). Este preparado vem sendo utilizado à muitos anos na superovulação das éguas com resultados satisfatórios na indução de múltiplas ovulações porém, mostrou uma variedade significativa em relação à sua preparação e protocolos de utilização (ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002; SQUIRES et al., 2003; MACHADO et al., 2003; CARMO, 2003). A administração duas vezes ao dia de altas doses de EPE resultaram em múltiplas ovulações (ALVARENGA et al., 2001).

A resposta da atividade ovariana é dependente do momento de início do tratamento, não podendo haver a dominância de um folículo antes do início do protocolo o que levaria a uma atresia dos folículos subordinados (SQUIRES et al., 2003). Autores complementam citando que a dose utilizada também é um fator importante para uma boa resposta (ALVARENGA et al., 2001; FARINASSO et al., 2005; ALONSO et al., 2006).

Douglas et al. (1974) foram os primeiros a relatar o uso do EPE em éguas em anestro obtendo 58% de duplas ovulações. Taxa de 100% de múltiplas ovulações foi observada com aplicações de extrato de pituitária na concentração de 25 mg duas vezes ao dia (BID) obtendo-se um aumento significativo na produção de embriões por égua ($3,5 \pm 1,8$), sendo que destes animais 75% apresentaram mais de quatro ovulações. Em contrapartida os animais tratados com 25 mg do mesmo preparado, no entanto uma vez ao dia (SID) obtiveram $1,6 \pm 1,0$ embriões por égua, 62,5% de múltiplas ovulações e apenas 12,5% tiveram mais de quatro ovulações (ALVARENGA et al. 2001).

Concordando com os dados supracitados, Scoggin et al. (2002), relataram que a administração de 12,5 mg (BID) apresentou maior recuperação embrionária (2,6) em comparação a 25 mg (SID) e tendeu a ser maior que o grupo tratado com 50 mg (SID). A administração de 12,5 mg (BID) também obteve maior recuperação embrionária por ovulação que os outros grupos com aplicações BID e SID.

2.2. FSH EQUINO (FSH-E)

O FSH-e é um FSH parcialmente purificado de hipófise equina que apresenta uma taxa de FSH:LH de 10:1 e pode ser utilizado com as mesmas finalidades que o extrato de pituitária equina, apresentando vantagens como o aumento do número de embriões recuperados por lavado e uma proporção de gonadotrofinas menos variável (FARIA; GRADELA, 2010).

A utilização do FSH-e mostrou bons resultados na indução de múltiplas ovulações em éguas. Aplicações de 12,5 mg de FSH-e (BID) com início um dia após a administração de PGF2 α feita pós transferência de embrião resultou em 3,9 ovulações e 1,9 embriões recuperados por ciclo (NISWENDER, et al., 2003).

Um dos problemas do uso do FSH-e é a possibilidade de uma super estimulação (>4 ovulações), que geralmente leva a uma queda ou ausência de embriões recuperados e também a um aumento de folículos anovulatórios (PERES et al., 2007). Com o propósito de minimizar este problema o uso de baixas doses foi testado. Administrando-se 5 mg de FSH-e (SID), a partir do 8º dia pós ovulação, até o momento em que, pelo menos, um folículo atingisse diâmetro ≥ 35 mm, foi observada uma taxa de 1,6 ovulações para o grupo tratado e 1,0 para o grupo controle, no entanto as taxas de

recuperação embrionária não apresentaram diferença estatística sendo de 0,8 e 1,0 embriões por ciclo respectivamente (ARAÚJO et al., 2008).

McCue e colaboradores em 2008, dividiram aleatoriamente 20 éguas em quatro grupos distintos, sendo eles o grupo controle (grupo 1), grupo recebendo aplicações de 12,5 mg de FSH-e (BID) até um folículo atingir tamanho ≥ 35 mm (grupo 2), grupo recebendo tratamento semelhante ao grupo 2, porém com interrupção no 3º dia após o início (grupo 3) e o grupo 4, recebendo doses decrescentes de FSH-e (12,5mg (BID) no 1º dia, 8,0mg (BID) no 2º dia, 4,0 mg (BID) no 3º dia). Para todos os grupos foi administrado 2500UI de hCG ou 750mg de LH-e na indução das ovulações. O número de folículos pré ovulatórios e ovulações foi maior nos grupos 2 e 3, já o número de embriões por ovulação foi semelhante entre todos os grupos. Entretanto a taxa de recuperação embrionária por lavado uterino foi maior nos grupos 2, 3 e 4 (1,3; 1,1 e 0,8 respectivamente) em comparação ao grupo controle (0,6), mostrando ser eficiente o uso do FSH-e para os programas de transferência de embriões

2.3. FSH SUÍNO (FSH-s)

O FSH-s é uma gonadotrofina de origem suína e amplamente utilizada nos protocolos de superovulação em bovinos. Em equinos as respostas são inferiores as obtidas nas vacas e seu custo é muito mais elevado por necessitar de altas doses (FORTUNE; KIMMICH, 1993).

A utilização de FSH-s (BID) nas concentrações de 25, 50, 100 e 150mg em éguas cíclicas demonstrou baixa efetividade, não sendo capaz de aumentar satisfatoriamente o número de ovulações (1,0; 1,08; 1,31; 0,98 respectivamente) e nem a taxa de embriões recuperados (0,68; 1,08; 0,66; 0,70 respectivamente) (CULLINGFORD et al., 2010). Outros estudos comprovaram as baixas taxas de ovulação e recuperação embrionária utilizando o FSH-s (BID) nas doses de 25mg e 50mg (IGNÁCIO et al., 2007; MENDES et al., 2008).

Resultados controversos foram obtidos com a utilização de 10mg de FSH-s (BID), iniciando o tratamento no 6º dia pós ovulação, até um ou mais folículos atingirem ≥ 35 mm de diâmetro. O número de ovulações foi maior nos grupos tratados

(2,2 e 2,8 respectivamente) em relação ao grupo controle (1,12). O número de embriões recuperados por ciclo foi maior no grupo tratado com 25mg (1,32) em comparação ao grupo 10mg (0,7) (KREKELER et al., 2006).

2.4. FSH EQUINO RECOMBINANTE (FSH-RE)

O FSH-re é um hormônio recombinante replicado a partir de células de ovários de hamsters apresentando ação *in vitro* e *in vivo* (JENNINGS et al., 2009).

Comparando os efeitos do FSH-re e FSH-s, observou-se um significativo aumento na atividade folicular quando utilizado o FSH-re, porém houve falhas nas ovulações em comparação a éguas não tratadas ou tratadas com FSH-s (CULLINGFORD et al., 2010). A mesma falha na ocorrência das ovulações foram relatadas por Deluca et al. (2008) e Niswender et al. (2003).

A associação do FSH-re com o LH-re, é utilizado com o objetivo de minimizar a ocorrência de falhas no processo de maturação dos oócitos. Meyers-Brown et al. (2010) administraram uma associação de FSH-re e LH-re no momento em que um ou mais folículos de 22 a 25 mm de diâmetros eram detectados. O grupo tratado recebeu 0,65mg de FSH-re a cada 12 horas, durante 3 dias. Após esse período o grupo recebeu uma vez por dia o mesmo tratamento até que um ou mais folículos atingissem 29 mm de diâmetro sendo então adicionados 1,5mg de LH-re a cada 12 horas até a presença de folículos de 32mm de diâmetro, quando a administração de FSH-re era interrompida. Depois disso as éguas passavam a receber LH-re 3 vezes ao dia até que a maioria dos folículos atingissem 35-38 mm de diâmetro quando então o tratamento era interrompido. A indução da ovulação foi realizada com a administração de 2500UI de hCG por via intravenosa e a recuperação embrionária realizada no 8º dia após a ovulação. O número de ovulações foi maior no grupo tratado em relação ao grupo controle que recebeu FSH-re e solução salina, e o número de folículos anovulatórios foi maior no grupo controle. O número de embriões recuperados por lavado foi maior no grupo tratado ($3,9 \pm 0,87$) do que no controle ($2,0 \pm 0,53$), mas a taxa de recuperação de embriões por ovulação foi similar entre os grupos mostrando a importância desta associação.

2.5. GnRH

A administração do GnRH e seus análogos como o acetato buserelina e o acetato de deslorelina tem como principal objetivo estimular a secreção das gonadotrofinas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em éguas em anestro foi testada a aplicação deste hormônio com a finalidade de manter níveis adequados de FSH para que ocorresse o crescimento folicular e antecipação da primeira ovulação na estação de monta (MCKINNON; VOSS, 1992). O GnRH também é uma alternativa não antigênica, ou seja não são capazes de criar anticorpos ao contrário do uso da hCG na indução da ovulação em éguas (MCCUE et al., 2007). A utilização do acetato de deslorelina com a função de induzir múltiplas ovulações nas éguas é uma alternativa mais segura em comparação ao EPE pois não há variação das partidas, uma vez que o acetato de deslorelina se trata de uma droga sintética (NAGAO et al., 2012).

Um estudo conduzido por Nagao e colaboradores (2012) testou a aplicação do acetato de deslorelina na dose de 100µg (BID) em éguas cíclicas com início do tratamento quando um dos ovários apresentasse um folículo de 25mm de diâmetro e um segundo folículo $\geq 21\text{mm} \pm 1\text{mm}$. As aplicações foram efetuadas até o momento em que os dois folículos atingissem no mínimo 33mm de diâmetro sendo feito neste momento a indução da ovulação e posteriormente inseminação artificial e coleta de embrião. Obteve-se uma taxa de 1,82 ovulações por ciclo no grupo tratado e de 1,0 ovulações por ciclo no grupo controle. O número de embriões recuperados por ovulação não apresentou diferença estatística entre os grupos, porém o número de embriões recuperados por ciclo diferiu significativamente sendo de 1,12 para o grupo tratado e 0,57 para o grupo controle.

O grande entrave no uso do GnRH e seus análogos é a dose e a frequência de suas aplicações. Inicialmente a exposição contínua ao GnRH causa uma hipersecreção de LH e FSH e posteriormente pode levar a uma dessensibilização da hipófise ocasionando um decréscimo na síntese das gonadotrofinas, evento denominado “*down regulation*”, já relatado em diferentes espécies (MUNSON et al., 2001; IRVINE, 1983). Este fenômeno pode ser minimizado com o início correto do tratamento e diminuição da duração do mesmo (NAGAO et al., 2012).

2.6. SULPIRIDA

A sulpirida é uma droga antidopaminérgica estimulante da prolactina utilizada em mulheres no auxílio à lactação (CHAVEZ; LAMOUNIER, 2004). Em humanos também é utilizado como antipsicótico antagonizando as ações da dopamina (VASCONCELOS et al., 2007). A dopamina possui dois receptor, D-1 e D-2, sendo o D-2 envolvido com a secreção de prolactina (CREESE et al, 1983) Os receptores D-2 foram encontrados em altas concentrações no tecido do CL e no córtex ovariano em éguas porém em baixas concentrações nas células da granulosa e teca enquanto que os receptores D-1 foram encontrados apenas no CL (King et al., 2005). A sulpirida é um D-2 antagonista do receptor da dopamina de baixo custo e alta disponibilidade.

Acreditava-se que em ratas e mulheres, a inibição dos receptores para dopamina induzia o aumento da secreção de gonadotrofinas (QUIGLEY et al., 1979; SARKAR; FINK, 1981). Em estudos posteriores na espécie equina foi relatado que não se aumentava a secreção e sim a quantidade de receptores para FSH e LH (MARI et al, 2009; TIBARY, 2011). Receptores para dopamina foram observados nas células da teca e granulosa dos folículos e níveis elevados de prolactina foram encontrados no fluído dos folículos maiores que 20mm de diâmetro (KING et al., 2002).

Autores sugerem que a sulpirida ajuda na produção de prolactina que age diretamente na população de receptores de FSH dos folículos (TIBARY, 2011). Mari et al. (2009) relataram um aumento significativo no diâmetro dos folículos de éguas tratadas com sulpirida em relação ao grupo não tratado e ao grupo tratado com domperidona em um experimento que visava antecipar a ciclicidade das éguas em anestro.

Estudos comprovaram que a ação da sulpirida induz a atividade ovariana em éguas que estavam em anestro profundo (MARI et al., 2009; PANZANI et al., 2011).

Apesar da ação direta na atividade ovariana a sulpirida não foi estudada como uma droga indutora de múltiplas ovulações, necessitando-se mais estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, M.A., FLEURY, P.D.C., ALVARENGA, M.A. Efeito da frequência do tratamento com baixas doses do extrato de pituitária eqüina na indução de múltiplas ovulações em éguas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Axará-MG. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.34, p532, 2006.

ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.; NVES NETO, J.R.; SQUIRES, E.L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulations in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.88-91, 2008.

ARAÚJO, G.H.M., ROCHA FILHO, A.N., LOPES, E.P., MOYA, C.F., ALVARENGA, M.A. Use of low dose of equine purified FSH to induce ovulations in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.380-383, 2008.

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

CARMO, M.T, LOSINO, L., AQUILAR, J.J., ARAÚJO, G.H.M., ALVARENGA, M.A., Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.337-339, 2006.

CHAVES, R.G., LAMOUNIER J.A. Uso de medicamentos durante a lactação. **Jornal de Pediatria**, v.80, p.189-198, 2004.

CREESE, I., SIBLEY, D. R., Leff, S. Classification of dopamine receptors. **Adv. Biochem. Psychopharmacol**, v. 37, p.255-266, 1983.

CULLINGFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; SEIDEL. G.E. Attempts at superovulation of mares with porcine follicle stimulating hormone and recombinant equine follicle stimulating hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, p.305-309, 2010.

DELUCA, C.A., MCCUE, P.M., SQUIRES, E.L. Comparison of three doses of reFHS for superovulation of mares. **Theriogenology**, v.70, p. 576-591, 2008.

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

FARIA, D.R., GRADELA, A. Hormônio terapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, n.2, p.114-122, 2010.

FARINASSO, A., BRANQUINHO, J.A., RUMPF, R. & ALVARENGA, M.A., Utilização de baixas doses de extrato de pituitária eqüina para indução de ovulações múltiplas em éguas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis-RJ. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33, p135-38, 2005.

FORTUNE, J.E.; KIMMICH, T.L. Purified pig FSH increases the rate double ovulation in mares. **Equine Veterinary Journal**, suppl. 15, p.15, 1993.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects**. 2^a. Ed. Crossplains: Equiservices, p.642,1992.

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

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

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

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

IGNÁCIO, F.S.; BERGFELT, D.R.; ORLANDI, C.; MONTECHIESI, D.F.; WECHSLER, F.S.; MEIRA, C. Ovarian response to pFSH and embryo recovery following follicular wave emergence induced by follicle ablation in mares. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.35, p.1245, 2007.

IRVINE, C. H. G. Gonadotropin-releasing hormone. **Journal Equine Veterinary Science**, v.3, p.168-170, 1983.

JENNINGS, M.W., BOIME, I., DAPHNA-IKEN, D., JABLONKA-SHARIFF, A., CONLEY, A.J., COLGIN, M., BIDSTRUP, L.A., MEYERS-BROWN, G.A., FAMULA, T.R., ROSER, J.F. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a 21 follicular suppression model. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 191-307, 2009.

KING S.S., JONES K.L., ROSER J.F., NEQUIN L.G., MURPHY L.L., CAMPBELL A.G. Evidence for a local dopamine driven ovarian regulatory system in the mare. **Theriogenology** v. 58, p.619–22, 2002.

KING, S.S., CAMPBELL, A.G., DILLE, E.A., ROSER, J.F., MURPHY, L.L., JONES, K.L. Dopamine receptors in equine ovarian tissues. **Domest. Anim. Endocrinol**, v. 28, p.405-415, 2005.

KREKELER, N.; HOLLINSHEAD, F.K.; FORTIER, L.A.; VOLKMANN, D.H. Improved ovulation and embryo recovery rates in mares treated with porcine FSH. **Theriogenology**, v. 66, p.663-687, 2006.

MACHADO, M.S., ARANTES, M.; PERES, K.R., LEÃO, K.M., CARMO, M.T., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório utilizando o extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.506-508, 2003.

MARI, G.; MORGANTI, M.; MERLO, B.; CASTAGNETTI, C.; PARMEGGIANI, F.; GOVONI, N.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrus mares. **Theriogenology**, v.71 p. 959-965, 2009.

MCCUE, P.M., MAGEE, C., GEE, E.K. Comparison of compounded Deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.58-61, 2007.

MCCUE, P.M. Strategies for Using eFSH for Superovulating Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.91-96, 2008.

McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 5^a Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

MEYERS-BROWN, G.A., MCCUE, P.M., NISWENDER, K.D., SQUIRES, E.L., DELUCA, C.A., BIDSTRUP, L.A., COLGIN, M., FAMULA, T.R., ROSER, J.F. Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone: ovulation rates, embryo retrieval, and hormone profiles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, p. 560-568, 2010.

MENDES, D., IGNÁCIO, F.S., BERGFELT, D.R., OLIVEIRA, J.V., CARVALHO, R.L., MEIRA, C. Resposta ovulatória e recuperação embrionária em éguas brasileiro de hipismo submetidas a tratamentos com FSHp ou EPE. **Acta Scientiar Veterinarie**, v.36, p.586, 2008.

MUNSON, L.; BAUMAN, J.E.; ASA, C.S.; JOCHELE, W.; TRIGG, T.E. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 269-273, 2001.

NAGAO, J.F.; NEVES, J.R.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69-73, 2012

NISWENDER, K.R., ALVARENGA, M.A., MCCUE, P.M., HARDT, Q.P., SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, v.23, p.497-500, 2003.

PANZANI D., ZICCHINO, L.; TARAS, A.; MARMORINI, P.; CRISCI, A.; ROTA, A.; CAMILLO, F. Clinical use of dopamine antagonist sulpiride to advance first ovulation in transitional mares. **Theriogenology**, v.75, p.138–143, 2011.

PERES, C.F., ALVARENGA, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F. Effect of eFSH on ovarian cyclicity and embryo production of mares in spring transitional phase. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.176-180, 2007.

PIERSON R.A., GINTHER O.J. Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development. **Animal Reproduction Science**, v.22, p.131-144, 1990.

QUIGLEY, M.E., JUDD, S.J., GILLILAND, G.B., YEN, S.S.C. Effects of a dopamine antagonist on the release of gonadotropin and prolactin in normal women and women with hyperprolactinemic anovulation. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v.48, p. 718–719, 1979.

SARKAR, D.K., FINK, G. Gonadotropin-releasing hormone surge: possible modulation through postsynaptic α -adrenoceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. **Endocrinology**, v.108, p. 862–867, 1981.

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**, v.58, p.151-64, 2002.

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

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L., MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.1-8, 2006.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1836 – 1844, 2011.

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

THARASANIT, T., COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M., STOUT, T.A.E. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. **Theriogenology**, v. 65, p. 1071–1081, 2006.

TIBARY, A. Dopamine antagonists. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1788–1793, 2011.

VASCONCELOS S.M.M., LIMA, N.M.; SALES, G.T.M.; PATROCINIO, M.C.A.; OLIVEIRA, G.R.; SOUSA, F.C.L.; VIANA, G.S.B. Efeito da sulpirida sobre a densidade de receptores dopaminérgicos D₂-símile em corpo estriado de ratos jovens e velhos. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica** v.1, p.15-20, 2007.

Capítulo 3

TRABALHO QUE SERÁ ENVIADO À REVISTA CIÊNCIA RURAL**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA SULPIRIDA NO DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR EM ÉGUAS**

F.D.S.M. CRUZ^{1*}, M.A. ALONSO, M.A. ALVARENGA¹, C.P. FREITAS-
DELL'AQUA¹, F.O. PAPA¹, J.A. DELL'AQUA JR.^{1#}

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

E-mail: dellaquajunior@uol.com.br

[Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 18610-970, Fone: \(14\) 38116249, Fax: \(14\) 38116045, Botucatu, São Paulo, Brasil.](#)

Resumo

A indução de múltiplas ovulações nas espécies domésticas é de extrema importância para a melhoria dos resultados e custos de biotécnicas como a transferência de embriões, inseminação com sêmen de baixa fertilidade, transferência de oócitos, entre outras. Este estudo teve como objetivo determinar se a sulpirida poderia induzir múltiplas ovulações em éguas. Dezesete éguas foram aleatoriamente utilizadas nos dois grupos experimentais. No grupo de éguas tratadas com sulpirida 1mg/kg (IM) a cada 12 horas, o protocolo foi iniciado apenas em éguas que alcançaram um folículo de 24 mm $\pm$ 2mm de diâmetro e um segundo folículo $\geq 20 \pm 2$ mm de diâmetro. No grupo controle, utilizou-se o mesmo protocolo de início do tratamento porém as éguas foram tratadas com solução salina 0,9% (IM) a cada 12 horas. Em ambos os grupos, se durante as avaliações ultrassonográficas era verificado crescimento folicular concomitante de dois ou mais folículos, o tratamento perdurava até quando o menor folículo atingisse no

mínimo 33 mm de diâmetro. Neste momento a ovulação foi induzida com 1500 UI de hCG. A inseminação artificial foi realizada 24 horas após a indução, e os embriões foram coletados no oitavo dia após a primeira ovulação. As variáveis estudadas foram analisadas utilizando o teste t de Student e teste exacto de Fisher. No grupo tratado, 35% das éguas tiveram mais que uma ovulação e uma média de 1,4 ovulações por ciclo enquanto que no grupo controle apenas 11% das éguas tiveram mais que uma ovulação e uma média de 1,1 ovulações por ciclo. No grupo tratado com sulpirida o tempo de início do tratamento até a primeira ovulação foi de $3,9 \pm 0,9$ dias enquanto que no grupo controle foi de $4,9 \pm 1,0$ ($P < 0,001$). A administração da sulpirida durante o desenvolvimento folicular estimulou a atividade ovariana e não contribuiu para um aumento significativo nas taxas de duplas ou triplas ovulações, entretanto algumas éguas apresentaram uma maior incidência de múltiplas ovulações quando submetidas ao protocolo proposto, sugerindo que novos estudos devem ser conduzidos para esclarecimentos desses resultados.

Palavras chave: dupla ovulação, égua, transferência de embrião.

Abstract

The induction of multiple ovulations in domestic species is of extreme importance to provide improvements of results and costs of biotechnologies such as embryo transfer, artificial insemination with poor quality semen, oocyte transfer among others. This study aimed to determine if sulpiride could induce multiple ovulations in mares. Seventeen mares randomly passed the two experimental groups. In the group of mares treated with sulpiride 1mg/kg (IM) every 12 hours, the protocol was initiated only in

mares that have achieved a follicle of $24 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$ in diameter and a second follicle $\geq 20 \pm 2 \text{ mm}$ in diameter. In the control group, were used the same protocol, but the mares were treated with 0.9% saline solution (IM) every 12 hours. During the ultrasound evaluation if was observed the follicular growth the treatment even when the lower follicle reached at least 33 mm in diameter. At this time the ovulation was induced with 1500 IU of hCG. Artificial insemination was performed 24 hours after ovulation induction, and the embryos were collected on the eighth day after the first ovulation. The variables were analyzed using Student's t Fisher's exact test and test. In group treated, 35% of the mares had more than one ovulation and ovulation an average of 1.4 per cycle while in control group only 11% of the mares had more than one ovulation and ovulation an average of 1.1 per cycle. In the group treated with sulpiride the time of the treatment beginning to the first ovulation was $3,9 \pm 0.9$ days whereas the control group was 4.9 ± 1.0 ($P < 0,001$). Administration of Sulpiride during follicular development stimulated ovarian activity but did not contribute to a significant increase in the rates of double or triple ovulations, however some mares had a higher incidence of multiple ovulations when subjected to the proposed protocol, suggesting that further studies should be conducted for clarification of these results.

Keywords: double ovulation, mare, embryo transfer.

1. INTRODUÇÃO

A estrutura anatômica e funcional dos ovários das éguas difere em relação aos demais animais domésticos, devido ao posicionamento das regiões granular e cortical, bem como pela presença da ovulação ser efetuada numa região específica, a fossa da ovulação. Outra característica marcante da espécie equina é a dificuldade de realização de protocolos superovulatórios com resultados semelhantes aos descritos em bovinos.

A baixa recuperação embrionária por folículo ovulado é o maior entrave nessa espécie, devido principalmente a formação de um coágulo na fossa ovulatória que impede a captação dos oócitos ovulados (CARMO et. al., 2003). Nesse sentido, atualmente os protocolos visam a obtenção de duplas ou triplas ovulações por ciclo estimulado, visando uma maior taxa de recuperação embrionária por ovulação.

Taxas médias de recuperação embrionárias por ciclo em éguas são descritas por Alvarenga et. al., 2008, como entorno de 60%. Esses índices, associados ao curto período de tempo em que as fêmeas equinas ciclam durante uma estação de monta, contribuem para baixa obtenção de produtos por ano e consequentemente uma lenta seleção genética em relação a outras espécies.

Diferentes drogas e protocolos têm sido testados em diversos estudos visando um aumento dos índices reprodutivos nas éguas. A sulpirida tem sido utilizada há vários anos como ferramenta para antecipar o retorno a ciclicidade de éguas em fase de transição, visto que sua ação está correlacionada a um aumento de prolactina e receptores de gonadotrofinas, entretanto seu efeito em éguas ciclantes ainda é pouco estudado. O folículo dominante é mais responsivo ao FSH e LH, possuindo maior quantidade de receptores para essas gonadotrofinas, com o seu crescimento ocorre um aumento de estradiol e inibina o que leva a uma atresia dos outros folículos, de menor

tamanho e menor concentração de receptores (GINTHER, 1992). Nesse sentido o objetivo do presente trabalho é estudar o efeito desta droga na atividade ovariana de éguas ciclantes com o intuito de estimular múltiplas ovulações agindo próximo ao momento de dominância.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva de 2013/2014, em uma fazenda localizada em Araçoiaba da Serra/SP. Foram utilizados 34 ciclos estrais de 17 éguas cíclicas, mestiças com idade entre 4 a 16 anos e peso entre 250 a 400 kg. O escore de condição corporal de todas as éguas foi considerado alto, com escore médio sete (escala de 1 a 9, HENNEKE et al, 1983).

Os animais que participaram do experimento foram usados em acordo com aprovação pela Comissão de Ética da FMVZ – UNESP/Botucatu no uso de animais, protocolo número 65/2012. As éguas foram mantidas em piquetes formados por capim Coast-cross (*Cynodon dactylon*), e suplementação mineral, concentrado peletizado e acesso livre a água.

2.2. CONTROLE ULTRASSONOGRÁFICO

Todas as éguas eram acompanhadas diariamente por palpação transretal e exame ultrassonográfico, utilizando-se transdutor linear de 5 MHz, visando assim identificar os animais aptos para início do tratamento, bem como acompanhamento do desenvolvimento folicular durante esse período.

2.3.GRUPOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado entre os meses de outubro de 2013 a janeiro de 2014. A primeira ovulação da estação foi descartada de todas as éguas, para o restabelecimento da plena atividade reprodutiva no começo da estação de monta. Oito dias após a primeira ovulação, todas as éguas receberam 5mg de dinoprost trometamina (Lutaluse® Pfizer, New York, NY, USA) e esse processo se manteve no ciclo subsequente.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre grupos. No primeiro ciclo avaliado, 9 éguas foram direcionadas ao grupo controle e 8 éguas ao grupo tratado, no ciclo subsequente as éguas foram trocadas de grupo, de modo que todos os animais passaram por todos os grupos.

Quando os ovários apresentavam um folículo de $24 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$ de diâmetro e um segundo folículo $\geq 20 \pm 2 \text{ mm}$ de diâmetro, no grupo tratado iniciavam-se as aplicações de sulpirida 1mg/kg (IM), de 12 em 12 horas. No grupo controle a mesma avaliação foi feita para se estabelecer o início das aplicações de 2mL de Solução Salina (0,9%) (IM), de 12 em 12 horas. Se durante as avaliações ultrassonográficas era verificado crescimento folicular concomitante de dois ou mais folículos, o tratamento perdurava até quando o menor folículo atingisse no mínimo 33 mm de diâmetro. Nesse momento realizava-se a indução da ovulação com 1500UI de hCG (Vetecor, Laboratório Calier, São Paulo, Brasil) por via endovenosa. Vinte e quatro horas após a indução das ovulações foi realizada a inseminação artificial. A colheita dos embriões era realizada oito dias após a primeira ovulação detectada.

2.4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

As éguas eram inseminadas 24 horas após a indução da ovulação, utilizando-se sêmen fresco de dois garanhões de fertilidade conhecida, sendo que cada égua foi inseminada com sêmen do mesmo garanhão nos dois grupos diferentes. O sêmen era colhido com a utilização de vagina artificial modelo Botucatu (Papa & Alvarenga, 1984). Prontamente após a colheita, o sêmen era diluído em extensor à base de leite desnatado (Botusêmen®, Botupharma, Botucatu, Brasil) na diluição de 50×10^6 de espermatozoides/ml e uma dose inseminante de 500×10^6 espermatozoides viáveis era utilizada para realização das inseminações.

2.5. COLHEITA DOS EMBRIÕES

Antes de iniciar o processo de colheita de embrião, era realizada a higienização da região do períneo, utilizando detergente e água corrente, fazendo ao menos três lavagens sucessivas e secagem com papel toalha.

Utilizando-se uma sonda para lavagem uterina modelo Bivona® (Bivona Medical Technologies, Gary, IN, EUA), que era introduzida por via transcervical e então inflado o balonete com 45ml de ar para impedir o refluxo do conteúdo infundido no útero. Eram realizados quatro lavados com a infusão de um litro por lavado de solução de Ringer com Lactato de Sódio® (J.P. Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, São Paulo) o qual era retirado do útero por gravidade passando por um filtro apropriado de 75µm.

Após o termino dos quatro lavados o conteúdo restante no filtro era transferido para uma placa de petri de tamanho 100 x 200 mm com fundo demarcado por colunas. Para a visualização do embrião era utilizado um estereomicroscópio Nikon modelo SMZ 745. Após a identificação e classificação dos embriões segundo o grau de desenvolvimento e qualidade descrito por MCCUE et al., (2009) os embriões eram

transferidos com o auxílio de uma palheta de 0,25ml ou 0,5ml selecionada de acordo com o tamanho do embrião para uma nova placa de petri que continha de seis a oito gotas de meio de manutenção de embriões Holding plus - Embriocare® (Cultlab, Campinas, São Paulo).

O embrião era manipulado dentro de cada uma das gotas, até que ele passasse por todas elas. Ao término desse procedimento o embrião era envasado em uma palheta que por sua vez era colocada em uma bainha azul estéril e protegida por uma camisa sanitária. A transferência do embrião para a receptora foi realizada por via transcervical.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram efetuadas através do programa SAS, versão 9.1. Para análise das variáveis estudadas foi efetuado teste “t de Student” ou o teste Exato de Fisher. Todas as análises foram consideradas significativas quando $P < 0,001$.

3. RESULTADOS

O número médio de dias de tratamento com Sulpirida foi de 3,9 dias, este foi o tempo médio que as éguas levaram em dias para a indução da ovulação, desde o início das aplicações. Já as éguas do grupo controle levaram em média 4,9 dias para atingirem esse momento. O tamanho dos folículos no momento da indução da ovulação foi similar entre os grupos. O número de éguas que ovularam dois ou mais folículos por ciclo não diferiu estatisticamente entre os grupos sendo maior no grupo tratado do que no grupo controle (6 de 17 éguas e 2 de 17 éguas) respectivamente. O intervalo entre duplas ou triplas ovulações em ambos os grupos foi menor do que 24 horas.

O número de ovulações, a média do número de ovulações por ciclo, o número de embriões recuperados e o número de embriões recuperados por ciclo não

apresentaram diferença estatística entre os grupos (24 ovulações; 1,4 ovulações por ciclo; 17 embriões; 1,0 embriões recuperados por ciclo) do que no controle (19 ovulações; 1,1 ovulações por ciclo; 13 embriões; 0,7 embriões recuperados por ciclo) respectivamente.

O número de embriões recuperados por ovulação e a porcentagem de embriões recuperados por ovulação não apresentou diferença estatística entre os grupos, tratado e controle (0,7 e 0,68 embriões; e 70% e 68% de embriões recuperados por ovulação respectivamente). Dados apresentados na Tabela 1.

4. DISCUSSÃO

Autores sugerem que ação da sulpirida está relacionada a produção de prolactina e consequentemente aumento de receptores de FSH e LH nos folículos (TIBARY, 2011) diferentemente do que se acreditavam que ela estava relacionada a um aumento das concentrações dessas gonadotrofinas como descrito por Quigley et al., 1979 e Sarkar; Fink, 1981. Sua ação na atividade ovariana já foi descrita por diversos autores que relataram ter estimulado o crescimento folicular em éguas em anestro com a função de antecipar a estação de monta (BESOGNET et al, 1996; MARI et al, 2009; TIBARY, 2011) devido a dopamina exercer uma ação inibitória na atividade reprodutiva de éguas nesta fase (BESOGNET et al., 1996), porém o mesmo efeito em éguas ciclantes é desconhecido.

Nesse experimento optou-se por iniciar o protocolo de aplicações da sulpirida em um momento próximo a dominância folicular, com intuito de interferir no mecanismo de dominância folicular e proporcionar uma maior quantidade de receptores de gonadotrofinas para o folículo co-dominante, porém este fato pode ter contribuído para um a menor estimulação ovariana da maioria das éguas submetidas ao tratamento.

Vários protocolos desenvolvidos para super estimulação ovariana em éguas se iniciam no momento em que a onda folicular ainda apresenta crescimentos de vários folículos alguns dias antes do desvio, como descritos por (MEIRA; BURATINI, 1998, ALVARENGA et al., 2003; SCOGGIN et al., 2002; CARMO, 2003). O uso prolongado da sulpirida em mulheres pode causar distúrbios na hipófise (QUIGLEY et al., 1979) inibindo a secreção das gonadotrofinas, efeito descrito como *down regulation* e semelhante ao ocorrido em altas frequências de aplicações de análogos ao GnRH em éguas (NAGAO et al., 2012), entretanto este fato não foi visualizado no presente experimento, nesse sentido, faz-se necessário o estudo da sulpirida iniciando o protocolo de estimulação ovariana em fases mais precoces do desenvolvimento folicular.

A porcentagem de animais que responderam ao protocolo, apresentando pelo menos duas ovulações foi de 35% em contrapartida a porcentagem dos animais do grupo controle que também obtiveram no mínimo duas ovulações foi de 11%, apesar da não observação de diferença estatística entre os grupos, taxas de dupla ovulação acima de 22% podem ser consideradas acima do fisiologicamente aceito para a espécie equina (BELLING, 1983; GINTHER, 1987) indicando moderado efeito do tratamento realizado. Das duas éguas do grupo controle que apresentaram duas ovulações apenas uma delas também obteve dupla ovulação no grupo tratado sendo assim, cinco éguas foram sensíveis ao protocolo estabelecido.

O intervalo entre o momento do desvio folicular, fase que foram iniciadas as aplicações e o período da indução da ovulação foi significativamente menor nas éguas suplementadas com o sulpirida, este fato demonstra que a fisiologia ovariana foi modificada, sugerindo que modificações em relação ao momento para início do protocolo pode promover resultados melhores dos obtidos neste experimento.

Os resultados obtidos em relação ao número de animais que responderam ao protocolo com dupla ou triplas ovulações foram inferiores aos observados por outros pesquisadores utilizando outra drogas para estimulação do crescimento folicular como Extrato de Pituitária Equina (EPE) (ALVARENGA et al., 2003; SCOGGIN et al., 2002; CARMO, 2003), Acetado de Deslorelina (NAGAO et al., 2012), entretanto aparentemente mais promissor que outros fármacos já utilizados como o FSH suíno (IGNÁCIO et al., 2007; MENDES et al., 2008).

Em relação ao número de embriões recuperados por ovulação das éguas que responderam ao tratamento com a sulpirida foi similar aos descrito por (NAGAO et al., 2012) utilizando o acetato de deslorelina e superior ao encontrado nas éguas tratadas com EPE (ALVARENGA et al., 2003; SCOGGIN et al., 2002; CARMO, 2003). Esse fato está relacionado à particularidade encontrada nas éguas na qual seus folículos só possuem um sítio de ovulação, a fossa ovulatória e quanto maior for o número de ovulações menor será a taxa oócitos presentes no oviduto e consequentemente menor será a taxa de embriões recuperados por ovulação (CARMO, 2003 e HIRANO et al., 2009), evidenciando que para a espécie equina, estimulações ovarianas que proporcionem duplas ou triplas ovulações parece ser o mais indicado.

A porcentagem de embriões recuperados por ciclo não diferiu estatisticamente entre o grupo controle (0,7) e tratado (1,0), entretanto, a recuperação embrionária de um embrião por lavado uterino em média foi semelhante ao observado por Nagao et. al., 2012 e inferior as descritas por (ALVARENGA et al., 2003; SCOGGIN et al., 2002; CARMO, 2003) utilizando EPE.

Baixas estimulações ovarianas para obtenção de duplas e triplas ovulações parece ser uma direção interessante a se seguir na espécie equina associado à utilização de drogas sintéticas. Nesse sentido uma utilização combinada da sulpirida para

aumentar os receptores ovarianos e o acetato de deslorelina para incremento da secreção gonadotrófica de FSH e LH se apresenta como opção promissora para futuras investigações, tanto para antecipar a ciclicidade no início da estação de monta como para obtenção de uma maior quantidade de embriões por ciclo.

5. CONCLUSÃO

A administração da sulpirida no momento próximo a dominância, estimulou a atividade ovariana e não contribui para um aumento significativo nas taxas de múltiplas ovulações, entretanto algumas éguas apresentaram uma maior incidência de múltiplas ovulações quando submetidas ao protocolo proposto, sugerindo que novos estudos devem ser conduzidos para esclarecimentos desses achados.

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Valores médios de diferentes variáveis entre as éguas do grupo controle ou submetidas ao tratamento com sulpirida.

Variáveis	Controle	Tratamento
Número de ciclos	17	17
Dias de Tratamento	4,9±1,0	3,9±0,9*
Número de éguas com 2 ou 3 ovulações por ciclo	2	6
Porcentagem de 2 ou 3 ovulações por ciclo	11%	35%
Média de ovulações por ciclo	1,1	1,4
Número de embriões recuperados por ciclo	0,76	1
Porcentagem de embriões recuperados por ciclo	76%	100%
Número de embriões recuperados por ovulação	13/19	17/24
Porcentagem de embriões recuperados por ovulação	68%	71%

*P<0,001

6. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L; MACHADO, M, S.; ARANTES, M.; PERES, K.R.; LEÃO, K.M.; OLIVEIRA, J.V.; ROSER, J.F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH eqüino purificado. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, p.216-217, 2003.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulations in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.88-91, 2008.

BELLING, T.H. Reproduction in the mare. **Equine Practice**, v.5, p.13-18, 1983.

BESOGNET, B., HANSEN, B.S., DAELS, P.F. Dopaminergic regulation of gonadotrophin secretion in seasonally anoestrous mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.55-61, 1996.

CARMO, T.M. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas. **Tese** (mestrado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP, 2003.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v.19, p.137-137, 1987.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects**. 2^a. Ed. Crossplains: Equiservices, p.642,1992.

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

HIRANO, Y.; KIMURA, J.; NAMBO, Y.; YOKOTA, H.; NAKAMURA, S.; TAKEMOTO, S.; HIMENO, R.; MISHIMA, T.; MATSUI, M.; MIYAKE, Y. I. Population of follicles and luteal structures during the oestrous cycle of mares detected by three-dimensional internal structure microscopy. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.38, p.214-218, 2009.

IGNÁCIO, F.S.; BERGFELT, D.R.; ORLANDI, C.; MONTECHIESI, D.F.; WECHSLER, F.S.; MEIRA, C. Ovarian response to pFSH and embryo recovery following follicular wave emergence induced by follicle ablation in mares. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.35, p.1245, 2007.

MARI, G.; MORGANTI, M.; MERLO, B.; CASTAGNETTI, C.; PARMEGGIANI, F.; GOVONI, N.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. **Theriogenology**, v.71 p. 959-965, 2009.

MCCUE, P.M., DELUCA, C.A., FERRIS, R.A., WALL, J.J. How to evaluate equine embryos. **Annual Convention of the AAEP – Las Vegas, NV, USA**, v.55, p.252-256, 2009.

MEIRA, C., BURATINI, J. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.26, p.125-140, 1988.

MENDES, D., IGNÁCIO, F.S., BERGFELT, D.R., OLIVEIRA, J.V., CARVALHO, R.L., MEIRA, C. Resposta ovulatória e recuperação embrionária em éguas brasileiro de hipismo submetidas a tratamentos com FSHp ou EPE. **Acta Scientiar Veterinarie**, v.36, p.586, 2008.

NAGAO, J.F.; NEVES, J.R.; PAPA, F.O; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69-73, 2012

QUIGLEY, M.E., JUDD, S.J., GILLILAND, G.B., YEN, S.S.C. Effects of a dopamine antagonist on the release of gonadotropin and prolactin in normal women and women with hyperprolactinemic anovulation. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v.48, p. 718–719, 1979.

SARKAR, D.K., FINK, G. Gonadotropin-releasing hormone surge: possible modulation through postsynaptic α -adrenoceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. **Endocrinology**, v.108, p. 862–867, 1981.

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**. v.58, p.151-64, 2002.

TIBARY, A. Dopamine antagonists. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1788–1793, 2011.

Capitulo 4

CONCLUSÕES GERAIS

A administração da sulpirida estimula a atividade ovariana de éguas em estro.

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

A administração da sulpirida não contribuiu para um aumento significativo nas taxas de duplas ou triplas ovulações, entretanto algumas éguas apresentaram uma maior incidência de múltiplas ovulações quando submetidas ao protocolo proposto, sugerindo que novos estudos devem ser conduzidos para esclarecimentos desses achados.

ANEXOS

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de ***Sitophilus oryzae*** (L.), ***Cryptolestes ferrugineus*** (Stephens) e ***Oryzaephilus surinamensis*** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural** ,

Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f.

Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Thank you for submitting your manuscript to *Cienda Rural*.

Manuscript 10 : CR-2014-0980

Title: **Effect of administration of subpride in the follicular development in mares**

Authors: **Cruz, Fernando**

Date Submitted: **01-Jul-2014**