

MILENA DA SILVA MACHADO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ENDÓCRINO DE ÉGUAS
SUBMETIDAS A TRATAMENTOS SUPEROVULATÓRIOS
COM EXTRATO DE PITUITÁRIA E FSH EQUINO
PURIFICADO**

Botucatu – SP
2008

MILENA DA SILVA MACHADO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ENDÓCRINO DE ÉGUAS
SUBMETIDAS A TRATAMENTOS SUPEROVULATÓRIOS
COM EXTRATO DE PITUITÁRIA E FSH EQUINO
PURIFICADO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, Área de Conhecimento Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu – SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Machado, Milena da Silva.

Avaliação do perfil endócrino de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária e FSH eqüino purificado / Milena da Silva Machado. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução 2. Endocrinologia veterinária

CDD 636.10824

Palavras-chave: Égua; Extrato de pituitária; Eqüina; FSH eqüino purificado; Perfil hormonal; Superovulação



Dedicatória

Dedico este trabalho...

*A **Deus** pela oportunidade da vida, saúde e
força para enfrentar os obstáculos.*

*Aos **meus pais** que, por obra do destino, não
puderam estar presentes nestes momentos,
mas tenho a certeza de que mesmo
inconscientes torcem e contribuem para o meu
sucesso.*

À minha família, que mesmo de longe me transmitem suas energias.

À minha querida irmã **Miriana** em quem tenho me inspirado para prosseguir.

Ao meu namorado **Luciano**, que esteve do meu lado durante todo este trabalho.

Igualmente, dedico aos animais, que sempre foram meus amigos e meus melhores incentivadores.



Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Marco Antonio Alvarenga pela amizade, paciência, incentivo e pelos conhecimentos transmitidos durante esses 7 anos da minha vida, que me proporcionaram a conquista do título de Doutora.

Agradeço de forma especial ao Dr. Paulo e Dona Sônia, proprietários da Fazenda Santo Antonio de Palmares, os quais me incentivaram e possibilitaram o término deste trabalho.

Ao Gabriel o qual as palavras se tornam pequenas para agradecer pelo muito que me ajudou com seu entusiasmo nessa fase final do trabalho.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal: Papa, Fernanda, Sony, Eunice, Denise, Meira, João, Nereu e seus orientados.

Aos meus grandes amigos Claudinha, Elen, Marcelo, Karen, Letícia e Gustavo (Bigu).

Ao professor Frederico Ozanam Papa pela colaboração.

À professora Eunice Oba pela ajuda e pela disponibilização do laboratório para a dosagem hormonal.

À professora Lídia pela colaboração na realização das análises estatísticas.

Aos colegas do Departamento: Márcio, Antônio, Zé, Gustavo, Carla, Fabiana, Bió e Viviane.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: Edilson, Marquinhos, Valter, Cristina, Márcio, Tico, Miguel.

À Denise, Maria e Zé Roberto da pós-graduação, pela paciência e assistência.



Resumo

MACHADO, M.S. Avaliação do perfil endócrino de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com Extrato de Pituitária eqüina e FSH eqüino Purificado. Botucatu, 2008. Tese (Doutorado) – Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

RESUMO

Respostas superovulatórias satisfatórias têm sido reportadas em éguas com o uso do Extrato de Pituitária Eqüina (EPE) e FSH purificado eqüino (eFSH), contudo as taxas de recuperação embrionária permanecem inconsistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações plasmáticas de estradiol, inibina, FSH e LH em éguas superovuladas com eFSH e EPE (em doses constantes ou decrescentes): antes, durante e imediatamente após o término da administração hormonal. Foram utilizadas seis éguas as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: Grupo I (GI) recebeu 25mg de EPE intramuscular (I.M.), Grupo II (GII) foram tratadas com EPE (I.M.) em doses decrescentes. No Grupo III (GIII), o EPE foi substituído por 12,5mg de eFSH (I.M.). O Grupo IV (GIV) foi utilizado como controle. Sangue foi coletado diariamente para avaliar as concentrações hormonais por radioimunoensaio. As coletas foram iniciadas dois dias antes da primeira aplicação medicamentosa, encerrando 48 horas após a última ovulação do estro. As diferenças nos níveis plasmáticos hormonais foram comparadas utilizando-se o ANOVA, sendo considerada diferença estatística quando $P < 0,05$. O número médio de ovulações foi de 3,3; 4,8; 5,0 e 1,0 nos grupos 1 a 4, respectivamente, tendo sido maior ($P < 0,05$) em todos os grupos superovulados em relação ao controle. As concentrações de estrógeno, inibina, FSH e LH não diferiram entre os grupos durante o período 1. No período 2, os valores de estradiol foram maiores ($P < 0,05$) em éguas sob tratamento superovulatório com eFSH (GIII) 29,52pg/ml, os grupos I e II, apresentaram valores intermediários (GI: 16,75pg/ml, GII: 16,26pg/ml) e o GIV (7,78pg/ml) menor estatisticamente aos demais. Foi verificada uma correlação altamente positiva ($R = 0,615$; $P = 0,01$) entre os valores de estradiol e inibina, os quais, durante os tratamentos, foram maiores ($P < 0,05$) em éguas submetidas aos tratamentos superovulatórios quando avaliadas em conjunto: (GI) 531,6pg/ml, (GII) 703,30pg/ml e (GIII) 1036,30pg/ml, em comparação ao controle (GIV) 296,80pg/ml. As concentrações de inibina foram positivamente correlacionadas ($R = 0,61$; $P = 0,05$) com o número de ovulações nos grupos tratados com EPE: GI e GIII. Durante o período 2, maiores concentrações de FSH ($P < 0,05$) foram verificadas no GI (16,64ng/ml) e GII (15,12ng/ml) em comparação ao GIV (4,42pg/ml). Os animais sob tratamento com eFSH (GII) apresentaram

concentrações de FSH intermediárias estatisticamente aos demais grupos (9,93ng/ml). Na avaliação de todos os períodos, foi detectada uma correlação negativa entre as concentrações de FSH e estradiol ($R=0,57$ e $P=0,05$). As concentrações de LH obtidas no período 2 foram superiores ($P<0,05$) nos grupos superovulados GI (5,47ng/ml), GII (2,99ng/ml) e GIII (4,64ng/ml), em relação ao GIV (2,33ng/ml). Ao transcorrer do período 4, as concentrações médias de LH no GIV (controle) de 12,2ng/ml foram superiores ($P<0,05$) às obtidas no GII (eFSH) de 1,8ng/ml e GIII (EPE decrescente) de 1,5ng/ml. A concentração média de LH verificada neste período no GI (6,8ng/ml) foi similar à dos demais grupos. Os resultados obtidos no presente experimento nos permitem concluir que o tratamento superovulatório leva a várias alterações, algumas esperadas e outras não, no perfil hormonal endócrino. Os baixos níveis de LH peri-ovulatório foi o achado mais intrigante observado.

Palavras Chaves: Perfil Hormonal, Superovulação, Égua, Extrato de Pituitária Equina, FSH Equino Purificado.



Abstract

MACHADO, M.S. Endocrinological profiles of mares super ovulated with Equine Pituitary Extract and Purified Equine FSH. Botucatu, 2008. Tese (Doutorado) – Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Satisfactory superovulatory responses have been reported in mares with the use of equine pituitary extract (EPE) and purified equine FSH (eFSH), however embryo recovery rates are still inconsistent. Recent studies demonstrated that the superovulatory treatment disturbs oocyte maturation and transport. The main objective of the present study was to evaluate the plasmatic concentrations of estradiol, inhibin, FSH and LH in super ovulated mares treated with eFSH and EPE (with constant or decreasing doses): Six mares were used in a crossover experiment in four different groups: Group I mares received 25mg of EPE every twelve hours, Group II received EPE in decreasing doses and Group III mares received 12.5mg of eFSH (IM). Group IV served as control. Embryo flushes were performed 8 days pos ovulation. Blood was collected daily to evaluate hormonal concentrations through radioimmunoassay, starting two days before the first administration, until 48 hours post-ovulation. Mean and daily hormonal concentrations of estradiol, inhibin, FSH and LH were evaluated. Hormonal concentrations were submitted to statistical analysis using ANOVA. Significance levels were set as $P < 0.05$. Mean number of ovulations was 3.3; 4.8; 5.0 and 1.0 in groups 1 to 4, respectively, being higher ($P < 0.05$) in all super ovulated groups, when compared to control. Concentrations of estrogen, inhibin, FSH and LH did not differ between groups during the first period. In period 2, estradiol levels were higher ($P < 0.05$) in mares with superovulatory treatment eFSH (GIII) 29.52pg/ml, the groups GI and GII (GI: 16.75pg/ml, GII: 16.26pg/ml) values intermediary, and GIV (7.78pg/ml) levels lower. A positive correlation between estradiol levels and number of follicles ≥ 30 mm ($R = 0.917$; $P < 0.05$), recovered embryos ($R = 0.945$; $P < 0.05$) and ovulations ($R = 0.75$; $P < 0.05$) was identified in super ovulated mares. A positive correlation ($R = 0.615$; $P = 0.01$) between estradiol and inhibin concentrations was detected. Inhibin levels were higher in super ovulated mares ($P < 0.05$): (GI) 0.53ng/ml, (GII) 0.70ng/ml and (GIII) 1.04ng/ml, (GI) 5.32ng/ml, (GII) in comparison to GIV (0.30ng/ml), being positively correlated to ($R = 0.61$; $P = 0.05$) the number of ovulations in EPE treated groups. During treatment higher FSH concentrations ($P < 0.05$) were identified in GI (16.64ng/ml) and GII (15.12ng/ml), in comparison to GIV (4.42ng/ml). A negative correlation

between FSH concentrations and estradiol was found ($R=0.57$; $P=0.05$). Mean LH levels were higher in EPE treated mares ($P<0.05$). After ovulation, mean LH concentrations obtained were higher ($P<0.05$) in the GI (5.47ng/ml), GII (2.99ng/ml) and GIII (4.64ng/ml) than GIV (2.33ng/ml). Based on the results of the present study we can concluded that superovulatory treatment induced several alterations on hormones profiles some expected and other don't expected. The most intriguing observation was the low periovulatory LH levels.

Key Words: Endocrinological Profiles, Superovulation, Mare, Equine Pituitary Extract, Purified Equine FSH. Equine FSH.



Listas

Lista de Ilustrações

- Figura 1** – Esquema dos ciclos utilizados durante as duas estações reprodutivas (06 ciclos na primeira estação e 04 ciclos na segunda estação de monta utilizada).....59
- Figura 2** – Número de ovulações e embriões recuperados nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GII), eFSH (GIII) e Controle (GIV). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) para ovulações e embriões.....69
- Figura 3** – Perfil das concentrações plasmáticas médias de Estradiol nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GIII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).....72
- Figura 4** – Perfil médio das concentrações plasmáticas de Estradiol durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.....74
- Figura 5** – Perfil das concentrações plasmáticas médias de Inibina nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GIII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).....76
- Figura 6** – Perfil médio das concentrações plasmáticas de Inibina durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.....78
- Figura 7** - Perfil das concentrações plasmáticas médias de FSH nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE

constante (GI), EPE decrescente (GIII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).....80

Figura 8 – Perfil médio das concentrações plasmáticas de FSH durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.....82

Figura 9 - Perfil das concentrações plasmáticas médias de LH nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GIII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).....84

Figura 10 – Perfil médio das concentrações plasmáticas de LH durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.....86

Figura 11 – Perfil hormonal das concentrações plasmáticas diárias de estradiol, progesterona, LH, FSH e inibina de uma égua do GII (eFSH), na qual 71,4% (5/7) de seus folículos pré-ovulatórios não ovularam, formando folículos anovulatórios.....87

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Número de Ovulações, embriões, e recuperação embrionária por ovulação nos grupos: GI (EPE constante), GII (EPE decrescente), GIII (eFSH) e GIV (controle).....70
- Tabela 2** - Percentual de éguas que apresentaram 0 a 2, 3 a 5 e mais de 5 ovulações nos grupos: GI (EPE constante), GII (EPE Decrescente) GIII (eFSH) e GIV (controle).....70
- Tabela 3** – Valores médios diários de estradiol (pg/ml) nos grupos: EPE constante, EPE decrescente, eFSH e Controle, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação 73
- Tabela 4** – Valores médios diários de inibina (ng/ml) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.....77
- Tabela 5** - Valores médios diários de FSH (ng/ml) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.....81
- Tabela 6** – Valores médios diários de LH (ng/ml) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.....85

Lista de Abreviaturas

µg = Microgramas (10^{-6})

µm = Micrometros (10^{-6})

AMPC = Adenilato Monofosfato Cíclico

BID = Duas vezes ao dia

BMP-15 = “Bone morphogenetic protein – 15”

CL = Corpo lúteo

eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina

eFSH = Hormônio Folículo Estimulante Equino

EGF = Fator de Crescimento Epidermal

et al. = Colaboradores

EPE = Extrato de Pituitária Equino

EUA = Estados Unidos da América

FGF = Fator de Crescimento Fibroblástico

FIV = Fertilização *in vitro*

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

GH = Hormônio do Crescimento ou Somatotrofina

GIFT = Transferência intra-falopiana de gametas

GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

hCG = Gonadotrofina Coriônica Humana

ICSI = Injeção intra-citoplasmática de espermatozóide

IGF = Fator de Crescimento semelhante à insulina

IGFBP = Proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina

IGF-1 = Fator de Crescimento semelhante à insulina tipo 1

IM = Intramuscular

IV = Intravenoso

KL = Kit-ligante

LH = Hormônio Luteinizante

MAPK = Proteína quinase ativadora de mitose

MFP = Fator de promoção da maturação

NGF = Fator de crescimento neural

ng = Nanograma (10^{-9})

PAPP-A = Proteína-A plasmática associada à prenhez

pFSH = Hormônio Folículo Estimulante de origem porcina (suína)

pg = Picogramas (10^{-12})

RNA = Ácido ribonucleico

rpm = Rotações por minuto

SCF = Fator de células tronco

SID = Uma vez ao dia

TE = Transferência de embriões

TGF- β = Fator Transformador de Crescimento tipo β

UNESP = Universidade Estadual Paulista

UI = Unidades Internacionais

VEGF = Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Lista de Símbolos

$>$ - maior

$\geq$ - maior ou igual

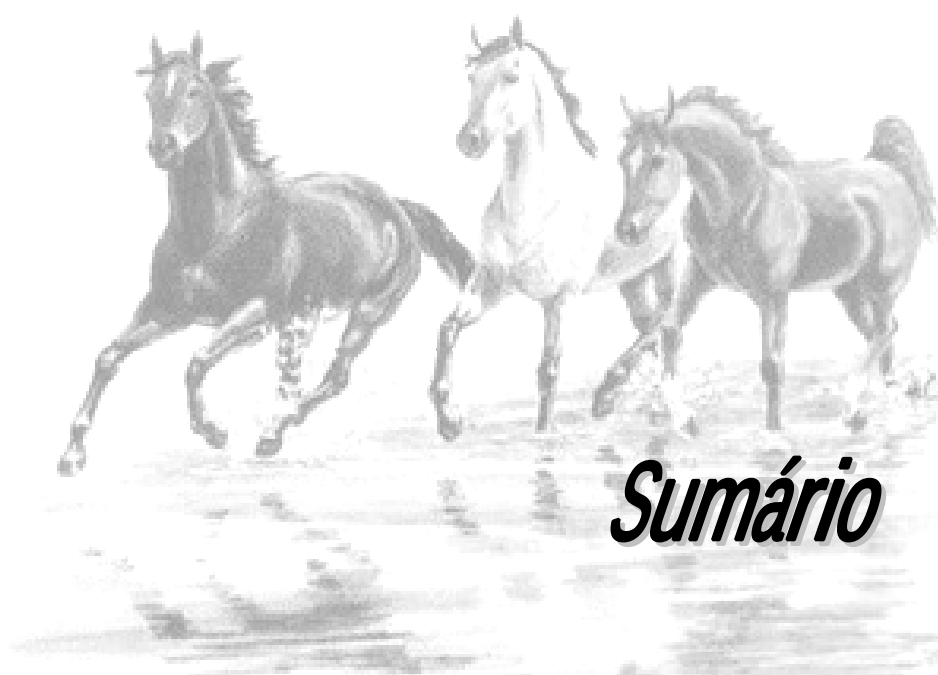
$\pm$ - mais ou menos

® - marca registrada

$<$ - menor

$\leq$ - menor ou igual

% - porcentagem



Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>1.INTRODUÇÃO</i>	<i>25</i>
<i>2. REVISÃO DE LITERATURA</i>	<i>29</i>
2.1 OOGÊNESE	29
2.2 CICLO ESTRAL EQUINO	31
2.2.1 Foliculogênese	32
2.2.2 Dinâmica Folicular	35
2.2.3 Seleção do Folículo Dominante	38
2.3 SUPEROVULAÇÃO.....	43
2.3.1 Resposta superovulária e fatores envolvidos	44
2.3.2 Distúrbios da Superovulação	49
<i>3. MATERIAIS E MÉTODO</i>	<i>58</i>
3.1 ANIMAIS	58
3.2 PREPARO DO EPE.....	60
3.3 FSH EQUINO PURIFICADO	61
3.4 TRATAMENTOS	61

3.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA.....	63
3.6 AMOSTRAS DE SANGUE E ENSAIOS HORMONAIS	64
3.7 AVALIAÇÃO DOS DADOS	66
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
 4. <i>RESULTADOS</i>	 69
4.1 NÚMERO DE OVULAÇÕES E EMBRIÕES	69
4.2 CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE ESTRADIOL.....	71
4.3 CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE INIBINA	75
4.4 CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE FSH	79
4.5 CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE LH.....	83
4.6 PERFIL HORMONAL DE ÉGUA COM FOL. ANOVULATÓRIOS	87
 5. <i>DISCUSSÃO</i>	 89
 6. <i>CONCLUSÕES</i>	 101
 7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	 103



Introdução

1. INTRODUÇÃO

As éguas são classificadas como animais mono-ovulatórios, havendo, normalmente, a fertilização de apenas um ovócito por ciclo estral. Isto é compatível com as características do trato reprodutivo da espécie, já que o útero eqüino dificilmente comporta gestações envolvendo mais de um conceito. Todavia, com o advento de biotecnologias como a transferência de embriões, ovulações múltiplas têm sido almejadas, já que estas permitem que mais de um embrião seja recuperado de um único ciclo, aumentando a eficiência da técnica com conseqüente queda dos custos. Dá-se o nome de superovulação à manipulação do ciclo estral a fim de incrementar o número de ovulações.

Fisiologicamente, a partir de um grande grupo de folículos em desenvolvimento pré-antral, um número característico para a espécie é selecionado, ocorrendo o estabelecimento da dominância de determinados folículos sobre os subordinados do grupo. O mecanismo pelo qual cada espécie determina o número de folículos que irá se desenvolver e ovular não se encontra completamente elucidado até o presente momento. O tratamento superovulatório visa estimular folículos em uma onda folicular que não estariam designados a ovular. Isto ocorre através do recrutamento de um elevado número de folículos em uma onda, os quais são estimulados para continuar seu desenvolvimento até a liberação do ovócito.

A foliculogênese, definida como o processo dinâmico caracterizado pela proliferação e diferenciação de componentes somáticos do folículo, tem sido alvo incessante de estudo, já que é responsabilidade do folículo proporcionar um ambiente adequado para o desenvolvimento e maturação do ovócito, preparando-o

para a futura fertilização. Apesar dos reguladores primários da foliculogênese serem as gonadotrofinas, controlando o desenvolvimento folicular pela via endócrinas clássicas, existem mecanismos intra-ovarianos que apresentam suma importância no controle do desenvolvimento folicular. Desta forma, a foliculogênese é regulada por uma relação complexa entre esteróides intra-foliculares, fatores extra-ovarianos, de crescimento e outros constituintes do sistema de retro-alimentação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. A ocorrência de falhas no tempo correto e na sequência exata em cada uma destas etapas irá resultar na deterioração e atresia foliculares ou na não fertilização do ovócito após sua liberação.

A superovulação tem sido um grande desafio dentro da reprodução animal, em especial se tratando da espécie eqüina. Há aproximadamente três décadas, vários trabalhos foram realizados e alguns produtos avaliados na tentativa de promover uma resposta superovulatória consistente e uma menor variação na quantidade de embriões recuperados. Por mais que a grande maioria das éguas responda ao tratamento superovulatório com o desenvolvimento de bom número de folículos, a quantidade de embriões recuperados está muito aquém do esperado. Sabe-se atualmente que alguns fatores contribuem para este impasse em éguas superovuladas, alterações na qualidade do ovócito e a formação de grandes coágulos obstruindo a fossa de ovulação, dificultando a captação do ovócito pelo oviduto. Alterações essas provavelmente induzidas por modificações no perfil endócrino de animais superovulados como reportado em vários estudos.

O melhor entendimento das alterações endócrinas faz-se necessário para a adequação de um protocolo superovulatório na espécie eqüina, visando uma melhoria na produção de embriões. Da mesma forma, sua compreensão poderia

explicar o motivo pelo qual ocorre grande variação tanto na resposta superovulatória quanto na recuperação embrionária frente ao emprego de diferentes hormônios, doses e frequências de tratamento. Estudos em bovinos demonstraram haver alterações nos níveis séricos de determinados hormônios em consequência do tratamento superovulatório, ocasionando distúrbios na maturação folicular e oocitária. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos similares na espécie eqüina.

Acreditamos, em função do exposto, que éguas tratadas com Extrato de Pituitária Eqüina ou FSH eqüino purificado apresentam diferentes alterações no perfil hormonal que podem interferir no processo de maturação folicular e ovocitaria.



2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Oogênese

A formação dos oócitos (oogênese) ocorre durante a vida fetal, sem que ocorra aumento em seu número após o nascimento da fêmea. Os gonócitos ou células germinativas primordiais se originam do endoderma do saco vitelínico primitivo, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônia e multiplicam-se através de divisões mitóticas (Van Den Hurk *et al.*, 1997).

Durante o desenvolvimento fetal, a proliferação de células germinativas primordiais ocorre por mitose e meiose no córtex ovariano. A multiplicação das oogônias por mitose se inicia no 50º dia de gestação até, aproximadamente, o 150º-160º dia. O processo de divisão meiótica se inicia durante o período compreendido entre 75 e 80 dias de gestação até o 160º dia, com a sua transformação em oócitos primários, os quais permanecem na fase de diplóteno da prófase I. Esta é também denominada dictióteno ou vesícula germinativa (VG) da primeira prófase meiótica, assim permanecendo até o início da puberdade (Picton, 2001).

Os oócitos primários apresentam-se envoltos por uma estreita camada de células da granulosa de aspecto achatado, sem zona pelúcida, formando os folículos primordiais. Neste estágio, os folículos não são dotados de suprimento sanguíneo próprio: suas células se nutrem através da difusão (Van Den Hurk *et al.*, 1997). Durante a vida fetal estes oócitos são selecionados através da atresia de um número substancial destes gametas, sendo a maior incidência de folículos atróficos encontrada por volta do 100º dia de gestação (Pierson, 1990).

Durante o desenvolvimento de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), além da diferenciação nuclear, há aumento progressivo do número de organelas, formação dos grânulos corticais e desenvolvimento de zônulas de oclusão entre o ovócito e as células da granulosa. Nos folículos secundários, com mais de duas camadas de células da granulosa, observa-se ao redor do ovócito a formação de uma estrutura homogênea, acelular e rica em glicoproteínas, denominada zona pelúcida (Van Den Hurk *et al.*, 1997).

A retomada das divisões meióticas ocorre na puberdade durante o processo ovulatório, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) (Dekel *et al.*, 1988). A maturação nuclear do ovócito evolui até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (ovócito secundário) momentos antes da ovulação. Goudet *et al.* (1998) afirmam que, em eqüinos, a segunda divisão meiótica ocorre somente na presença da proteína Quinase ativadora da maturação (“Mitogen activated protein kinase” – MAPK), a qual ativa o Fator promotor da maturação (“Maturation-promoting factor” – MFP). Sabe-se que o MFP se trata de um potente regulador da atividade microtubular, estando envolvido nos processos de descondensação da cromatina oocitária (Moos *et al.*, 1996).

A segunda divisão meiótica se completa somente após a fertilização (zigoto), com a extrusão do segundo corpúsculo polar e a formação dos prónucleos feminino e masculino. Todas as fases da maturação oocitária são dependentes de um minucioso controle. Activina, inibina e fatores de crescimento: transformantes- β (TGF- β), epidermais (EGF), fibroblásticos (FGF), epiteliais vasculares (VEGF) e neurais (NGFs) são apontados como importantes reguladores do desenvolvimento folicular (Findlay, 1994; Monniaux *et al.*, 1997; Van Den Hurk *et al.*, 1997). Falhas

nestes mecanismos devido a alterações na secreção de hormônios ou fatores podem acarretar em insucessos na fertilização.

2.2 Ciclo estral eqüino

As éguas são animais poliéstricos sazonais, cujos ciclos estrais duram, em média, 21 a 22 dias. Pode-se dividir didaticamente estes ciclos em duas fases distintas: o estro e o diestro (Hughes *et al.*, 1972; Sharp, 1980). Durante o estro, a égua apresenta-se receptiva ao garanhão devido ao predomínio do estrogênio (Clayton *et al.*, 1981), cujas fontes são as células da granulosa de folículos ovarianos. Esta fase compreende em média sete dias (Brinsko & Varner, 1993), apresentando grande variação quanto a sua duração (Pierson & Ginther, 1985).

Já a fase seguinte, denominada de fase lútea ou diestro, possui um período mais definido, de 14 a 15 dias. Caracteriza-se pela presença de um corpo lúteo, o qual surge mediante a ocorrência de uma ovulação (Back *et al.*, 1974). Este evento se sucede, na maioria das vezes, 24 a 48 horas antes do término do estro, culminando com a liberação do ovócito e sua captação pela tuba uterina (Blanchard *et al.*, 2003).

No diestro ocorre a produção de progesterona pelo corpo lúteo, e, mesmo que haja folículos em desenvolvimento secretando estrogênio, há predomínio desse progestágeno, o qual imprime suas características sobre o trato reprodutivo feminino e o comportamento da égua de rejeição ao garanhão (Back *et al.*, 1974). Em suma, a duração média do estro, diestro e do ciclo estral é de respectivamente sete, 15 e 22 dias nas éguas e oito, 16 e 24 dias em pôneis (Ginther, 1992), cuja duração das fases é um pouco maior (Turner *et al.*, 1979).

2.2.1 Foliculogênese

Folículos primordiais, primários e secundários são referidos coletivamente como folículos pré-antrais (Pierson, 1990). Os folículos primordiais são simples, tratando-se de um ovócito envolto por apenas uma camada de células pavimentosas da pré-granulosa. Nos folículos primários as células da granulosa adotam formato cilíndrico, havendo desenvolvimento gradativo do ovócito e de sua zona pelúcida. Nos secundários, os quais possuem mais de duas camadas de células cúbicas da granulosa, observa-se ao redor do ovócito a formação da zona pelúcida: uma estrutura homogênea, acelular e rica em glicoproteínas (Van Den Hurk *et al.*, 1997).

O desenvolvimento desse grupo de folículos pode ser dividido em três estádios distintos: ativação de folículos primordiais, transição de folículo primário para secundário e desenvolvimento de folículos secundários até o estágio pré-antral (Fortune, 2003). Os mecanismos que regulam estes processos não estão totalmente elucidados. Seu entendimento possibilitaria a utilização da reserva de folículos primordiais, incrementando o número de ovulações e a eficiência reprodutiva em animais de produção, como eqüinos e ruminantes (Fortune, 1994).

As gonadotrofinas (LH e FSH) são glicoproteínas de origem adenohipofisária, as quais possuem sua secreção, síntese e liberação controladas pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH): um decapeptídico produzido pelo hipotálamo que atua no eixo hipotálamo-hipofisário (Ginther, 1992). Estudos têm indicado que o desenvolvimento folicular pré-antral independe de estímulo gonadotrófico agudo, e que mecanismos parácrinos de controle desempenham importante papel nesta fase (Gong *et al.*, 1996). Entretanto, receptores do hormônio folículo estimulante (FSH) foram detectados em folículos primários de vacas, tendo sido observado aumento do

crescimento folicular pré-antral após adição de FSH ao meio de cultivo, sugerindo o papel coadjuvante do FSH no controle do estágio pré-antral (Gutierrez *et al.*, 2000). Com o desenvolvimento de estudos *in vitro*, foi determinado que o FSH e o dibutilil adenilato monofosfato cíclico (AMPC) estimulam o crescimento folicular e a formação do antro de folículos pré-antrais maiores ou iguais a 140 micrometros (μm) em camundongos (Hartshorne *et al.*, 1994). Uma elevação na concentração plasmática de FSH se trata do estímulo necessário para o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular (Adams *et al.*, 1992; Fortune, 1994).

Os efeitos potenciais do LH durante a fase pré-antral ainda são pouco conhecidos. Ao que parece, a ação do LH é essencial em folículos antrais na seleção, maturação final do ovócito, ovulação e luteinização (Hyttel *et al.*, 1991; 1997).

Vários peptídeos intra-ovarianos têm sido apontados como importantes reguladores do desenvolvimento folicular na fase pré-antral e início da fase antral, dentre eles: activina e inibina, fatores de crescimento epidermais, fibroblásticos, semelhantes à insulina (IGF) e transformantes- β , fatores de células-tronco (SCF ou kit-ligante: KL) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) (Monniaux *et al.*, 1997; Mihm *et al.*, 2000; Juengel *et al.*, 2004).

Outros hormônios desempenham importante papel no início da foliculogênese. A relação do hormônio do crescimento (GH) é positiva no desenvolvimento de folículos pré-antrais médios. Sua ausência provoca uma redução na quantidade de folículos pré-ovulatórios que se desenvolvem, bem como nas taxas de ovulação (Zaczek *et al.*, 2002). Deficiências que envolvam os

receptores para GH levam à reduções nos níveis circulantes do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1).

Os efeitos do IGF-1 em folículos pré-antrais são pouco conhecidos. Estudos em camundongos sugerem que este fator não se faz necessário até o desenvolvimento de folículos antrais (Baker *et al.*, 1996). Em eqüinos, foi comprovado que a concentração de IGF-1 é maior no futuro folículo dominante e que sua presença estimula a produção de estradiol (Ginther *et al.*, 2004a).

Os esteróides atuam de forma positiva no desenvolvimento folicular pré-antral, incluindo ação em folículos primários. A presença de estradiol está relacionada ao crescimento das células da granulosa em tamanho, atuando em sinergismo com o FSH, que estimula a replicação destas células (Hulshof *et al.*, 1995).

Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro quando atingem 300µm de diâmetro, o qual é preenchido por um fluído viscoso composto por hormônios esteróides, principalmente estradiol, progesterona e inibina. Concomitantemente, há a formação de uma bainha de células ao redor da granulosa, denominadas células da teca, que constituem duas camadas: a teca externa, composta por tecido conjuntivo e a teca interna, constituindo a camada vascularizada interna. Ocorre nova proliferação das células da granulosa, as quais se organizam em várias camadas ao redor do ovócito formando o “cumulus oophorus” (Hafez & Hafez, 2000).

Os folículos pré-antrais adquirem receptores para LH nas células da teca e para FSH nas células da granulosa. Sob o estímulo do LH, as células da teca

produzem andrógenos, que ultrapassam a lâmina basal até chegarem ao antro. Durante a passagem pela camada granulosa, e sob a influência de FSH, ocorre a aromatização dos andrógenos em estrógenos (Pierson, 1990). Os eventos supracitados marcam a transição de folículo secundário para terciário, o qual iniciará novo desenvolvimento até ser eleito à ovulação (Hafez & Hafez, 2000).

2.2.2 Dinâmica Folicular

Na década de oitenta, a dinâmica folicular e o intervalo interovulatório foram avaliados com maior precisão através da obtenção de imagens ovarianas por meio da ultra-sonografia trans-retal. Este instrumento permitiu, de maneira não invasiva, o acompanhamento e a visualização da dinâmica folicular, bem como dos processos de ovulação, desenvolvimento, manutenção e regressão do corpo lúteo (Ginther, 1986; Ginther *et al.*, 1988). Estudos ultra-sonográficos não só confirmaram trabalhos prévios enfocando a foliculogênese realizados pelo método da palpação retal (Ginther, 1992), como estenderam as pesquisas, possibilitando o acompanhamento de folículos menores, entre dois e dez milímetros (mm) de diâmetro (Ginther & Bergfelt, 1993).

A foliculogênese é o processo pelo qual folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para ovulação. O número de folículos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno. Estima-se que aproximadamente 99% sofrem atresia (Webb *et al.*, 1999).

O rastreamento de folículos individuais pela ultra-sonografia estabeleceu que o desenvolvimento folicular transcorre em ondas na espécie eqüina (Sirois *et al.*, 1989; Bergfelt & Ginther, 1993), da mesma forma que na bovina, cuja fêmea também

é mono-ovulatória (Ginther *et al.*, 1996). Cada onda folicular é caracterizada pela presença de um folículo dominante e diversos folículos subordinados.

Na vaca, pode-se detectar consistentemente uma ou duas ondas foliculares grandes durante o ciclo estral (Ginther *et al.*, 2004a). A maioria das éguas apresenta uma onda maior, a qual emerge durante a metade tardia do diestro. Nesta, ocorre um aumento transitório na população folicular e se origina o folículo ovulatório (Ginther, 1994, Ginther *et al.*, 2004a). Ginther (1995) verificou através de avaliação ultra-sonográfica um aumento na população folicular (>10mm) nesta fase, seguida sete a oito dias depois pelo continuado crescimento do maior folículo e na redução (ou parada) do crescimento dos demais.

Algumas éguas apresentam duas ondas maiores durante o ciclo estral. Geralmente, em raças como o Quarto de Milha e pôneis se identifica somente uma onda maior, enquanto que no Puro Sangue Inglês comumente se observa uma segunda onda (Ginther, 2000). Dá-se o nome de onda primária àquela que induz a ovulação primária (ovulação no estro). Quando da ocorrência de outra onda, durante o final do estro ou início do diestro, esta é denominada de onda secundária (Ginther, 1992). De acordo com Bergfelt (1998), esta pode ser detectada em 29 a 42% dos ciclos. Durante a onda secundária, pode ocorrer o surgimento de um folículo dominante anovulatório (>20mm) ou uma ovulação de diestro. O folículo é denominado, neste caso, de folículo secundário (Ginther, 2000).

Na maioria das ondas, há um crescimento paralelo entre os dois maiores folículos dentro da população ovariana. Este desenvolvimento comum entre ambos cessa quando o folículo destinado a se tornar dominante chega a 22,5mm de diâmetro, o que ocorre, em média, seis dias após a emergência (Gastal *et al.*, 1997).

O futuro folículo dominante cresce até o tamanho pré-ovulatório (maior ou igual a 30mm de diâmetro), enquanto o maior folículo subordinado, o qual mede por volta de 19mm, inicia sua regressão.

A este fenômeno dá-se o nome de desvio folicular (Ginther *et al.*, 2003; 2004a). Situação semelhante ocorre em mulheres, para que apenas um folículo seja capaz de ovular durante um determinado ciclo (Ginther *et al.*, 2004b). Este mecanismo de seleção folicular é extremamente importante na espécie eqüina, já que o útero da fêmea não comporta mais de um conceptoto simultaneamente (Ginther & Griffin, 1994). O mecanismo da divergência tem por função impedir o crescimento contínuo do futuro folículo subordinado, já que o mesmo é capaz de se tornar dominante, como indicado nos estudos envolvendo aspiração do folículo dominante em vacas e éguas (Ginther, 2000).

As primeiras duas ondas são consideradas as mais importantes, pois nestas surgem folículos dominantes. Ondas menores podem levar ao desenvolvimento de folículos medindo entre 22 e 27mm de diâmetro, sem que haja o estabelecimento da dominância folicular (Bergfelt & Ginther, 1993; Ginther, 1993).

A identificação dos folículos em crescimento de uma onda principal pode ser confundida com a regressão dos demais, originados em outras ondas, dificultando o estudo do desenvolvimento individual de determinados folículos em uma onda. Adicionalmente, pode haver o recrutamento de um grande número de folículos. Estes fatores dificultam substancialmente o acompanhamento ultra-sonográfico de folículos cujos tamanhos são inferiores a 15mm. Por esta razão, o rastreamento individual do folículo, durante cada exame ultra-sonográfico, têm sido conduzido

rotineiramente em folículos que apresentam tamanho maior ou igual a 15mm (Sirois *et al.*, 1989; Ginther, 1990; Bergfelt & Ginther, 1993).

O exame ultra-sonográfico das ondas foliculares têm utilizado o agrupamento dos folículos de acordo com o seu diâmetro (Pierson & Ginther, 1987), mensurado os dois maiores folículos (Pierson & Ginther, 1987; Ginther *et al.* 2003) e determinado as características das ondas por variações estatísticas nessa variável (Ginther & Bergfelt, 1992). A avaliação do desenvolvimento folicular pode ser realizada através de seu agrupamento em fileiras de seis folículos (Ginther & Bergfelt, 1993). Foram descritos, ainda, como métodos alternativos para avaliação das ondas foliculares em éguas: a remoção do folículo ovulatório, com o objetivo de se estudar o período até o desenvolvimento de outro folículo com características ovulatórias (Sirois *et al.*, 1989), bem como a identificação do período em que o folículo não responde mais a estímulos (Pierson & Ginther, 1990).

2.2.3 Seleção do Folículo Dominante

A elucidação do mecanismo de divergência ou seleção do folículo dominante se faz necessária para que ocorra o desenvolvimento de métodos mais eficazes de superovulação. Em espécies mono-ovulatórias, há a seleção de um folículo da onda folicular, o qual irá adquirir a dominância, enquanto outros se tornam subordinados e regridem. Antes do estabelecimento desta dominância, outros folículos em crescimento são capazes de se desenvolverem e se tornarem dominantes, como demonstrado em estudos de superovulação em éguas (Woods & Ginther, 1982), vacas (Ginther *et al.*, 1996) e também em mulheres (Fauser & Heusden, 1997).

Demonstrou-se que, em bovinos, outros folículos são capazes de se tornarem dominantes se o maior folículo for eliminado nos períodos entre a emergência e logo após o início da divergência (Adams *et al.*, 1993). Estes resultados indicam que a designação do folículo dominante não acontece antes da fase de divergência ou desvio, e que o folículo dominante atua de maneira significativa no estabelecimento da subordinação folicular.

Em éguas que ciclam normalmente, há duas ondas de FSH: a primeira, durante ou logo após a ovulação e a segunda, no meio do diestro, passados dez dias (Handler & Aurich, 2005). O futuro folículo dominante é apto a utilizar baixas concentrações de FSH para seu crescimento e desenvolvimento, devido a um aumento na expressão de receptores para este hormônio (Webb *et al.*, 1999). O início da divergência ocorre quando há um decréscimo desta gonadotrofina durante o diestro, podendo ser abolido através da aplicação de FSH exógeno (Adams *et al.*, 1993) e da manutenção de altas concentrações endógenas de FSH, regulando-se a atuação da inibina (McKinnon *et al.*, 1992; McCue *et al.*, 1993). Isto faz com que a divergência seja completamente impedida ou ao menos adiada, podendo resultar no desenvolvimento de mais de um folículo dominante.

Desde o pico da onda de FSH até o início da divergência, todos os folículos contribuem para o decréscimo do FSH, como demonstrado pela manipulação de seu número (Donadeu & Ginther, 2001). De acordo com estes autores, isto ocorre pelo *feedback* negativo exercido pela inibina e estrógeno, ambos de origem folicular, sobre o FSH. Estudos anteriores demonstraram que o estradiol obtido de fluido folicular é capaz de suprimir as concentrações de FSH circulantes (Bergfelt & Ginther, 1986).

Conforme Ginther et al. (2001), a magnitude do declínio de FSH é proporcional ao número de folículos maiores a 13mm de diâmetro do início do declínio do FSH até o final da fase de crescimento paralelo dos dois maiores folículos da onda. As menores concentrações de FSH são observadas durante o início do estro (Handler & Aurich, 2005).

A inibina é um hormônio protéico produzido pelas células da granulosa folicular, possuindo um efeito específico ao regular a secreção de FSH (Ginther, 1992). A principal fonte de inibina é o folículo dominante, e seu efeito depressor sobre as concentrações de FSH é necessário para a inibição do crescimento e atresia dos folículos subordinados durante a onda folicular (Squires & Seidel, 1995; McCue, 1996, Donadeu & Ginther, 2001). Por esta razão, imunizações ativas contra este hormônio são capazes de incrementar as taxas de ovulação (McKinnon *et al.*, 1992; McCue *et al.*, 1993, Nambo *et al.*, 1998).

Em éguas, a concentração circulatória de inibina imunoreativa é alta durante a fase folicular e baixa durante a fase luteal (Roser *et al.*, 1994). De acordo com Nagamine et al. (1998), a concentração circulatória de inibina imunoreativa é maior durante o crescimento folicular, diminuindo quando a onda de LH se inicia, aumentando, novamente, durante o breve período da ovulação.

As concentrações circulantes de estrógeno na égua atingem seus valores máximos dois dias antes da ovulação ou três dias antes do pico de LH (Ginther *et al.*, 2004). Suas concentrações começam a aumentar 1 a 2 dias antes do início da divergência folicular (Gastal *et al.*, 2000), atingindo o pico dois dias antes da ovulação, quando o folículo pré-ovulatório mede aproximadamente 35mm (Ginther *et al.*, 2004b).

De acordo com o estágio do ciclo estral, o estrógeno é capaz de exercer um efeito positivo ou negativo sob a síntese de LH (Lindzey *et al.*, 2006). Em éguas, foi inicialmente concluído que o pico ovulatório de LH é estimulado pelo “feedback” positivo do estradiol (Baldwin *et al.*, 1991). Administrações diárias de estradiol resultaram na elevação das concentrações circulantes de LH em éguas ovariectomizadas (Garcia & Ginther, 1978; Thompson *et al.*, 1991), bem como em animais intactos (Burns & Douglas, 1981). Mais recentemente, Sharp *et al.* (2001) detectaram que administração de estrogênio a éguas ovariectomizadas estimulou a expressão do ácido ribonucléico (RNA) do tipo mensageiro, que transcreve as subunidades de LH na pituitária. Em vacas, formulações contendo estradiol se prestam à indução de ovulações, sendo rotineiramente empregadas nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (Barros *et al.*, 2000).

Todavia, o real papel do estrógeno sobre os níveis de LH na égua não foi completamente elucidado. Sabe-se que a concentração de LH aumenta lentamente até que ocorra o pico de estrógeno, sofrendo rápido e substancial incremento na medida em que as concentrações deste hormônio esteróide diminuem (Ginther *et al.*, 2006). Recentemente, Ginther *et al.* (2007) demonstraram que o estrógeno age inibindo as concentrações de LH na égua, sendo este efeito dose-dependente. Estes resultados justificam os obtidos por Fleury *et al.* (2004) que, ao administrarem o cipionato de estradiol associado ou não à deslorelina, detectaram que este hormônio esteróide aumentou o intervalo até a ovulação em éguas com folículos maiores ou iguais a 30mm.

Em bovinos e eqüinos, a expressão de receptores para LH próximo à fase de divergência é maior no “futuro” folículo dominante do que nos outros folículos (Evans

& Fortune, 1997; Ginther *et al.*, 2003). Bodensteiner *et al.* (1996) descreveram que a alteração na dependência gonadotrófica do folículo dominante é um dos fatores fundamentais para a seleção folicular.

A elevação passageira de LH plasmático ocorre durante a divergência, iniciando-se um a dois dias antes de sua ocorrência, como parte da onda ovulatória de LH (Gastal *et al.*, 1997; 2000; Bergfelt *et al.*, 2001). Esta onda é prolongada na espécie eqüina: ocorre no início do estro, seis a sete dias antes da ovulação, alcançando o pico um a dois dias após sua ocorrência (Whitmore *et al.*, 1973; Geschwind *et al.*, 1975).

Sabe-se da participação decisiva de fatores de crescimento produzidos localmente no processo de seleção do folículo dominante (Monniaux *et al.*, 1997). Em éguas, antes da fase de divergência, ocorre aumento de IGF-1. O estradiol, a inibina e a activina se elevam apenas após a divergência ter se iniciado, o que sugere que o fator intra-ovariano mais importante durante essa fase é o IGF-1 (Ginther *et al.*, 2003).

O aumento no FSH circulante leva a um aumento da protease PAPP-A (proteína-A plasmática associada à prenhez), a qual cliva as proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) (Spicer *et al.*, 2001). Desta forma, há um aumento na quantidade de IGF livre no interior do folículo. Este fator, em sua forma livre, possui bioatividade, estimulando o crescimento da granulosa folicular e a produção de estrógeno em sinergismo com o FSH. Em estudo recente, a injeção de IGF-recombinante foi capaz de estimular o desenvolvimento da dominância no segundo maior folículo da onda durante o início da divergência (Ginther *et al.*, 2008), demonstrando o papel essencial exercido por este fator.

2.3 Superovulação

A indução de múltiplas ovulações em éguas se trata de uma alternativa para aumentar a recuperação embrionária e, conseqüentemente, reduzir os custos associados à transferência de embriões (TE). Isto é especialmente interessante pelo fato da égua se tratar de um animal mono-ovulatório (Ginther, 1992). O tratamento superovulatório tem por objetivo recrutar um maior número de folículos de uma determinada onda, estimulando seu desenvolvimento e ovulação (Meira & Buratini, 1998).

A superovulação auxilia na obtenção de resultados favoráveis em éguas inseminadas com sêmen congelado e/ou de baixa fertilidade quanto à recuperação embrionária (McCue, 1996). De acordo com este autor, a estimulação de múltiplos folículos pode aumentar a eficiência da coleta de oócitos para fins de fertilização *in vitro* (FIV), transferência intra-falopiana de gametas (GIFT) e injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (ICSI).

O principal desafio a ser vencido pelo tratamento superovulatório é estimular e manter o desenvolvimento de folículos que, durante um ciclo normal, sofreriam com a inibição de seu crescimento e subsequente atresia (Pierson & Ginther, 1990). Desta forma, os tratamentos superovulatórios baseiam-se na disponibilização de quantidades suficientes de FSH para o crescimento folicular, quer pela administração direta desta gonadotrofina contida nos preparados ou por meio do aumento de suas concentrações endógenas, através da imunização contra a inibina, plasma anti-inibina ou da administração de GnRH.

O EPE (Extrato de Pituitária Eqüina) é um preparado parcial de gonadotrofina eqüina, o qual possui tanto o FSH quanto o LH em sua composição, tendo sido um dos primeiros hormônios utilizados na superovulação (Douglas, *et al.* 1974). As concentrações de LH no EPE são variáveis, comprometendo parcialmente a repetibilidade dos resultados com sua utilização (Alvarenga *et al.*, 2001; Scoggin *et al.*, 2002).

Estudos têm obtido sucesso, de maneira bem similar, através do uso do Hormônio Folículo Estimulante Eqüino Purificado (eFSH) (Squires, 2003; Niswender *et al.*, 2004). Tanto o EPE quanto o eFSH estão disponíveis comercialmente, sendo utilizados pela via intramuscular (IM). Entretanto, a terapia com eFSH possui, comparativamente, maior custo em relação ao EPE (Carmo, 2003).

2.3.1 Resposta superovulatória e fatores envolvidos

A resposta de éguas cíclicas ao eFSH e ao EPE depende da população ovariana de folículos no início do tratamento, sendo que o momento ideal para se iniciar um programa superovulatório é no início da onda folicular, antes do aparecimento de um folículo dominante. De acordo com Dippert *et al.* (1992) e Scoggin *et al.* (2002), as melhores respostas superovulatórias podem ser obtidas quando o tratamento se inicia entre o quinto e o sétimo dia pós-ovulação.

Machado *et al.* (2003) observaram uma correlação positiva entre a população de folículos de 16 a 20mm de diâmetro 48 horas após o início do tratamento e o número de ovulações nos grupos tratados com EPE e eFSH. De acordo com os autores, faz com que se possa estimar a resposta superovulatória pela avaliação da população folicular durante o início do tratamento. As melhores respostas

superovulatórias obtidas por Carmo (2003) ocorreram quando, neste momento, as éguas apresentavam folículos ovarianos variando entre 10 e 20mm. Em estudo recente envolvendo aspiração folicular, verificou-se que o diâmetro ideal para que se inicie o tratamento superovulatório é de 20 a 23mm (Orlandi *et al.*, 2006).

Outro fator que afeta a resposta superovulatória é a frequência de administração. Duas aplicações diárias a cada 12 horas (BID) são mais eficientes em aumentar a taxa de ovulação e a recuperação embrionária do que somente uma (Squires, 2003). Estudos realizados por Alvarenga *et al.* (2001) e Scoggin *et al.* (2002) demonstraram uma melhora no percentual de ovulações múltiplas (4 a 7 ovulações por ciclo) em éguas superovuladas com a administração de 25mg de EPE (BID). Contudo, ambos obtiveram taxas de recuperação embrionária insatisfatórias, tendo sido levantada a hipótese de que as altas concentrações de LH no EPE possam estar envolvidas neste entrave (Alvarenga *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2003).

Carmo (2003) comparou doses constantes e decrescentes de EPE na indução de superovulação em éguas. O uso de doses decrescentes objetivou reduzir as concentrações de LH exógeno próximas ao momento ovulatório. O tratamento foi iniciado no sétimo dia pós-ovulação (D7), utilizando éguas em cujos ovários havia um corpo lúteo (CL) e somente folículos ≤ 25 mm de diâmetro. As aplicações eram interrompidas quando a maioria dos folículos atingia 35mm de diâmetro, momento em que era aplicado 3000 unidades internacionais (UI) de gonadotrofina coriônica humana (hCG) pela via endovenosa (IV) com o intuito de induzir a ovulação. Ao Grupo 1 (G1: doses constantes), foram administrados 25mg de EPE, BID. As éguas do Grupo 2 (G2: doses decrescentes) receberam, seguindo-se a mesma frequência

de aplicação, EPE nas doses de 40mg, 35mg, 30mg, 25mg, 20mg, 15mg e 10mg, respectivamente, no primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo dia de tratamento. Concluiu-se que a utilização de doses decrescentes de EPE proporcionou uma melhora numérica, embora não significativa, de ovulações e de embriões recuperados (G1: 3,5 e 1,2; G2: 5,0 e 1,8, respectivamente).

De acordo com Woods & Ginther (1983), a indução da ovulação se faz necessária somente para que as ovulações sejam sincronizadas, sem que haja alterações na taxa de ovulação mediante o seu emprego. Dippert et al. (1994) afirmam que os melhores resultados de sincronização são obtidos quando se realiza a indução antes da primeira ovulação do ciclo tratado.

O hormônio empregado influencia a resposta superovulatória. Os primeiros relatos da utilização de FSH para indução de múltiplas ovulações em éguas se referem ao uso do Hormônio Folículo Estimulante de origem porcina (pFSH), devido a sua ampla disponibilidade. Em síntese, a administração desta gonadotrofina duas vezes ao dia, durante a metade ou o final do diestro até o início do estro, forneceu resultados pouco satisfatórios no que diz respeito à taxa de ovulação e ao número de éguas apresentando mais de uma ovulação por ciclo estral. Além de produzir uma resposta bem inferior à obtida na espécie bovina, trata-se de um método oneroso por requerer administração de elevadas doses – cerca de 70 vezes mais do que o necessário para superovular vacas – sendo, portanto, de aplicabilidade restrita (Squires *et al.*, 1986; Hofferer *et al.*, 1991; Fortune & Kimmich, 1993).

Resultados inconsistentes foram igualmente relatados com o uso da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Allen, 1982), do GnRH (McCue, 1996) e do FSH recombinante humano. Apesar de respostas superovulatórias interessantes

tenham sido obtidas com éguas imunizadas contra inibina (McKinnon *et al.*, 1992; McCue *et al.*, 1993), seu uso é limitado em decorrência de relatos de choque anafilático e abscessos no local de administração.

Na tentativa de melhorar a resposta superovulatória em éguas, Alvarenga *et al.* (2003) realizaram um experimento com o eFSH, uma vez que, desta forma, retira-se o efeito negativo da presença de LH no EPE. Em seu estudo, foi utilizado o seguinte protocolo: no D7, aplicou-se uma dose de luteolítico, sendo iniciado o tratamento com eFSH (eFSH® - Bioniche Animal Health Inc., Canadá, 12 mg, BID). O tratamento era interrompido quando pelo menos metade dos folículos em desenvolvimento atingisse 35mm de diâmetro, momento em que se administrava 3000UI de hCG (IV). Inseminações artificiais eram diariamente conduzidas, da administração do indutor até a última ovulação. A duração do tratamento não excedeu, neste estudo, oito dias. Um maior número de ovulações (4,0 contra 1,0) e de embriões (2,0 contra 0,6) por ciclo foi obtido no grupo tratado, sendo todos os embriões recuperados classificados como viáveis.

Os resultados deste trabalho quanto ao número de ovulações foram próximos aos de Rosas *et al.* (1998), os quais utilizaram 25mg de eFSH uma vez ao dia (SID) e obtiveram 4,6 ovulações por ciclo no grupo tratado, contra 2,0 no controle. Estes estudos concluíram que o uso do eFSH aumenta a eficiência e a rentabilidade de programas de TE em eqüinos, sendo satisfatório em termos econômicos por garantir, ao menos, um embrião por lavado.

A fim de comparar a resposta superovulatória do EPE e do eFSH, Machado (2004) avaliou os mesmos dois protocolos de EPE (doses constantes e decrescentes) utilizados por Carmo (2003), bem como o emprego de eFSH (12,5mg,

IM, BID). Os tratamentos foram iniciados no D7, interrompidos quando a maioria dos folículos atingisse tamanho $\geq 35\text{mm}$, momento em que se administrou 3000UI de hCG (IV). Neste estudo, o número de ovulações por égua foi similar entre os tratamentos superovulatórios. Contudo, a quantidade de embriões recuperados apresentou tendência a ser superior para as éguas tratadas com eFSH.

Squires & Mccue (2007), utilizando o EPE e o eFSH obtiveram respectivamente, 3,2 e 3,1 ovulações, com 1,96 e 1,5 embriões recuperados por coleta.

Farinasso *et al.*, (2005) observaram melhora da taxa de recuperação embrionária na utilizando baixas doses de EPE. No diestro (D6 a D9), às éguas apresentando ovários com folículos $\leq 25\text{mm}$ aplicou-se luteolítico, submetendo-as a tratamento diário com EPE, BID, com doses de 2mg, 4mg e 6mg. Apenas as doses de 4 e 6 mg elevaram a taxa de ovulação em relação ao grupo controle, induzindo ovulações duplas e triplas em 76,9% dos ciclos tratados. Para o tratamento com 6mg foi obtida média de $1,84 \pm 0,58$ ovulações/ciclo e de $1,31 \pm 0,75$ embriões/ciclo. Este protocolo obteve uma relação entre ovulações e embriões recuperados superior aos demais, possivelmente devido ao pequeno número de folículos que se desenvolveram frente ao estímulo hormonal. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha Filho *et al.* (2005), ao administrarem diariamente 4mg e 5mg de EPE.

O EPE e o eFSH também têm sido utilizados, com sucesso, para antecipar a primeira ovulação em éguas transicionais (Squires, 2003; Niswender *et al.*, 2004). Ao utilizar o eFSH em éguas acíclicas durante a fase de transição de primavera, Peres (2004) aplicou 12,5mg de eFSH aos animais que apresentassem folículo $\geq 25\text{mm}$. O

tratamento era interrompido até que a maioria dos folículos maiores que 30mm alcançasse 35mm, quando era aplicado 2500UI de hCG (IV). Com este tratamento, 85,71% das éguas tratadas apresentaram múltiplas ovulações, aumentando a recuperação embrionária (média de 2,0 embriões por lavado) e antecipando o início da estação reprodutiva em torno de 11,5 dias. Entretanto, as éguas tratadas levaram mais tempo até a ovulação subsequente (22,36 contra 10,92 dias do controle).

2.3.2 Distúrbios na superovulação

Douglas (1979), Woods & Ginther (1982) e Woods et al. (1982) foram os primeiros autores a reportarem dados referentes à superovulação com subsequente coleta embrionária. Passadas mais de duas décadas, respostas inconstantes ainda têm sido obtidas nos programas de superovulação em éguas (Alvarenga *et al.*, 2008).

Para o aprimoramento da técnica de superovulação na espécie eqüina, faz-se necessário o entendimento dos fatores relacionados à resposta superovulatória e às inconsistentes taxas de recuperação embrionária com o emprego de diferentes protocolos e hormônios. Os trabalhos citados nesta revisão que dizem respeito aos perfis hormonais de fêmeas superovuladas não se referem à espécie eqüina, pois foram encontrados trabalhos na literatura com este enfoque.

Estudos demonstraram que a preparação das gonadotrofinas está relacionada com as variações nos resultados dos tratamentos superovulatórios. Alguns autores afirmam que produtos com altas concentrações de LH causam efeitos deletérios na resposta superovulatória (Donaldson & Ward, 1986) afetando, também, a qualidade embrionária (Kafi & McGohan, 1997). Callesen et al. (1986)

demonstraram que o excesso de LH pode causar luteinização folicular prematura, comprometendo tanto o ovócito quanto o embrião.

Bevers & Dieleman (1987) descreveram que o estímulo ao crescimento folicular pela administração da eCG resultou na secreção de esteróides e gonadotrofinas endógenas em novilhas.

Em trabalho subsequente, foi relatado que a concentração de estradiol está relacionada ao número de folículos pré-ovulatórios, sendo bem mais elevada em vacas superovuladas (Bevers *et al.*, 1989). Nos animais superovulados deste trabalho, além do aumento nas concentrações de estradiol, houve diminuição nas concentrações de FSH, bem como na amplitude e frequência de seus pulsos.

Booth *et al.* (1975) detectaram aumento nos níveis de estrógeno no terceiro dia pós-ovulação em vacas superovuladas, associando este aumento à formação de grandes folículos anovulatórios. O mesmo estudo propõe que a pobre recuperação embrionária no sexto dia pós-ovulação se deve a efeitos deletérios dos altos níveis de estrógenos na motilidade do trato genital, causando alterações no transporte de oócitos. De acordo com Russel *et al.* (1980), níveis elevados de estrógeno e progesterona podem interferir no processo de clivagem.

O desenvolvimento de folículos anovulatórios em um pequeno percentual de éguas tem sido observado, em especial quando tratadas com eFSH (Squires, 2006), sem que se saiba o real mecanismo de seu aparecimento.

Goodmann *et al.* (1980) e Desaulniers *et al.* (1995) observaram que o pulso de LH foi mais baixo durante o período pré-ovulatório de fêmeas superestimuladas com pFSH, contrariamente, as concentrações de estradiol se mantiveram

demasiadamente elevadas. Sabe-se que a presença do LH é essencial ao participar da fase final do desenvolvimento e da seleção folicular, devido aos receptores para LH em folículos dominantes antes da divergência (Bodensteiner *et al.*, 1996; Ginther *et al.*, 1996). Da mesma maneira, o LH é importante ao estimular a maturação nuclear oocitária *in vivo* (Dekel *et al.*, 1988, Hyttel *et al.*, 1991). Vacas que possuem ondas de LH precoces, tardias ou ausentes produzem quantidades significativamente menores de embriões frente à superovulação (Callesen *et al.*, 1986).

Em trabalho conduzido por Woods & Ginther (1984), apesar do tratamento com EPE ter resultado em um maior número de embriões recuperados por égua, os embriões oriundos de superovulação transferidos culminaram em um número menor de gestações (47%), em comparação ao grupo controle (88%). Resultados similares foram obtidos por Elsden *et al.* (1976) com vacas superovuladas. Contudo, Squires *et al.* (1987a) demonstraram que as taxas de prenhez mediante a transferência de embriões coletados de éguas superovuladas foram similares às de embriões obtidos de éguas que ovularam espontaneamente.

Em recente estudo, foi verificado que embriões eqüinos provenientes de tratamento superovulatório apresentam características ultra-estruturais e qualidades similares às de embriões oriundos de coletas convencionais (Peres, 2004).

Dippert *et al.* (1992) obtiveram maiores índices de recuperação embrionária após tratamento com 40mg diários de EPE a partir do 5º dia pós-ovulação ($2,0 \pm 1,8$ contra $0,7 \pm 0,5$ no grupo controle). Pouco depois, Dippert *et al.* (1994) detectaram taxas similares de recuperação embrionária por ovulação no grupo tratado (57,1%) e no controle (62,5%). Alvarenga *et al.* (2001) foram os que alcançaram a maior taxa

média de recuperação embrionária por égua (3,5) até o momento, utilizando duas aplicações diárias de 25mg de EPE. Entretanto, neste estudo, a taxa de recuperação embrionária em relação ao número de ovulações foi baixa (49%). Os trabalhos subsequentes, utilizando a mesma dose e frequência de administração, relataram uma recuperação embrionária por égua e por ovulação, de, respectivamente: 2,1 e 43,2% (Scoggin *et al.*, 2002), 1,2 e 30,2% (Carmo, 2003) e, 1,0 e 26% (Machado *et al.*, 2003).

As baixas taxas de fertilização ou sua completa ausência continuam a ser os principais fatores limitantes nos procedimentos de superovulação em bovinos e eqüinos (Armstrong, 1993). As falhas na fertilização têm sido atribuídas a anormalidades na maturação de oócitos, os quais possuem qualidade heterogênea (Moor *et al.*, 1985) e à assincronia entre os eventos de maturação do ovócito e do folículo (Loos *et al.*, 1991). De acordo com Hyttel *et al.* (1991), 37% dos oócitos recuperados de vacas superovuladas sofreram maturação anormal, em comparação aos 11% do grupo controle. Carmo (2007) detectou que os oócitos provenientes de éguas superovuladas apresentam características ultra-estruturais únicas, compatíveis com imaturidade citoplasmática e nuclear, as quais podem comprometer as taxas de fertilização e recuperação embrionária.

Dippert *et al.* (1994) removeram ovários e ovidutos de éguas superovuladas dois dias após a última ovulação, e identificaram que mais de 90% dos corpos lúteos formados eram provenientes de ovulações e não de luteinizações. Alvarenga *et al.* (2001) relataram, em seu estudo, que um grande número de ovulações resultou no desenvolvimento de corpos lúteos funcionais, devido ao significativo aumento nas concentrações de progesterona plasmática.

Após a lavagem das tubas uterinas de éguas superovuladas, as quais apresentaram a média de 3,5 ovulações por ciclo, Dippert et al. (1994) não detectaram diferença na recuperação oocitária entre éguas tratadas e o grupo controle. Da mesma forma, Carmo (2007) observou que a recuperação de oócitos por ovulação se aproxima do normal quando ocorrem até três ovulações por égua tratada com EPE, justificando, desta maneira, a melhor taxa de recuperação embrionária por ovulação frente ao uso de sub-doses de EPE (Farinasso *et al.*, 2005; Rocha Filho *et al.*, 2005) e eFSH (Rocha Filho *et al.*, 2005). De acordo com Carmo (2007), o percentual de oócitos recuperados de éguas superovuladas com EPE foi significativamente menor (90% vs. 65%), atribuindo este fato à dificuldade de captação oocitária pela tuba uterina, devido à presença de grandes coágulos de sangue obstruindo a fossa de ovulação.

Lapin & Ginther (1977) detectaram 24 corpos lúteos em seis éguas que foram previamente tratadas com doses superestimulatórias de Extrato de Pituitária Eqüina, e necropsiadas três ou quatro dias após as ovulações. Em somente 58,3% dos corpos lúteos foram verificados traços na fossa da ovulação. Apenas seis embriões foram recuperados das tubas uterinas destas éguas, sendo a taxa média de recuperação por ovulação de 25%. Pesquisas recentes têm demonstrado que a estimulação ovariana exacerbada não proporciona um maior número de embriões obtidos por coleta, quando comparada às éguas que apresentam menor resposta ovulatória (Alvarenga *et al.*, 2001; Scoggin *et al.*, 2002; Logan *et al.*, 2007; Squires & McCue, 2007).

Alvarenga et al., (2001) obtiveram taxas semelhantes de recuperação oocitária mediante a aspiração folicular de éguas no grupo controle (79%) e tratado

com 0,75mg de EPE (SID) (61%). Da mesma forma, Scoggin et al. (2002) aspiraram via trans-vaginal todos os folículos pré-ovulatórios para a recuperação de oócitos, não observando diferença na porcentagem de oócitos recuperados por folículo aspirado entre o grupo tratado com GnRH e EPE ou apenas com EPE. Estes resultados sustentam a hipótese de que um dos entraves da superovulação se encontra na captação dos oócitos pela tuba uterina e não na capacidade de serem liberados do folículo.

Outro problema existente é a deficiência no transporte espermático em animais superovulados, que resulta em um reduzido número de espermatozóides nos ovidutos no momento da fertilização (Hawk, 1988). Elsdén & Seidel (1995) propõem que os altos níveis de progesterona produzidos poderiam alterar o transporte de espermatozóides e óvulos. Briant et al. (2004) detectaram concentrações pré-ovulatórias acima de 1ng/ml de progesterona em éguas tratadas com altas doses de eFSH. Peres et al. (2005) mensuraram as concentrações de progesterona no diestro de éguas superovuladas com 12,5mg de eFSH (BID), sendo que a concentração de progesterona sérica apresentou correlação positiva com o número de ovulações.



Objetivos

Objetivos:

O presente estudo teve como objetivos:

- 1- Avaliar as concentrações hormonais de estrógeno, inibina, FSH e LH antes, durante e imediatamente após o término da administração hormonal em éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com Extrato de Pituitária Equina e FSH equino purificado.
- 2- Correlacionar os níveis plasmáticos de estrógeno, inibina, FSH e LH antes, durante e imediatamente após o término da administração hormonal com a resposta superovulatória e a recuperação embrionária nos animais sob tratamentos superovulatórios com Extrato de Pituitária Equina e FSH equino purificado.



Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Posto de Monta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, localizado na Fazenda Lageado – 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 com livre acesso à água, sendo alimentados com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*). Os experimentos foram realizados paralelamente a um outro trabalho de Mestrado com o objetivo de comparar protocolos de superovulação utilizando Extrato de Pituitária Equina em doses constantes e decrescentes.

3.1 Animais

Seis éguas em bom estado sanitário e corporal, com idade entre quatro a 15 anos, massa corpórea entre 400 a 500 Kg e com bom histórico reprodutivo, foram utilizadas durante duas estações reprodutivas. A primeira compreendida entre 01 de novembro de 2001 e 05 de março de 2002 e a segunda no período entre 15 de Dezembro de 2002 e 30 de Janeiro de 2003. Estes animais foram acompanhados durante 06 (seis) ciclos consecutivos, na primeira estação, conforme descrito a seguir:

1º ciclo: Acompanhamento ultrassonográfico para a detecção da ovulação (US).

2º ciclo: Tratamento superovulatório (Constante ou decrescente).

3º e 4º ciclos: Observação do intervalo interovulatório.

5º ciclo: Tratamento superovulatório (Constante ou decrescente).

6º ciclo: Observação do intervalo interovulatório.

Na segunda estação reprodutiva, as mesmas éguas foram acompanhadas durante 04 (quatro) ciclos consecutivos:

1º ciclo: Detecção da ovulação por ultrassonografia (US).

2º ciclo: Grupo controle (GIV).

3º ciclo: Observação do intervalo interovulatório.

4º ciclo: Tratamento superovulatório com FSH eqüino purificado (GIII).

Escolheu-se outra estação para a realização do grupo controle para se eliminar algum possível efeito causado pelas seqüentes induções de superovulações e também para utilizar a mesma época do ano dos grupos anteriores. Essas informações podem ser observadas na Figura 1, onde US (acompanhamento ultrassonográfico), C/D (tratamento com EPE Constante ou Decrescente), eFSH (tratamento com eFSH) e setas verdes para os ciclos onde apenas foi observado o intervalo interovulatório.

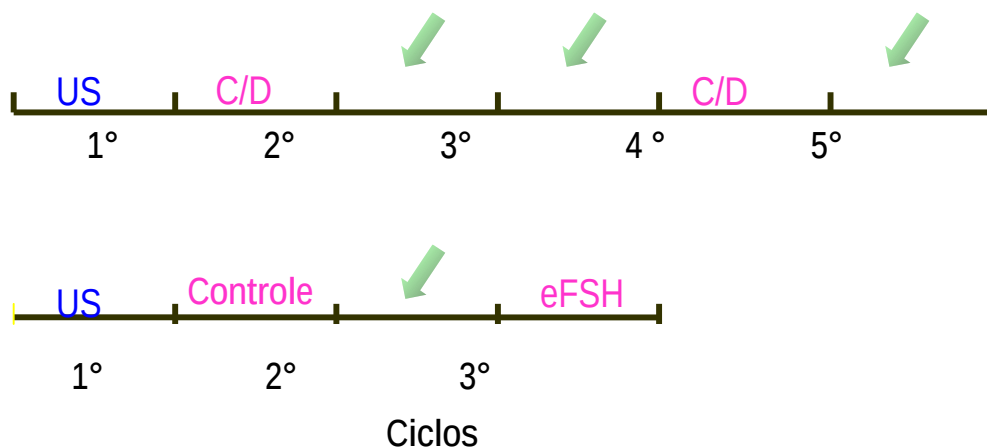


Figura 1 – Esquema dos ciclos utilizados, durante as duas estações reprodutivas (06 ciclos na primeira estação e 04 ciclos na segunda estação de monta utilizada).

Foi utilizado sêmen de um Garanhão da raça Árabe, com bom histórico de fertilidade, para as inseminações das éguas do experimento.

O sêmen foi colhido através de uma vagina artificial, modelo Botucatu, sendo então analisado o ejaculado em microscópio com contraste de fase e posteriormente diluído em meio Kenney (KENNEY, 1975) na proporção de 1:1. As inseminações foram realizadas utilizando-se 1×10^9 de espermatozóides viáveis, em um volume de 30 a 40ml.

3.2 Preparação do Extrato de Pituitária Eqüina (EPE)

As pituitárias foram adquiridas no matadouro da cidade de Araguari, Minas Gerais, e preparadas no laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, conforme metodologia proposta por Guillou e Combarnous (1983). Resumidamente, o EPE foi extraído com 40% de etanol, 6% de acetato de amônia e a fração ativa foram precipitadas para aumentar a concentração de etanol em 80%, após ter sido dializado e liofilizado. Logo após a liofilização, o extrato foi diluído em solução salina fisiológica a uma concentração de 10mg/ml e armazenado à -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 por um 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) Jennet Rose, através da técnica de radioimunoensaio (R.I.A.) – LH 493µg / FSH 331µg - (60% e 40% respectivamente).

3.3 FSH Eqüino Purificado

O FSH eqüino purificado utilizado para o tratamento superovulatório foi adquirido no Laboratório Bioniche (Bioniche Animal Health Inc., Canadá) e cada frasco utilizado continha 25mg de B-FSH-ReF-001.

3.4 Tratamentos

Grupo I (GI): Doses Constantes

As éguas foram submetidas a tratamento superovulatório com doses constantes de EPE, conforme o seguinte protocolo:

1º dia: (7º dia pós-ovulação)- 18:00 horas, aplicação de 25mg/IM de EPE, sendo aplicado, concomitantemente, 1,0 ml/IM de “Prostaglandina F₂alfa” (Lutalise[®], Rhodia-Mérieux, Paulínia-SP).

2º dia: 7:00 horas, aplicação do EPE e, novamente, prostaglandina F₂alfa (Lutalise[®], Rhodia-Mérieux, Paulínia, SP) para garantir a luteólise, na mesma dosagem do primeiro dia. E às 18:00 horas aplicação de 25mg/IM de EPE.

3º ao 6º dia: Foi aplicado 25mg/IM de EPE pela manhã (7:00 horas) e à tarde (18:00 horas). O tratamento foi interrompido quando pelo menos a metade dos folículos em desenvolvimento atingiram 35mm de diâmetro. Neste momento, foi aplicado 3000UI de Gonadotrofina Coriônica Humana “hCG” (Vetecor[®] - Laboratório Calier, São Paulo-SP) por via endovenosa e realizada a 1ª inseminação, repetindo-a diariamente até a última ovulação. Os animais foram tratados com EPE por um período máximo de 8 dias.

Grupo II (GII): Doses Decrescentes

As éguas foram tratadas com frações decrescentes EPE. As doses de EPE foram administradas duas vezes ao dia (7:00 e 18:00), em frações decrescentes; 45mg, 35mg, 25mg, 15mg e 10mg/IM para 1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º dia, respectivamente.

1º dia: (7º dia pós-ovulação)- 18:00 horas, aplicação de 45mg/IM de EPE, sendo aplicado concomitantemente 1,0 ml/IM de prostaglandina F₂alfa (Lutalise®, Rhodia-Mérieux, Paulínia-SP).

2º dia: 7:00 horas aplicação de 35mg de EPE e, novamente, prostaglandina F₂alfa para garantir a luteólise, na mesma dosagem do primeiro dia. E às 18:00 horas aplicação de 35mg/IM de EPE, novamente.

3º ao 6º dia: Aplicação de doses decrescentes de EPE, pela manhã (7:00 horas) e à tarde (18:00 horas). O tratamento foi interrompido quando pelo menos a metade dos folículos em desenvolvimento (aproximadamente 30mm) atingiram 35mm de diâmetro. Neste momento, foi aplicado 3000 UI de hCG por via endovenosa e realizada a 1ª inseminação, repetindo-a diariamente até a última ovulação. Quando necessário o prolongamento do tratamento, foi mantida a dose de 10mg de EPE. Os animais foram tratados com EPE por um período máximo de 8 dias.

Grupo III (GIII): FSH Eqüino Purificado

Neste grupo os animais receberam aplicações duas vezes ao dia de 12,5mg por via intramuscular de FSH eqüino purificado, nos mesmos horários do GI e GII. O tratamento com FSH eqüino purificado foi interrompido quando a maioria

dos folículos em desenvolvimento atingiu diâmetro médio de 35mm, a partir deste momento o protocolo foi semelhante ao descrito para GI e GII.

Grupo IV (GIV): Ciclo Controle

As éguas não foram submetidas ao tratamento superovulatório. Foi aplicado 1,0 ml “Prostaglandina F₂alfa” (Lutalise[®], Rhodia-Mérieux, Paulínia-SP) no 7º dia pós-ovulação, e acompanhado o desenvolvimento folicular, através de ultrasonografia. A ovulação foi induzida com 3000UI de Gonadotrofina Coriônica Humana “hCG” (Vetecor[®] - Laboratório Calier, São Paulo-SP), por via endovenosa, quando um folículo de 35mm de diâmetro foi observado, e realizado a primeira inseminação artificial. Esta foi repetida diariamente utilizando-se 1×10^9 de espermatozóides viáveis até a detecção da ovulação.

3.5 Avaliação Ultra-sonográfica

As éguas foram submetidas, previamente, a exames ultra-sonográficos para a detecção de qualquer alteração uterina e ovariana que pudesse influenciar os resultados do estudo, e citologia uterina. Para aos exames ultra-sonográficos foi utilizado um aparelho modelo Scanner 450 Vet (Pie-Medical, Holanda) com transdutor linear de 5,0 MHz.

As éguas foram acompanhadas através de exames ultra-sonográficos para a detecção da ovulação (dia 0). Após sete dias da ovulação (dia 7) um outro exame de ultra-som foi realizado para verificar a presença de edema uterino e folículo com diâmetro médio superior a 25mm, onde na presença destes, não se executaria o protocolo superovulatório.

Através do exame ultra-sonográfico e exploração detalhada do ovário verificaram-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. Após a realização deste exame, as éguas receberam uma injeção intramuscular de PGF2 α (250 μ g/dia de cloprostenol) e então, iniciava-se o tratamento superovulatório e a avaliação do crescimento folicular das éguas dos grupos I, II e III e apenas a avaliação do crescimento folicular do grupo IV (controle). Os mesmos animais foram utilizados em todos os tratamentos, com o intuito de evitarem-se variações individuais.

O acompanhamento ultra-sonográfico foi realizado a cada 24 horas, desde o início do tratamento (D7) até a última ovulação. Todos os folículos com diâmetro maior ou igual a 10 mm, presentes no início do tratamento, foram mensurados após a imagem ultra-sonográfica ser congelada, utilizando-se a função de medição eletrônica disponível no aparelho, esse acompanhamento foi efetuado até a última ovulação dos folículos, que atingiram diâmetro superior a 30 mm. A localização dos folículos foi registrada através de mapeamento ovariano, mostrando-se a posição de um dado folículo em relação aos outros e as demais referências ovarianas.

3.6 Amostras de sangue e Ensaio Hormonais

Diariamente, antes do acompanhamento ultra-sonográfico descrito anteriormente, foram coletadas amostras de sangue obtidas por punção da veia jugular, com auxílio de um tubo “vacutainer” heparinizado, das éguas tratadas com doses constantes de EPE, decrescentes, eFSH e do grupo controle. As amostras foram coletadas, no mesmo horário, antes da aplicação dos tratamentos, iniciando-

se as coletas 02 dias antes do tratamento até 02 dias após a última ovulação (para dosagem de LH, FSH, estradiol e inibina). E, novamente no oitavo dia após ovulação (para dosagem de progesterona, com intuito de correlacionar níveis de progesterona com os números de embriões recuperados e corpos lúteos existentes).

Após a colheita das amostras, as mesmas foram centrifugadas por 5 (cinco) minutos a 3000 rpm., o plasma foi retirado com auxílio de uma pipeta estéril, e este armazenado em temperatura de -20°C .

As dosagens de FSH, LH, estradiol e inibina foram realizadas na Universidade da Califórnia – Davis, EUA, no laboratório de endocrinologia sob responsabilidade da Doutora Jennet Roser, pesquisadora da Universidade da Califórnia.

As amostras para as dosagens de FSH e LH foram quantificadas por uma versão modificada da técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo heterólogo descrita por Matteri et al., (1986). O coeficiente intra ensaio de LH foi de 3,5% e a sensibilidade de 0,5ng/ml. O FSH apresentou coeficiente de variação inter e intra ensaio foi de 2,7% e 8,8%, respectivamente, e sensibilidade de 1,8ng/ml.

As concentrações de estradiol foram determinadas por RIA, segundo método descrito por Pinaud et al. (1991), apresentando sensibilidade de 15,0pg/ml, coeficiente de variação intra e inter ensaio de 5% e 11,2%, respectivamente.

As concentrações plasmáticas de inibina imunoreativa foram mensuradas através de RIA, conforme o descrito por Roser et al. (1994). Neste caso, a sensibilidade do ensaio foi de 0,33ng/ml e os coeficientes de variação intra e inter ensaio foram de 2,7% e 13,6%, respectivamente.

3.7 Avaliação dos Dados

A fim de facilitar as comparações entre os grupos, as concentrações médias hormonais foram divididas em quatro períodos distintos, de acordo com o momento do ciclo estral em que foram obtidas. Os períodos foram classificados com números (1 a 4), correspondendo às concentrações detectadas:

- Período 1: dois dias antes do início do tratamento;
- Período 2: durante a administração dos medicamentos superovulatórios, até um dia antes da ovulação;
- Período 3: dia da ovulação;
- Período 4: durante os dois dias após a ovulação.

Não obstante, as concentrações hormonais médias foram analisadas nos quatro grupos de acordo com o dia do ciclo em que foram obtidas, a fim de detectar diferenças pontuais.

3.8 Análise estatística

Para a avaliação das diferenças nos níveis hormonais ao longo de todo tratamento a análise dos dados foi feita por ANOVA para medidas repetidas, utilizando-se o proc GLM do SAS. As variáveis dependentes foram a concentração plasmática de LH, FSH, estradiol e inibina (ng/ml) e as variáveis independentes, o intervalo de tempo, tratamento e interação tratamento x intervalo.

Para as variáveis que apresentaram variação significativa foi realizado o teste de Duncan como pós-teste para

verificar as diferenças entre os momentos. Foi observada diferença significativa quando $P < 0,05$.

Para a análise comparativa dos hormônios (Estradiol, Inibina, FSH e LH) entre os grupos nos diferentes dias foi utilizado a análise de variância (ANOVA), seguido quando necessário pelo teste Tukey a 5% de significância.



Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Número de ovulações e embriões

O número médio de ovulações e embriões recuperados foi de, respectivamente, $3,3 \pm 1,6$ ovulações e $1,2 \pm 1,3$ embriões para o grupo sob tratamento de EPE constante (GI), $5,0 \pm 2,1$ e $1,8 \pm 1,3$ no grupo EPE decrescente (GII), $4,8 \pm 1,3$ e $2,6 \pm 0,5$ no grupo eFSH (GIII) e $1,0 \pm 0$ e $0,5 \pm 0,5$ no grupo controle (GIV). O número de ovulações observado nos grupos superovulados foi semelhante entre si e superiores (GII e GIII) ao grupo controle ($P < 0,05$). No entanto, GI (EPE Constante) apresentou valor intermediário entre os demais grupos superovulados e o grupo controle. O número de embriões recuperados observado no grupo eFSH (GIII) foi superior estatisticamente ao grupo controle (GIV), e os grupos GI e GII apresentaram valores estatisticamente intermediários. Estes dados encontram-se agrupados no gráfico abaixo (Figura 1):

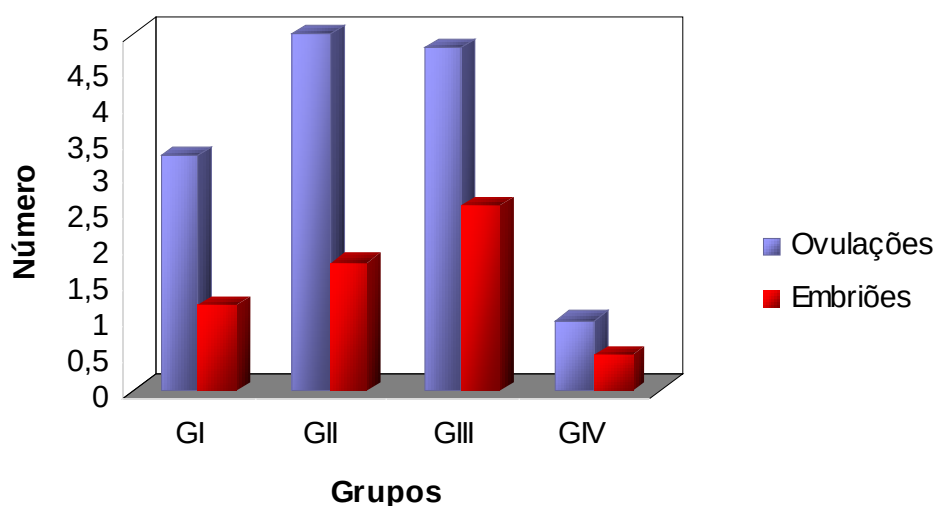


Figura 2 – Número de ovulações e embriões recuperados nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GII), eFSH (GIII) e Controle (GIV). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) para ovulações e embriões.

O percentual de éguas que obtiveram 0-2, 3-5 ou mais de 5 ovulações de acordo com o grupo, encontra-se demonstrado na tabela 2.

Tabela 1 – Número de Ovulações e embriões, e recuperação embrionária por ovulação nos grupos: GI (EPE constante), GII (EPE decrescente), GIII (eFSH) e GIV (controle).

Variáveis	Grupos			
	GI	II	GIII	GIV
Nº. de ovulações	3,3±1,6 ^{ab}	5,0±2,1 ^a	4,8±1,3 ^a	1,0±0 ^b
Número de Embriões	1,2±1,3 ^{ab}	1,8±1,3 ^{ab}	2,6±0,5 ^a	0,5±0,5 ^b
Embr. por ovulação	0,36±1,2 ^b	0,36±1,8 ^b	0,54±1,3 ^a	0,5±1,0 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Tabela 2 - Percentual de éguas que apresentaram 0 a 2, 3 a 5 e mais de 5 ovulações nos grupos: GI (EPE constante), GII (EPE Decrescente) GIII (eFSH) e GIV (controle).

Variáveis	Grupos			
	GI	II	GIII	GIV
0 a 2 ovulações	33% ^a	0	0	100% ^b
3 a 5 ovulações	67%	67%	60%	0
> 5 ovulações	0	33%	40%	0

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

4.2 Concentrações médias de estradiol

Durante o primeiro período, as concentrações médias de estradiol obtidas foram similares entre os grupos avaliados: $8,1 \pm 0,7$ pg/ml (GI), $7,4 \pm 0,8$ pg/ml (GII) $3,3 \pm 0,5$ pg/ml (GIII), e $4,6 \pm 0,2$ pg/ml (GIV).

No segundo período, foi possível observar que o GIII (eFSH) ($29,52 \pm 14,93$ pg/ml) apresentou valor superior estatisticamente ($P < 0,05$) aos demais grupos superovulados (GI: $16,75 \pm 10,75$ pg/ml e GII: $16,26 \pm 10,69$ pg/ml) e ao grupo GIV ($7,78 \pm 6,81$ pg/ml). Além disso, os grupos superovulados com EPE (GI e GII) também foram estatisticamente superiores ao grupo controle (GI) no período 2.

As concentrações médias de estradiol durante o terceiro e quarto períodos foram similares estatisticamente, alcançando os valores de, respectivamente: GI ($14,3 \pm 2,5$ pg/ml e $14,8 \pm 7,5$ pg/ml), GII ($14,7 \pm 8,9$ pg/ml e $10,1 \pm 4,8$ pg/ml), GIII ($16,0 \pm 4,7$ pg/ml e $7,8 \pm 2,1$ pg/ml) e GIV ($6,8 \pm 2,2$ pg/ml e $3,3 \pm 0,9$ pg/ml).

O perfil endócrino das concentrações médias de estradiol nos grupos EPE constante (GI), EPE decrescente (GII), eFSH (GIII) e Controle (GIV) nos distintos períodos (1-4), encontra-se demonstrado na Figura 3.

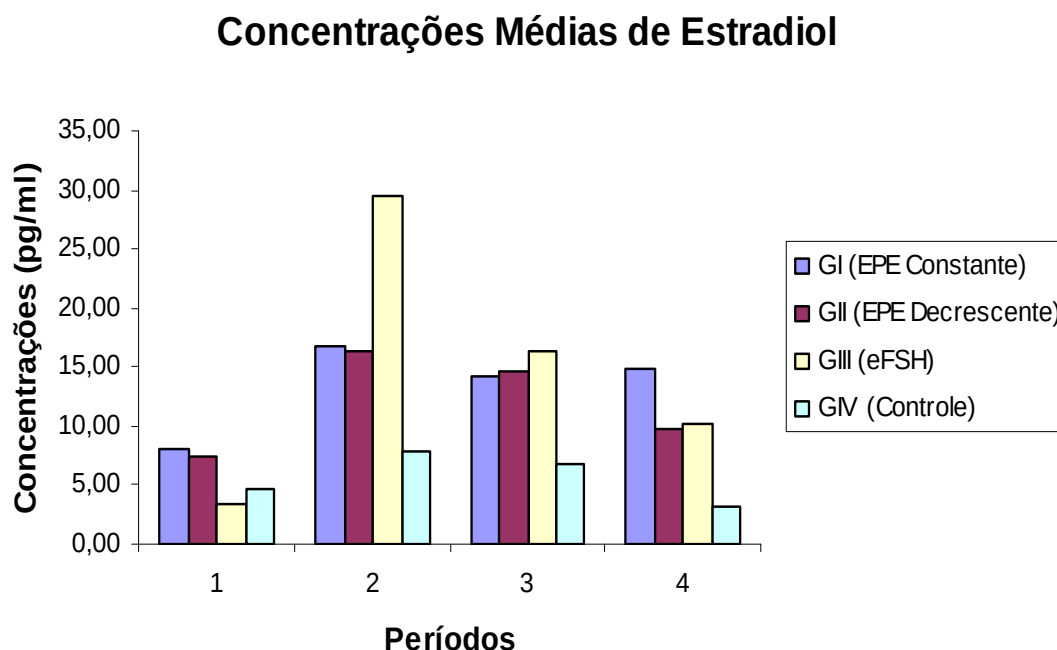


Figura 3 – Perfil das concentrações plasmáticas médias de Estradiol nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).

Quando avaliamos as concentrações médias de estradiol ao longo dos dias do tratamento, foi possível observar um aparente aumento no GIII (eFSH) em relação aos demais grupos. No entanto, somente no dia 3 (3º dia de tratamento) foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) do GIII (eFSH) em relação aos demais grupos superovulados (GI e GII) e ao grupo controle (GIV).

As concentrações médias de estradiol para cada um dos grupos, de acordo com o dia do ciclo, encontram-se agrupados na tabela a seguir (Tabela 3).

Foi observada uma correlação positiva entre as concentrações de estradiol e o número de folículos maiores ou iguais à 30mm nas éguas superovuladas ($R = 0,917$; $P < 0,05$), bem como no número de embriões recuperados ($R = 0,945$; $P < 0,05$) e ovulações ($R = 0,75$; $P < 0,05$). Foi verificada uma correlação altamente positiva ($R = 0,615$; $P = 0,01$) entre as concentrações de estradiol e inibina.

Tabela 3 – Valores médios diários de estradiol (pg/ml) nos grupos: EPE constante, EPE decrescente, eFSH e Controle, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.

Dias do ciclo	EPE constante (GI)	EPE decrescente (GII)	eFSH (GIII)	Controle (GIV)
-2	7,95 ± 3,27pg/ml	6,87 ±2,25pg/ml	2,69 ± 1,61pg/ml	5,45 ±1,99pg/ml
-1	8,54 ± 4,29 pg/ml	7,32 ± 4,16pg/ml	3,88 ± 2,13 pg/ml	3,74 ±1,53pg/ml
0 (Início do trat.)	10,47 ± 3,17pg/ml	6,26 ± 3,62pg/ml	11,20± 6,07 pg/ml	3,16 ±1,52pg/ml
+1	9,73 ± 2, 19pg/ml	8,32 ±2,35pg/ml	19,55 ±6,37pg/ml	3,80 ±1,79pg/ml
+2	10,71 ± 4,08pg/ml	9,04 ±4,64pg/ml	35,95 ±6,10pg/ml	3,66 ±1,03pg/ml
+3	13,72 ±11,63pg/ml ^b	10,38 ±5,34pg/ml ^b	49,07 ±12,17pg/ml ^a	5,29 ±4,28pg/ml ^b
+4	18,55 ±13,14pg/ml	15,51 ±6,59pg/ml	40,44 ±11,58pg/ml	6,25 ±2,20pg/ml
+5	14,42 ±7,87pg/ml	19,97 ±11,93pg/ml	30,24 ±7,58pg/ml	10,41 ±7,58pg/ml
+6	26,22 ±13,96pg/ml	28,38 ±15,81pg/ml	22,99 ± 8,47pg/ml	16,55 ±8,34pg/ml
+7	24,72 ±13,26pg/ml	25,00 ±9,98pg/ml	16,33 ±7,27pg/ml	14,12 ±8,77pg/ml
D0 (Ovulação)	17,11±9,67pg/ml	14,63 ±4,12pg/ml	11,99 ±6,70pg/ml	6,,79 ±1,14pg/ml
D1	10,82 ±5,13pg/ml	11,55 ±3,76pg/ml	5,77 ±3,74pg/ml	3,48 ±2,38pg/ml
D2	11,87 ±4,42pg/ml	7,54 ±2,84pg/ml	1,04 ±0,60pg/ml	1,68 ±0,95pg/ml

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05)

Os dados do perfil endócrino diário de estradiol nos diferentes grupos, apresentados na tabela 3, apresentam-se em forma de gráfico na Figura 4.

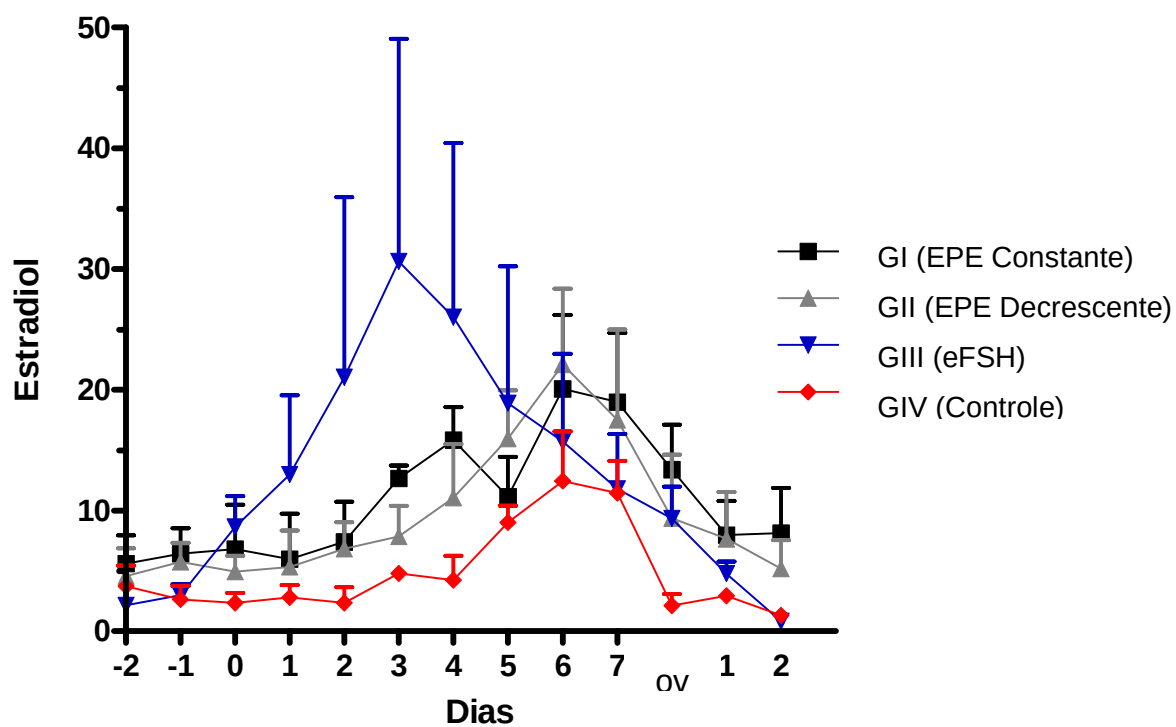


Figura 4 – Perfil médio das concentrações plasmáticas de Estradiol durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.

4.3 Concentrações médias de inibina

Durante os períodos 1 e 2, as concentrações médias de inibina identificadas, as quais foram estatisticamente similares, foram de, respectivamente: $0,15 \pm 0,07 \text{ ng/ml}$ e $0,53 \pm 0,50 \text{ ng/ml}$ (GI), $0,17 \pm 0,06 \text{ ng/ml}$ e $0,70 \pm 0,51 \text{ ng/ml}$ (GII), $0,31 \pm 0,15 \text{ ng/ml}$ e $1,03 \pm 0,89 \text{ ng/ml}$ (GIII) e $1,81 \pm 0,34 \text{ ng/ml}$ e $0,29 \pm 0,11 \text{ ng/ml}$ (GIV).

No terceiro período (período da ovulação), os valores de inibina foram superiores ($P < 0,05$) nas éguas superovuladas com EPE Decrescente (GII: $2,02 \pm 0,45 \text{ ng/ml}$) e eFSH (GIII: $2,40 \pm 0,38 \text{ ng/ml}$), quando comparadas com o grupo Controle (GIV: $0,42 \pm 0,07 \text{ ng/ml}$). O grupo EPE Constante (GI: $0,99 \pm 0,21 \text{ ng/ml}$) obteve valores estatisticamente intermediários aos demais.

As concentrações de inibina não diferiram estatisticamente entre os grupos durante o quarto período: GI: $0,67 \pm 0,21 \text{ ng/ml}$, II: $0,47 \pm 0,14 \text{ ng/ml}$, GIII: $0,56 \pm 0,12 \text{ ng/ml}$ e GIV: $0,15 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$.

As concentrações médias de inibina nos grupos GI, II, GIII e GIV, nos distintos períodos encontram-se demonstrado no gráfico a seguir (Figura 5).

O perfil das concentrações de inibina ao longo dos dias do ciclo está apresentado na forma de tabela (Tabela 4) e na forma de gráfico para demonstrar as curvas ao longo dos tratamentos (Figura 6).

Concentrações Médias de Inibina

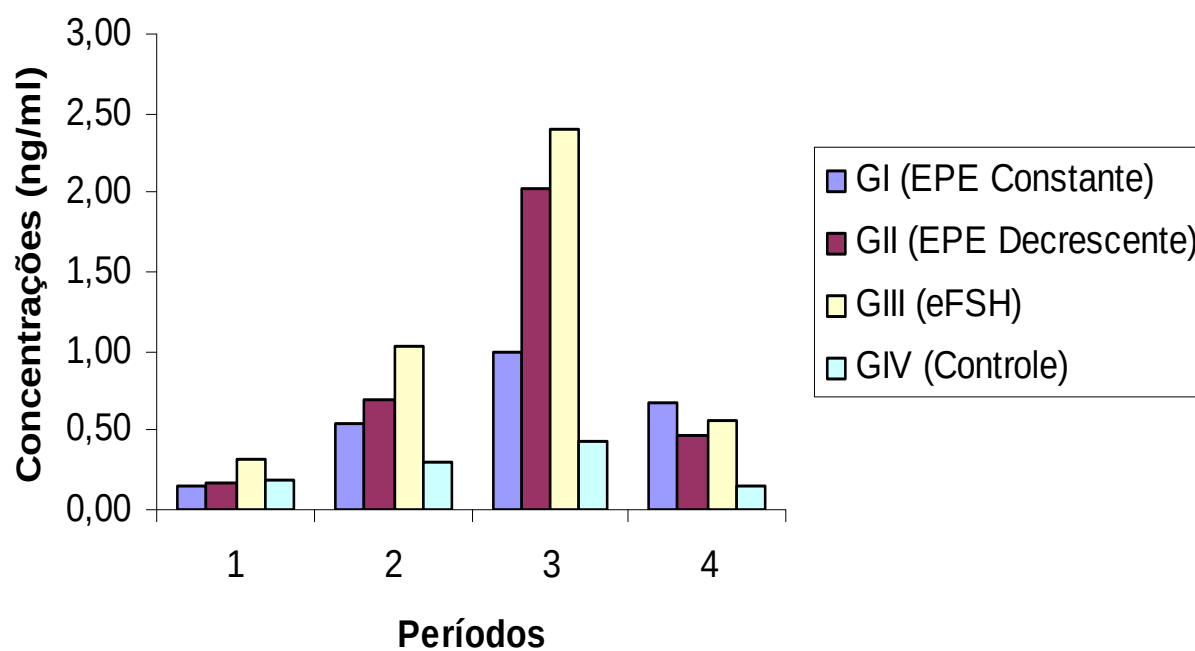


Figura 5 – Perfil das concentrações plasmáticas médias de Inibina nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GIII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).

Tabela 4 – Valores médios diários de inibina (ng/ml) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.

Dias do ciclo	EPE constante (GI)	EPE decrescente (GII)	eFSH (GIII)	Controle (GIV)
-2	0,14 ± 0,13ng/ml	0,16±0,06ng/ml	0,28± 0,22ng/ml	0,17±0,07 ng/ml
-1	0,15±0,14 ng/ml	0,15±0,09ng/ml	0,34 ±0,32ng/ml	0,19±0,10 ng/ml
0 (Início do trat.)	0,15±0,18 ng/ml	0,13±0,07ng/ml	0,45 ±0,57ng/ml	0,15±0,07ng/ml
1	0,27±0,4 pg/ml	0,23±0,10ng/ml	0,61±0,81ng/ml	0,24±0,10ng/ml
2	0,40± 0,55ng/ml	0,37±0,17ng/ml	0,83 ±1,03ng/ml	0,24±0,07ng/ml
3	0,67± 0,95ng/ml	0,56±0,33ng/ml	1,06 ±1,79ng/ml	0,31±0,07 ng/ml
4	0,81±1,02ng/ml	0,68±0,42ng/ml	1,56±1,22 ng/ml	0,34±0,08 ng/ml
5	0,46±0,23ng/ml	0,92±0,55ng/ml	1,42 ±0,17ng/ml	0,38±0,12 ng/ml
6	0,62±0,29 ng/ml	1,13±0,67ng/ml	0,92±0,14ng/ml	0,37±0,11 ng/ml
7	0,69±0,29 ng/ml	1,09±0,49ng/ml	0,88±0,14ng/ml	0,32±0,14ng/ml
D0 (Ovulação)	1,16±1,02 ng/ml ^a	1,57±1,29 ng/ml ^a	2,41±3,12ng/ml ^{ab}	0,43±0,13ng/ml ^b
D1	0,41±0,37ng/ml	0,41±0,19ng/ml	0,38 ±0,16ng/ml	0,17±0,09 ng/ml
D2	0,44±0,55ng/ml	0,32±0,21ng/ml	0,12±0,06ng/ml	0,14±0,07 ng/ml

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

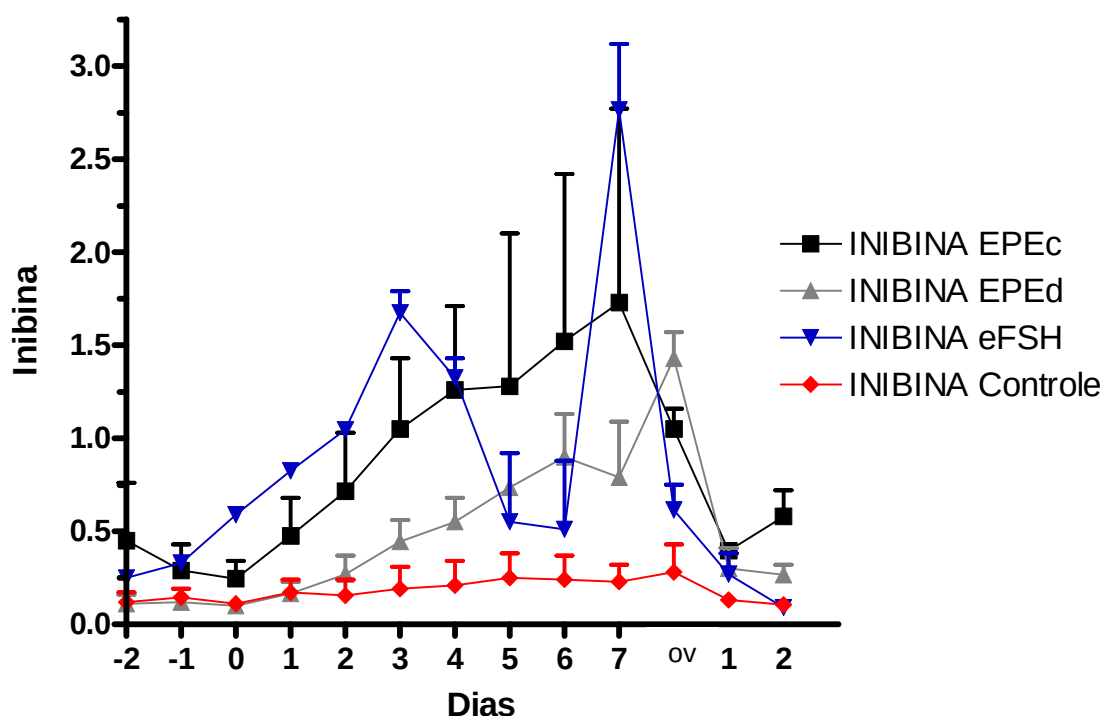


Figura 6 – Perfil médio das concentrações plasmáticas de Inibina durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.

Quando avaliadas as concentrações médias de inibina durante os dias do ciclo estral, foi possível observar que os grupos com tratamentos superovulatórios (GI, GII e GIII) apresentaram valores superiores ao grupo controle (GIV) no dia da ovulação.

As concentrações de inibina correlacionaram-se positivamente ($R=0,61$; $P=0,05$) com o número de ovulações detectadas no GI (EPE constante) e GII (EPE decrescente), quando da avaliação conjunta dos valores obtidos nos períodos 2 e 3.

4.4 Concentrações médias de FSH

No período 1 (antes do tratamento), as concentrações médias de FSH foram similares nos diferentes grupos: $8,1 \pm 2,3$ ng/ml (GI), $6,9 \pm 1,7$ ng/ml (GII), $10,5 \pm 6,1$ ng/ml (GIII) e $7,8 \pm 1,9$ ng/ml (GIV).

Quando avaçiamos o segundo período (durante o tratamento) foi observado um aumento das concentrações médias de FSH nos grupos tratados com EPE (GI: $16,64 \pm 4,94$ ng/ml e GII: $15,12 \pm 6,44$ ng/ml).

Esses grupos foram superiores estatisticamente ao grupo tratado com eFSH (GIII: $9,93 \pm 2,22$ ng/ml) e ao grupo controle (GIV: $4,43 \pm 2,52$ ng/ml). Além disso, o GIII apresentou valores intermediários, sendo superior ao GIV.

Nos períodos 3 e 4, respectivamente, as concentrações de FSH foram estatisticamente semelhantes entre os grupos avaliados: $4,72 \pm 1,81$ ng/ml e $3,28 \pm$ ng/ml (GI), $2,73 \pm 1,02$ ng/ml e $2,4 \pm 0,93$ ng/ml (GII), $4,8 \pm 0,95$ ng/ml e $2,9 \pm 0,67$ ng/ml (GIII) e $3,2 \pm 0,87$ ng/ml e $4,6 \pm 1,24$ ng/ml (GIV).

O perfil endócrino das concentrações médias de FSH nos grupos EPE constante, EPE decrescente, eFSH e controle, nos distintos períodos, encontra-se demonstrado na Figura 7.

Concentrações Médias de FSH

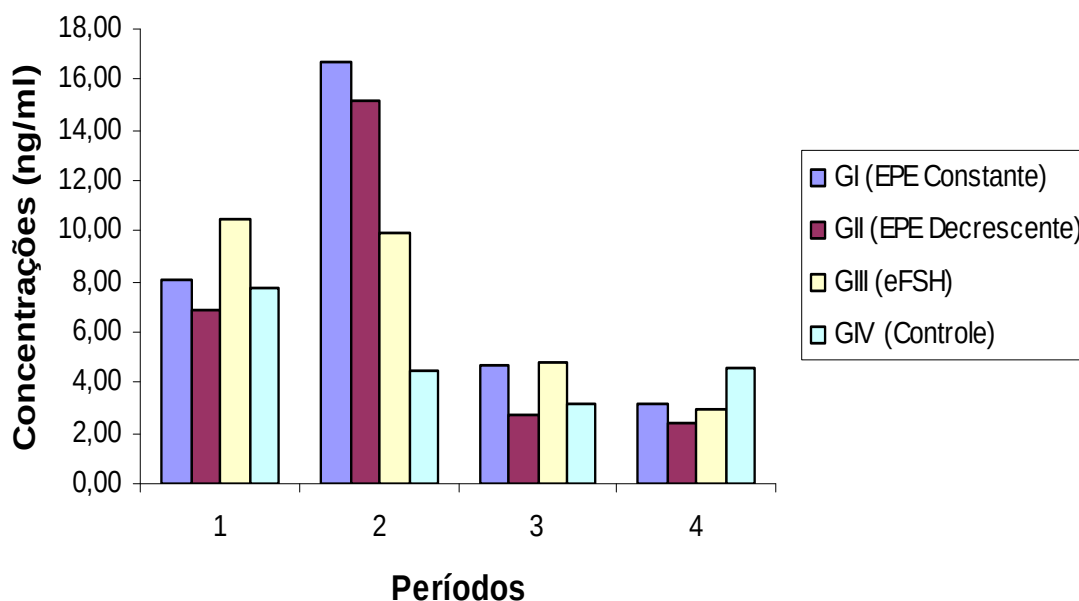


Figura 7 – Perfil das concentrações plasmáticas médias de FSH nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).

Quando avaliados dias do ciclo entre os grupos, o GI e GII apresentaram valores estatisticamente ($P < 0,05$) superiores ao grupo controle do dia 1 ao dia 7 do tratamento.

Os valores de FSH observados no GIII foram, durante esse período (1º ao 7º dia de tratamento), intermediários e estatisticamente semelhantes ao GI, GII e GIV.

Os valores de FSH para cada um dos grupos, de acordo com o dia do ciclo, encontram-se agrupados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios diários de FSH (ng/ml) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.

Dias do ciclo	EPE constante (GI)	EPE decrescente (GIII)	eFSH (GII)	Controle (GIV)
-2	8,43±2,12 ng/ml	6,29 ±2,09ng/ml	10,02± 2,14ng/ml	8,53± ng/ml
-1	7,77± 1,67ng/ml	7,54 ±1,25ng/ml	10,97± 2,42ng/ml	6,97± 2,31ng/ml
0 (Início do trat.)	13,60±8,98 ng/ml	17,22 ±7,94ng/ml	13,50 ±3,44ng/ml	7,81±2,45 ng/ml
1	17,68 ±10,03ng/ml ^a	22,11 ±14,53ng/ml ^a	11,08 ±1,12ng/ml ^b	7,10 ±1,37ng/ml ^b
2	19,50 ±8,76ng/ml ^a	20,86 ±12,64ng/ml ^a	9,91 ±0,98ng/ml ^b	5,27 ±1,23ng/ml ^b
3	18,36 ±12,90ng/ml ^a	20,85 ±13,41ng/ml ^a	9,43 ±0,44ng/ml ^{ab}	4,46±2,76 ng/ml ^b
4	17,13 ±9,98ng/ml ^a	15,27 ±12,34ng/ml ^a	12,02 ±0,75ng/ml ^a	3,48± 1,89ng/ml ^b
5	16,37 ±10,01ng/ml ^a	12,97 ±11,98ng/ml ^{ab}	8,33 ±0,38ng/ml ^b	2,72± 2,02ng/ml ^b
6	16,56 ±6,78ng/ml ^a	13,27 ±9,67ng/ml ^a	8,19 ±0,97ng/ml ^a	2,33± 1,78ng/ml ^b
7	9,52 ±4,34ng/ml ^a	4,56 ±2,76ng/ml bc	8,77 ±2,06ng/ml ^{ab}	2,54± 1,54ng/ml c
D0 (Ovulação)	4,71 ±1,23ng/ml	2,69 ±1,03ng/ml	4,79 ±0,85ng/ml	3,18± 1,01ng/ml
D1	3,40 ±1,02ng/ml	2,16 ±0,93ng/ml	2,96± 1,92ng/ml	4,28± 2,45ng/ml
D2	3,00 ±0,97ng/ml	2,60 ±0,83ng/ml	2,91 ±1,25ng/ml	4,97± 2,38ng/ml

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05)

O perfil endócrino diário de FSH nos diferentes grupos encontra-se esquematizado na figura a seguir (Figura 8):

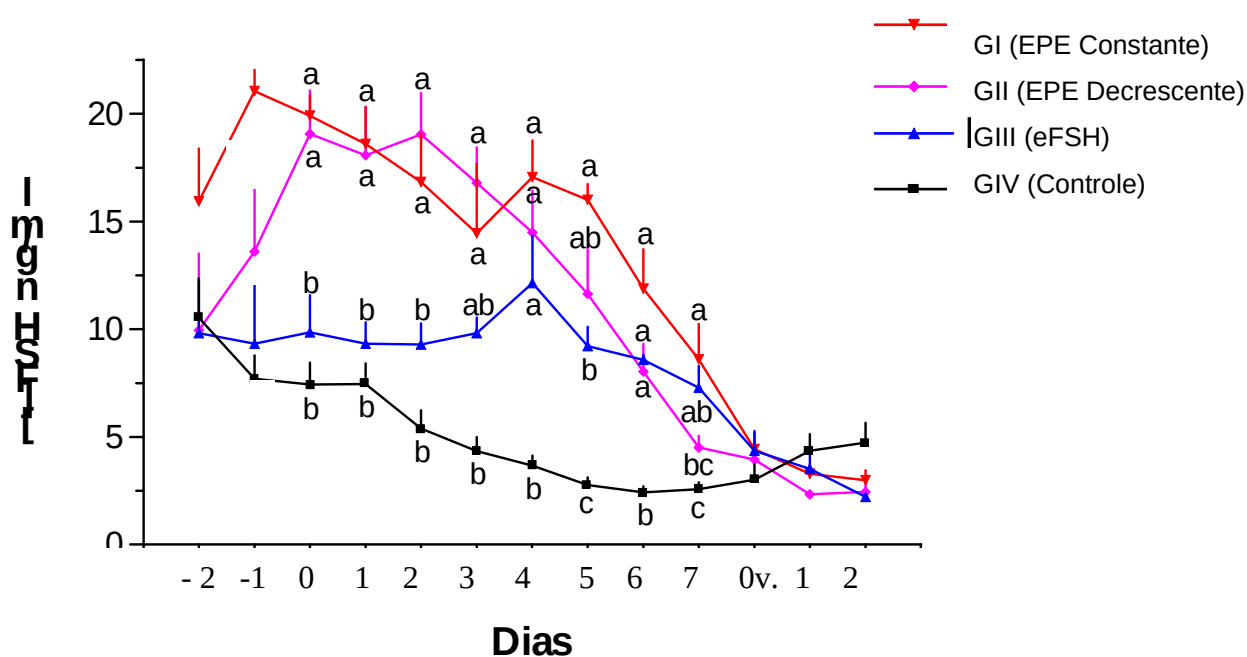


Figura 8 – Perfil médio das concentrações plasmáticas de FSH durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.

O perfil de FSH nos grupos superovulados apresentou um aparente aumento numérico no início do tratamento, em contraste com o grupo controle, cujas concentrações declinaram. Posteriormente, aparentemente houve um decréscimo nas concentrações ao longo do estro em todos os grupos avaliados.

4.5 Concentrações médias de LH

Durante o período 1 (antes do tratamento), as concentrações médias de LH foram similares entre os grupos: $6,42 \pm 0,54 \text{ ng/ml}$ (GI), $3,24 \pm 0,87 \text{ ng/ml}$ (GII), $5,01 \pm 0,32 \text{ ng/ml}$ (GIII) e $2,3 \pm 1,07 \text{ ng/ml}$ (GIV).

Já no segundo período, concentrações maiores de LH ($P < 0,05$) foram observadas nos grupos tratados com EPE, ou seja, GI ($13,67 \pm 5,23 \text{ ng/ml}$) e GII ($11,14 \pm 5,66 \text{ ng/ml}$), em comparação ao GIII ($4,84 \pm 1,27 \text{ ng/ml}$) e ao GIV ($3,39 \pm 2,36 \text{ ng/ml}$). Os valores no dia da ovulação (período 3) não diferiram estatisticamente entre os grupos: $5,85 \pm 2,31 \text{ ng/ml}$ (GI), $2,58 \pm 1,03 \text{ ng/ml}$ (GII), $2,74 \pm 1,11 \text{ ng/ml}$ (GIII) e $9,00 \pm 2,25 \text{ ng/ml}$ (GIV).

Durante o quarto período, as concentrações médias de LH no grupo GIV (controle: $12,22 \pm 2,13 \text{ ng/ml}$) foram superiores ($P < 0,05$) às obtidas no GII ($1,53 \pm 0,21 \text{ ng/ml}$) e GIII ($1,82 \pm 0,98 \text{ ng/ml}$).

O grupo tratado com EPE constante (GI) obteve valores intermediários ($6,84 \pm 2,18 \text{ ng/ml}$), similares aos demais. Não foi encontrada correlação ($P > 0,05$) entre o número de embriões recuperados e as concentrações de LH durante o período 2. Os perfis endócrinos das concentrações médias de LH nos grupos EPE constante, EPE decrescente, eFSH e Controle nos distintos períodos encontram-se demonstrados na Figura 9.

Concentrações Médias de LH

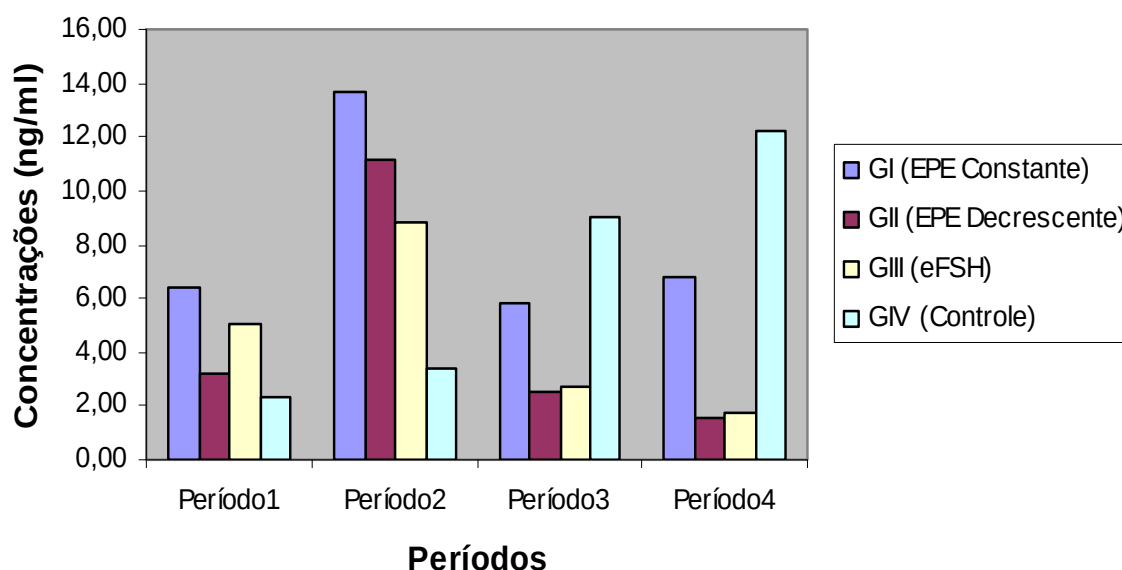


Figura 9 – Perfil das concentrações plasmáticas médias de LH nos diferentes períodos (1: pré trat.; 2: durante trat.; 3: ovulação e 4: pós trat.) nos grupos: EPE constante (GI), EPE decrescente (GII), eFSH (GIII) e Controle (GIV).

Quanto à avaliação durante os dias do ciclo, maiores concentrações de LH ($P < 0,05$) foram observadas nos grupos sob tratamento com EPE, em relação aos grupos eFSH e controle, do dia 01 de tratamento até o dia 06.

No entanto, como pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 6) o Grupo GIII (eFSH) apresentou valores estatisticamente semelhantes ao grupo controle na maior parte do tratamento.

Após a ovulação, as concentrações médias de LH começaram a serem superiores nos grupos GIV em relação aos demais grupos, apresentando diferença estatística no dia 2 pós-ovulação (dois dias após a ovulação) ($P < 0,05$). Os valores de

LH para cada um dos grupos de acordo com o dia do ciclo encontram-se na Tabela 6 e representados na forma de gráfico na Figura 10.

Tabela 6 – Valores médios diários de LH (ng/ml) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH, dois dias antes do início do tratamento até dois dias pós-ovulação.

Dias do ciclo	EPE constante (GI)	EPE decrescente (GII)	eFSH (GIII)	Controle (GIV)
-2	7,39±2,13 ng/ml	4,23±1,46 ng/ml	4,84± 2,12ng/ml	2,62± 1,03ng/ml
-1	5,41± 2,54ng/ml	2,26 ±1,73ng/ml	5,24± 2,01ng/ml	2,04± 0,67ng/ml
0 (Início do trat.)	8,92± 3,12ng/ml	13,47 ±5,67ng/ml	6,25 ±2,05ng/ml	1,91± 0,97ng/ml
+1	17,23± 7,09ng/ml ^a	17,07 ±6,23ng/ml ^a	5,24 ±3,18ng/ml ^b	2,97± 1,21ng/ml ^b
+2	16,72± 5,89ng/ml ^a	18,72 ±7,54ng/ml ^a	5,04 ±2,10ng/ml ^b	2,93± 1,90ng/ml ^b
+3	15,55 ±6,74ng/ml ^a	16,70 ±6,98ng/ml ^a	4,95 ±2,76ng/ml ^b	3,85± 1,76ng/ml ^b
+4	14,23± 8,79ng/ml ^a	14,23 ±9,54ng/ml ^a	4,86±1,98 ng/ml ^b	4,26± 2,00ng/ml ^b
+5	14,35 ±5,43ng/ml ^a	10,70 ±6,45ng/ml ^{ab}	4,22±1,56 ng/ml ^{bc}	4,52± 1,23ng/ml ^c
+6	13,80 ±5,67ng/ml ^a	8,46 ±2,43ng/ml ^b	3,50±1,77ng/ml ^b	5,01± 2,13ng/ml ^b
+7	12,32 ±4,89ng/ml	6,83 ±2,87ng/ml	2,75±1,20 ng/ml	7,36± 3,87ng/ml
D0 (Ovulação)	5,78 ±2,31ng/ml	2,50 ±1,01ng/ml	2,70 ±1,32ng/ml	9,04± 5,44ng/ml
D1	6,52 ±1,45ng/ml	1,63 ±0,56ng/ml	2,10± 0,97ng/ml	10,42± 8,98ng/ml
D2	7,09 ±2,98ng/ml ^b	1,42 ±0,23ng/ml ^b	1,58±0,25 ng/ml ^b	14,03±5,67 ng/ml ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

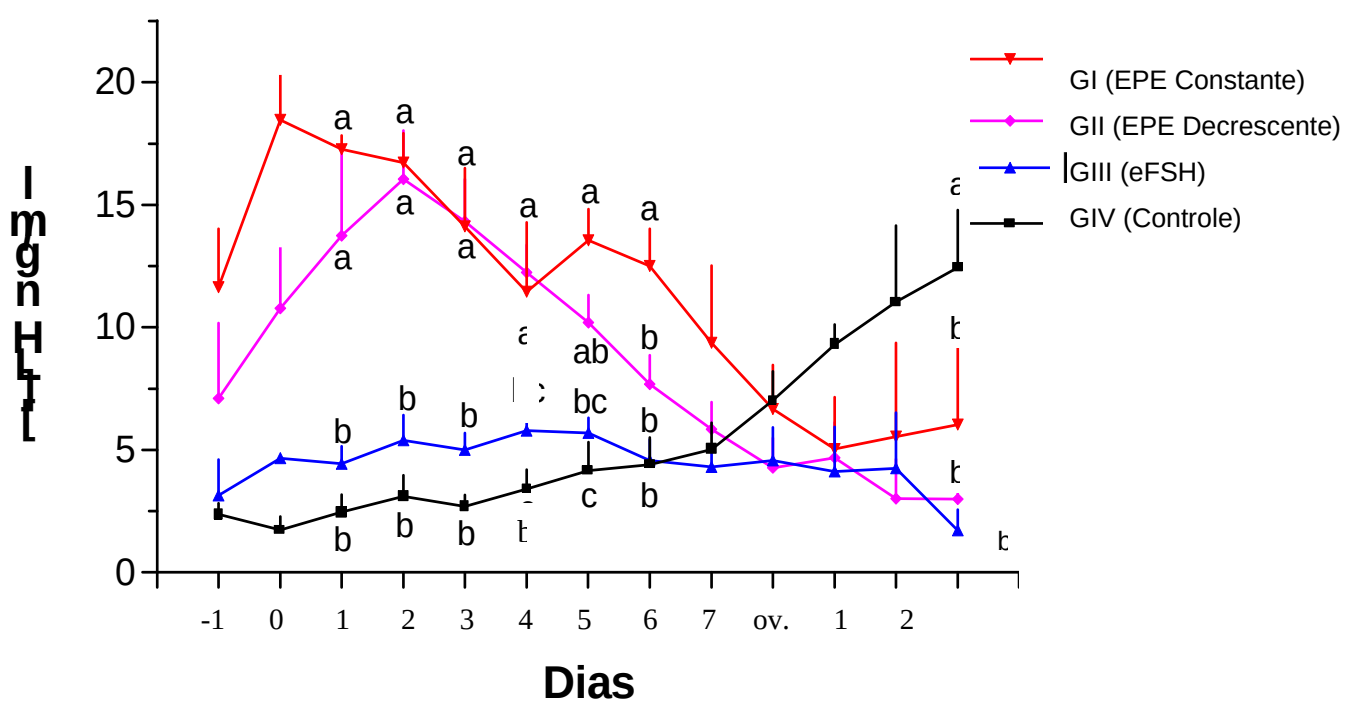


Figura 10 – Perfil médio das concentrações plasmáticas de LH durante os dias do tratamento (0- início do tratamento / ov = dia da ovulação) nos grupos: controle, EPE constante, EPE decrescente e eFSH.

4.6 Perfil hormonal de égua com formação de folículos anovulatórios

Em uma das éguas do GIII (grupo tratado com eFSH) foram detectados sete folículos pré-ovulatórios, dos quais dois ovularam e cinco luteinizaram. Os perfis hormonais de estrógeno, LH, FSH e inibina desta égua encontram-se apresentados na Figura 10.

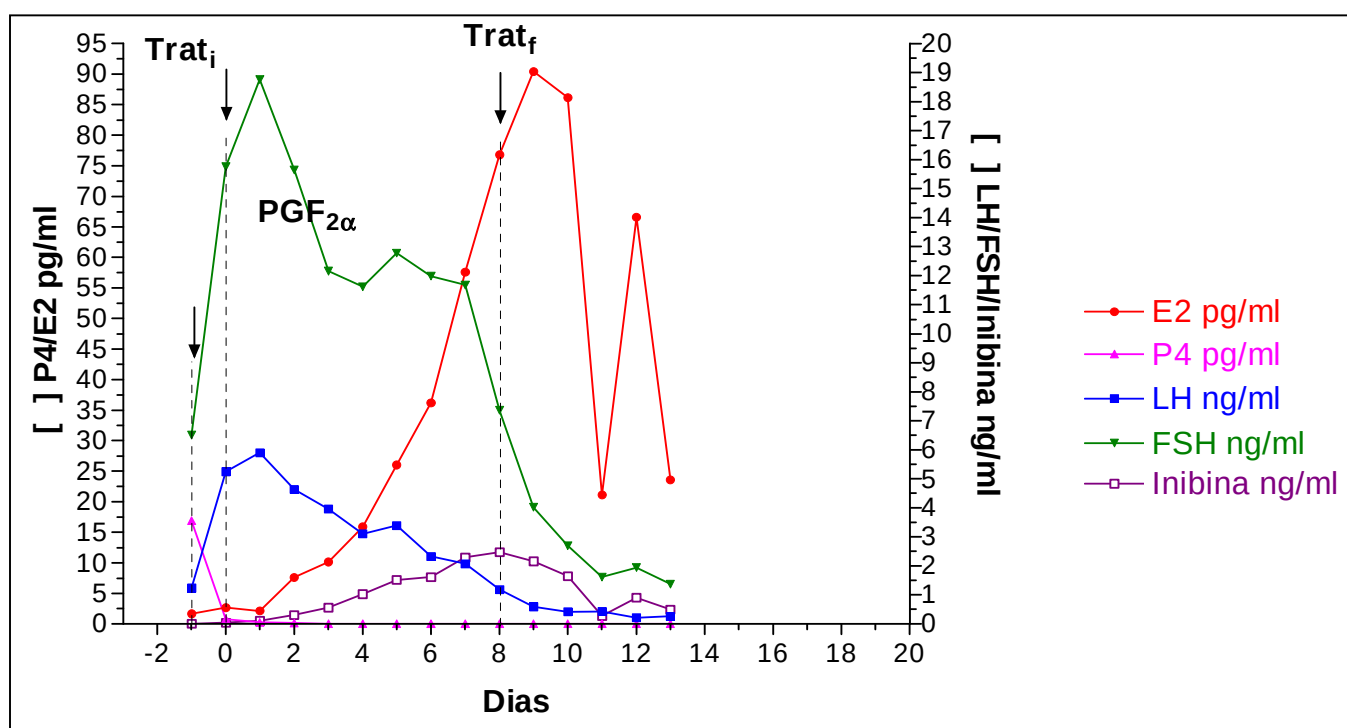


Figura 11 – Perfil hormonal das concentrações plasmáticas diárias de estradiol, progesterona, LH, FSH e inibina de uma égua do GII (eFSH), na qual 71,4% (5/7) de seus folículos pré-ovulatórios não ovularam, formando folículos anovulatórios.



Discussão

5- DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram um aumento significativo no número médio de ovulações e embriões recuperados nos grupos superovulados com EPE e eFSH, em relação ao grupo controle. As médias obtidas de 3,3 ovulações e 1,2 embriões nas éguas sob tratamento com doses constantes de 25mg de EPE (BID), 5,0 ovulações e 1,8 embriões nos animais sob terapia com doses decrescentes de EPE (BID) e 4,8 ovulações e 2,6 embriões nas éguas submetidas a aplicações de 12mg de eFSH (BID) estão próximos aos alcançados utilizando protocolos e dosagens semelhantes (Alvarenga *et al.*, 1998; Scoggin *et al.*, 2002; Carmo, 2003; Squires *et al.*, 2006; Squires & McCue, 2007).

Foram observadas, neste experimento, concentrações maiores de estradiol durante o tratamento em comparação ao controle. Isto poderia ser explicado pelo maior número de folículos maduros nos grupos superovulados (Kishi *et al.*, 1995), já que o estradiol é produzido pelas células da granulosa folicular (Ginther, 1992; Nagamine *et al.*, 1998). Aumentos semelhantes já foram detectados em outras espécies superovuladas, como cabras (Watanabe *et al.*, 1998) e vacas (Bervers & Dieleman, 1987; Bervers *et al.*, 1989; Desaulniers *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1997), bem como em mulheres (Michelon *et al.*, 2002). Contudo no grupo tratado com eFSH nos dias 3 e 4 foram observados níveis de estradiol cerca de 8 vezes maiores que o controle. Valores estes acima do número médio de folículos observados, indicando que o preparado purificado de FSH equino leva a uma maior atividade esteroidogênica por ser mais bioativo que o EPE.

Experimentos futuros envolvendo cultivo “in vitro” de células da granulosa, são necessários para confirmar estas hipóteses.

Em vacas superovuladas o pico de estradiol está altamente correlacionado com o número de ovulações (Saumande, 1980; Savage *et al.*, 1987; Callesen *et al.*, 1990). Esta mesma relação entre as concentrações de estradiol e o número de folículos/ovulações foi evidenciada, na espécie eqüina, ao considerarmos as correlações positivas obtidas neste trabalho entre as concentrações de estradiol e o número de folículos maiores ou iguais à 30mm nas éguas superovuladas, ovulações detectadas e embriões recuperados.

Levando-se em consideração o número médio de ovulações nos grupos (GI: 3,3; GII: 5,0; GIII: 4,8; GIV:1,0) e os valores médios de estradiol durante o período 2 (GI: $16,75 \pm 10,75$ pg/ml; GII: $16,26 \pm 10,69$ pg/ml; GIII: $29,52 \pm 14,93$ pg/ml; GIV: $7,78 \pm 6,81$ pg/ml), pode-se supor que estas dosagens hormonais são, ao menos parcialmente, decorrentes do número de folículos pré-ovulatórios que se desenvolveram em cada grupo. Não obstante, a presença de concentrações consideráveis de LH no EPE, o qual foi utilizado como agente superovulatório no GI e GIII, é capaz de estimular a luteinização folicular (Callesen *et al.*, 1986), podendo ter comprometido a produção de estradiol pela granulosa. O EPE utilizado neste estudo continha 493µg de LH e 331µg de FSH (60% e 40%, respectivamente).

Durante o período pré-ovulatório da égua, o pico de estradiol ocorre no ciclo estral dois dias antes da ovulação (Ginther *et al.*, 2005; Handler & Aurich, 2005). Isto pôde ser detectado em todos os grupos neste trabalho, com exceção do grupo tratado com eFSH (GIII). Neste, identificou-se o pico no dia 03 de tratamento, ou cinco dias antes da ovulação, alcançando o valor médio de $49,07 \pm 12,17$ pg/ml. É

possível que um maior estímulo da esteroidogênese, conforme descrito anteriormente, provado pela aplicação de FSH purificado eqüino, tenha antecipado a ocorrência do pico.

Em recente estudo, Ginther et al. (2006) demonstraram que em éguas apresentando folículos hemorrágicos anovulatórios podem-se detectar maiores concentrações sistêmicas de estradiol alguns dias antes da ovulação. O desenvolvimento de folículos anovulatórios em éguas superovuladas está associado à administração de altas doses de hormônios exógenos, em especial de eFSH (Squires, 2006).

Foi identificada, neste trabalho, conforme esperado, uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de estradiol e de FSH em todos os grupos. Correlação semelhante foi verificada por Bergfelt et al. (1991) e Roser et al. (1994). No ciclo estral eqüino, o estradiol é um dos hormônios responsáveis por inibir, através de *feedback* negativo, a liberação do FSH (Bergfelt & Ginther, 1986; Donadeu & Ginther, 2001), sendo importante durante o estabelecimento da dominância folicular (Webb et al., 1999).

Apesar do pico de estrógeno ocorrer durante o período pré-ovulatório dois dias antes da ovulação, as concentrações de estradiol em éguas normais já atingem valores mínimos no D0 (Handler & Aurich, 2005), fato este que não foi verificado nas éguas superovuladas deste trabalho. As altas concentrações de estradiol identificadas nos animais tratados podem estar relacionadas aos resultados insatisfatórios de recuperação embrionária em éguas superovuladas. Apesar de estatisticamente semelhantes, altas concentrações de estrógeno foram aparentemente detectadas nos grupos superovulados no dia da ovulação (período

3), bem como no D1 e D2 pós-ovulação (designados, em conjunto, como período 4). Estas concentrações atingiram, no mínimo, valores duas vezes maiores que os obtidos no grupo controle. No D2, por exemplo, as concentrações de estradiol foram de GI: $11,87 \pm 4,42$ pg/ml (EPE constante), GII: $7,34 \pm 2,84$ pg/ml (EPE Decrescente), GIII: $1,04 \pm 0,60$ pg/ml (eFSH) e GIV: $1,68 \pm 0,95$ pg/ml (controle).

Booth et al. (1975) detectaram um grande aumento nos níveis de estrógeno no terceiro dia pós-ovulação em vacas superovuladas, associando a pobre recuperação embrionária no sexto dia pós-ovulação aos efeitos deletérios do excesso deste hormônio na motilidade do trato genital, prejudicando o transporte de ovócitos. De acordo com Russel et al. (1980), níveis elevados de estrógeno podem interferir no processo de clivagem.

Sabe-se que o estradiol é capaz de induzir a vaso dilatação através de mecanismos genômicos e não-genômicos (Clapauch et al., 2007), sendo o edema endometrial durante o cio dependente dos níveis circulantes de estrógenos ovarianos (Chavatte & Palmer, 1998; Pelehach et al., 2000). Em mulheres superovuladas submetidas à FIV, o hiperestrogenismo leva a uma tendência à hipercoagulabilidade sangüínea, com aumento nas concentrações de fibrinogênio (Biron et al., 1997; Michelon et al., 2002) e redução do hematócrito (Michelon et al., 2002). Michelon et al. (2002) detectaram, ainda, aumentos no tempo de sangramento e de tromboplastina parcial ativada, os quais, contudo, não atingiram diferença estatística. Não obstante, a reposição hormonal com estrógeno a mulheres na menopausa leva a reduções nos níveis de anti-trombina III (Bonduki et al., 2007), predispondo à trombose venosa (Meade, 1997). É possível que as excessivas concentrações de estrógeno encontradas em éguas superovuladas tenham

contribuído para a ocorrência de alterações vasculares, levando a formação de coágulos de sangue na fossa de ovulação conforme observado por Carmo et al. (2006). O qual sugere ser este um fator que empeça a migração dos ovócitos para o oviduto em éguas superovuladas. Ginther et al. (2006) observaram níveis mais elevados de estradiol em éguas que desenvolveram folículos hemorrágicos.

No presente estudo, foi demonstrado a existência de uma correlação altamente positiva entre as concentrações de estradiol e inibina. Correlação similar foi anteriormente verificada por Nagamine et al. (1998). A inibina é um hormônio protéico produzido pelas células da granulosa, em especial de folículos dominantes (Handler & Aurich, 2005), da mesma forma que o estradiol (Ginther, 1992, Kishi et al., 1995), justificando, desta forma, a correlação obtida.

As concentrações de inibina atingiram, aparentemente, maiores valores numéricos em éguas superovuladas durante o período 2 (durante o tratamento), sem diferença estatística, diferenças que só foram verificadas no período 3 (dia da ovulação). Apenas nos grupos sob tratamento com eFSH (GIII) e EPE em doses decrescentes (GII) foram detectados maiores valores de inibina no período 3 em comparação ao controle, bem como uma correlação entre as concentrações de inibina e o número de ovulações. Levando-se em conta o número médio de ovulações nos grupos (GI: 3,3; GII: 5,0; GIII: 4,8; GIV: 1,0) e os valores médios de inibina durante o período 2 (durante o tratamento) (GI: $0,53 \pm 0,50$ ng/ml; GII: $0,70 \pm 0,51$ ng/ml; GIII: $1,03 \pm 0,89$ ng/ml e GIV: $0,29 \pm 0,11$ ng/ml), pode-se supor que estes resultados são, em grande parte, decorrentes do número de folículos pré-ovulatórios que se desenvolveram em cada grupo.

O perfil endócrino verificado em todos os grupos indicou um leve e contínuo aumento nas concentrações de inibina desde o início do tratamento, com os maiores valores médios obtidos no dia da ovulação. Os resultados do presente estudo corroboram os de Nagamine et al. (1998), os quais afirmam que a concentração circulatória de inibina imunoreativa aumenta durante o crescimento folicular, apresentando novo incremento durante o breve período da ovulação.

Por outro lado, os valores médios obtidos no período 3 (período da ovulação) foram superiores nos grupos superovulados com EPE decrescente (GII: $2,02 \pm 0,45$ ng/ml) e eFSH (GIII: $2,40 \pm 0,38$ ng/ml) do que os encontrados no controle (GIV: $0,42 \pm 0,07$ ng/ml) e o grupo EPE Constante obteve valores intermediários estatisticamente (GI: $0,99 \pm 0,21$ ng/ml). Esses dados concordam com o descrito por Nambo et al. (2006) que descrevem que o aumento transitório das concentrações de inibina no momento da ovulação pode estar relacionado com o extravazamento deste hormônio na cavidade abdominal com a ovulação. Portanto, um aumento no número de ovulações poderá resultar nesse aumento de inibina observado nos grupos superovulados em relação ao controle.

Logo após a ovulação, durante o período 4, foram encontradas concentrações inferiores de inibina, similares entre os grupos. Estes dados estão em acordo com os obtidos por Roser et al. (1994) e Nagamine et al. (1998), os quais demonstraram baixas concentrações circulantes de inibina durante a fase luteal.

Uma outra observação relacionada com o aumento dos níveis de inibina foi citado por Frazer (2003), onde éguas com tumores ovarianos do tipo granulosa-teca apresentam altos níveis de inibina, a qual se encontra maior que 0,7 ng/ml (700 pg/ml)

em, aproximadamente, 90% dos casos, sendo esta uma forma rotineira de diagnóstico desta patologia.

Possíveis efeitos da administração de LH, como o presente no EPE, sobre as concentrações de inibina não são conhecidos.

Quanto às concentrações circulantes de FSH, os grupos de animais superovulados apresentaram valores numéricos superiores desta gonadotrofina, em comparação ao grupo controle. O FSH possui longa meia-vida, de 5,5 a 10,8 horas (Briant *et al.*, 2004), sendo o seu *clearance* renal baixo, pois as gonadotrofinas são glicoproteínas sializadas que não se ligam às células hepáticas (Klett *et al.*, 2003), sendo eliminadas somente por filtração glomerular (Combarnous *et al.*, 2001). Concentrações maiores desta gonadotrofina, portanto, eram esperadas no perfil endócrino de animais superovulados, como consequência da aplicação exógena.

Apenas os grupos sob tratamento com EPE obtiveram maiores concentrações de FSH durante o segundo período em relação ao controle, enquanto os valores do grupo eFSH foram similares aos demais. Estas concentrações foram estatisticamente superiores, também, frente à avaliação das concentrações diárias de FSH nos dias 01 ao 07 de tratamento. De acordo com os dados obtidos por Briant *et al.* (2004), pode-se afirmar que a quantidade de FSH administrado aos grupos sob tratamento com EPE foi superior, justificando, desta forma, a diferença estatística obtida. Já as concentrações similares de FSH entre os grupos, identificadas durante os períodos 3 e 4, refletem a eliminação desta gonadotrofina pelos animais tratados, já que as aplicações de hormônios superovulatórios eram interrompidas quando da indução da ovulação. Contudo, a despeito de ter provocado um aumento sérico do FSH abaixo do EPE o número de folículos pré-ovulatórios e ovulações foi similar

quando comparados eFSH (4,8 ovulações), EPE Constante (3,3 ovulações) e EPE Decrescente (5 ovulações), demonstrando uma maior bioatividade do FSH eqüino purificado.

Valores elevados de FSH foram detectados nos dois dias antes do início do tratamento em todos os grupos, sendo correspondentes ao aumento esperado de FSH, o qual ocorre entre o D8 e o D10 (Handler & Aurich, 2005). Apenas o ciclo controle apresentou valores, aparentemente, decrescentes desta gonadotrofina, cujas médias ascenderam a partir da ovulação. Baixas concentrações de FSH no estro foram previamente verificadas em éguas (Nagamine *et al.*, 1998) e vacas (Watanabe *et al.*, 1990). Os valores médios ascendentes deste hormônio a partir da ovulação, os quais foram identificados somente no grupo controle, correspondem ao aumento dos níveis de FSH que ocorre durante ou logo após a ovulação (Handler & Aurich, 2005), o qual pode estar ausente em alguns ciclos estrais (Evans & Irvine 1975; Irvine, 1981). A elevação da secreção de FSH foi detectada em quatro das seis éguas (66,6%) do presente trabalho, justificando a média obtida.

Durante o segundo período (momento do tratamento), concentrações de LH superiores foram detectadas em ambos os grupos tratados com EPE. Fato semelhante pôde ser verificado entre os dias 01 e 04 de tratamento nestes dois grupos. Da mesma forma que o FSH, o LH se trata de uma glicoproteína com meia-vida longa, devido à quantidade de ácido siálico presente em sua composição (Combarnous *et al.*, 2001). As diferenças estatísticas obtidas nas concentrações de LH, neste período, se devem à administração exógena deste hormônio, bem como às doses empregadas.

Foram observadas no grupo controle maiores concentrações médias de LH no quarto período (pós ovulação), quando comparado ao grupo eFSH e EPE decrescente. Sabidamente a onda de LH é prolongada na espécie eqüina: inicia-se no estro, seis a sete dias antes da ovulação, para alcançar um pico um a dois dias após sua ocorrência (Whitmore *et al.*, 1973; Geschwind *et al.*, 1975).

Nos grupos superovulados com EPE foi observada uma aparente curva crescente das concentrações de LH desde o dia 0 até o dia 02 de tratamento, onde, a partir deste momento, houve aparentemente, um decréscimo gradativo, sendo este mais acentuado no GII.

O perfil de onda identificado nos grupos tratados com EPE não foi detectado no grupo tratado com eFSH (GIII), o qual apresentou valores pouco variáveis durante o ciclo até a ovulação.

Outro dado importante observado foi durante e após o processo de ovulação (período periovulatório), onde os grupos superovulados apresentaram aparentes curvas decrescentes de LH, enquanto no grupo controle o perfil plasmático de LH estava aparentemente crescente.

Nos grupos superovulados, observou-se que a conhecida curva ascendente peri-ovulatória de LH não ocorreu, dado o qual nos chamou a atenção nesse estudo, porque no grupo tratado com eFSH a curva ou o aumento na concentração de LH periovulatória foi inibida. Nos grupos tratados com EPE também foi observado um aparente decréscimo nas concentrações deste hormônio próximo da ovulação, enquanto que a curva no grupo controle apresentou-se, aparentemente, crescente.

Essa situação foi semelhantemente reportada em vacas superovuladas (Desaulniers *et al.*, 1995; Gosselin *et al.*, 1995; Price, 1995; Price *et al.*, 1998, Price, 1999).

Os dados obtidos em relação à diminuição das concentrações de LH podem ser explicados pelo trabalho recente de Ginther *et al.* (2007) os quais ao administrarem diferentes doses de Estradiol durante o ciclo estral de éguas, observaram que este hormônio teve efeito negativo nas concentrações basais de LH durante o ciclo estral, ou seja, indicam a alta relação recíproca entre o Estradiol e o LH.

Esses relatos podem elucidar a relação entre o aumento do número de folículos pré ovulatórios, nº de ovulações, aumento das concentrações de estradiol e diminuição ou inibição da curva periovulatória de LH, eventos esses observados nas éguas submetidas a tratamentos superovulatórios no presente estudo.

A presença do LH é essencial ao participar da fase final do desenvolvimento e da seleção folicular, devido aos receptores para LH em folículos dominantes antes da divergência (Bodensteiner *et al.*, 1996; Ginther *et al.*, 1996), sendo igualmente importante ao estimular a maturação nuclear ovocitaria *in vivo* (Dekel *et al.*, 1988, Hyttel *et al.*, 1991). Vacas que possuem ondas de LH precoces, tardias ou ausentes produzem quantidades significativamente menores de embriões frente à superovulação (Callesen *et al.*, 1986).

É possível que esta inibição da curva de LH possua relação com a imaturidade citoplasmática e nuclear de ovócitos provenientes de éguas superovuladas (Carmo, 2007). Contudo, esta observação foi obtida mediante a utilização de doses constantes de EPE, as quais, possivelmente, mantiveram níveis

plasmáticos consideráveis desta gonadotrofina nas éguas tratadas. Os efeitos deletérios desta inibição são ainda desconhecidos, já que a supressão do pico de LH com a utilização de um antagonista de GnRH associado ao hCG não levou a alterações na ovulação, formação do corpo lúteo ou produção embrionária (Briant *et al.*, 2003; 2004).

Na avaliação geral dos resultados supracitados, pode-se observar que o perfil endócrino de éguas superovuladas sofre alterações significativas. É possível que os resultados favoráveis, obtidos com doses inferiores de agentes superovulatórios (Farinasso *et al.*, 2005; Rocha Filho *et al.*, 2005) e em éguas com menor resposta ovariana (Carmo, 2007), possam ser explicados, mesmo que somente parcialmente, por alterações menos bruscas nas concentrações hormonais das éguas sob tratamento.



Conclusões

6. CONCLUSÕES

O resultado do presente experimento, nas condições em que foi realizado, nos permite concluir que:

- 1- O tratamento superovulatório seja com EPE ou FSH eqüino purificado leva a uma série de alterações no perfil hormonal. Algumas esperadas como o aumento sérico de LH e FSH durante o tratamento e outras não esperadas como a queda dos níveis de LH no período periovulatório.
- 2- O FSH equino purificado induz a uma maior atividade esteroidogênica, elevando excessivamente os níveis de estradiol.
- 3- O FSH eqüino purificado a despeito de levar a um aumento sérico de FSH inferior ao EPE induz a uma similar resposta ovariana, indicando ter este uma maior bioatividade.

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.**, 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.**, v.94, p.177-188, 1992.

ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G.; EVANS, M.J.; TAYLOR, T.B. Control of the onset of the breeding season in the mare, its artificial regulation by progesterone treatment and subsequent effects on the resistance to uterine infection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM EQUINE REPRODUCTION, n.74, Deauville. **Abstract...** Deauville, 1990. p.102-103.

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

ALLEN, W.R.; SANDERSON, M.W.; GREENWOOD, R.E.S.; ELLIS, D.R.; CROWHURST, J.S.; SIMPSON, D.J.; ROSSDALE, P.D. Induction of ovulation in anoestrous mares with a slow-release implant of a GnRH analogue (ICI 118 630). **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.35, p.469-478, 1987.

ALLEN, W.R.; URWIN, V.; SIMPSON, D.J.; GREENWOOD, R.E.S.; CROWHURST, R.C.; ELLIS, D.R.; RICKETTS, S.W.; HUNT, M.D.N.; WINGFIELD DIGBY, N.J. Preliminary studies on the use of an oral progestogen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares. **Equine Vet. J.**, v.12, p.141-145, 1980.

ALMEIDA, H.B.; VIANA, W.G.; ARRUDA, R.P.; OLIVEIRA, C.A. Estrus synchronization and follicular dynamics of crioulo mares by norgestomet, melengestrol acetate and altrenogest treatments. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, p.267-272, 2001.

-

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

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

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 Sci. Vet.**, v.31, p.216-217, 2003.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulation in Mares: Limitations and Perspectives. **Pferdeheilk**, v.24, p.88-91, 2008.

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7-24, 1993.

AURICH, C.; SCHLOTE, S.; HOPPEN, H.O.; KLUG, E.; HOPPE, H.; AURICH, J.E. Effects of the opioid antagonist naloxone on release of luteinizing hormone in mares during the anovulatory season. **J. Endocrinol.**, v.142, p.139-144, 1994.

BACK, D.G.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SEIDEL, G.E. Observations on the sexual behavior of nonlactating mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.165, p.717-720, 1974.

BALDIWIN, D.M.; ROSER J.F.; MUYAN M.; LASLEY B.; DYBDAL N. Direct effects of free and conjugated steroids on GnRH stimulated LH release in cultured equine anterior pituitary cells. **J Reprod Fertil Suppl**; v.44:327-332, 1991.

BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; BACCI, M.L.; FORNI, M.; MATTIOLI, M. Vascular endothelial growth factor production in growing antral pig follicles. **Biol. Reprod.**, v.63, p.858-864, 2000.

BARROS, C. M; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.53, p.1121-1134, 2000.

BERGFELT, D.R. Ovarian follicular wave dynamics in mares. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, p.104-124, 1998.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mares. **Theriogenology**, v.26, p.733-747, 1986.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.39, p.781-796, 1993.

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

BESOGNET, B.; HANSEN, B.S.; DAELS, P.F. Dopaminergic regulation of gonadotrophin secretion in seasonally anoestrous mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.108, p.55-61, 1996.

BESOGNET, B.; HANSEN, B.S.; DAELS, P.F. Induction of reproductive function in anestrous mares using a dopamine antagonist. **Theriogenology**, v.47, p.467-80, 1997.

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

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J., VAN TOL, H.T.; BLANKENSTEIN, D.M.; VAN DEN BROEK, J. Change in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and estradiol in cows after superovulation with PMSG. **J Reprod Fertil**, v.87, p.745-754, 1989.

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

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L. **Manual of equine reproduction**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 2003. 272p.

BODENSTEINER, K.J.; WILTBANK, M.C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.499-512, 1996.

BOGH, I.B.; HOIER, R.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Steroid concentrations in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. **Theriogenology**, v.54, p.877-888, 2000.

BOOTH, W.D.; NEWCOMB, R.; STRANGE, H.; ROWSON, L.E.; SACHER, H.B. Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. **Vet Rec**, v.97, p.366-369, 1975.

BOUR, B.; PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Stimulation of ovarian activity in the pony mare during winter anoestrus. In: ELLENDORFF, F.; ELSAESSER, F. (Eds). **Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.85-97.

BRASELTON, W.E.; McSHAN, W.H. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.139, p.45-48, 1970.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.165-171, 1997.

BRENDEMUEHL, J.P.; CROSS, D.L. Influence of the dopamine antagonist domperidone on the vernal transition in seasonally anoestrous mares. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.56, p.185-193, 2000.

BRIANT, C.; TOUTAIN, P.L.; OTTOGALLI, M.; MAGALLON, T.; GUILLAUME, D. Kinetics studies on production rate of equine (e) FSH in ovariectomized pony mares. Application of the determination of a dosage regime for eFSH in a superovulation treatment. **J Endocrinol**, v.1, p.43-54, 2004.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. (Eds). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 790–797.

BRUCK, I.; LEN-JENSEN, H. Multiple conception after spontaneous multiple ovulation in a mare. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE TRANSFER AND OTHER ADVANCED TECHNIQUE, v.4, 1997, Reims. **Proceedings...** Reims, 1997. p.77-79.

BURATINI, J.J. **Avaliação da dinâmica folicular e éguas da raça mangalarga utilizando a ultra-sonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante**. 1997. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BURGER, H.G.; IGARASHI, M. Inhibin: Definition and nomenclature, including related substances. **Endocrinology**, v.122, p.1701-1702, 1988.

BURNS, P. J.; DOUGLAS, R. H. Effects of daily administration of estradiol-17 β on follicular growth, ovulation, and plasma hormones in mares. *Biol Reprod*, v.24, p.1026-1031, 1981.

BURKHARDT, J. Transition from anoestrous in the mare and the effects of artificial lighting. **J. Agric. Sci.**, v.37, p.64-68, 1946.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Premature ovulations in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.28, p.155-166, 1987.

CARMO, M.T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, 2002, p.252-254.

CARNEIRO, G.F. **The influence of insulin-like growth factor-I on maturation and development em equine oocytes**. 2001. 120p. Dissertation – University of California, Davis.

CARNEVALE, E.M.; THOMPSON, K.N.; KING, S.S.; ROSZKOWSKI, J.J. Effects of age and diet on the spring transition in mares. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 42., 1996, Denver. **Proceedings...** Denver, 1996. p.146-147.

CLAYTON, H.M.; LINDSAY, F.E.F.; FORBES, A.C.; HAY, L.A. Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. **Appl. Anim. Ethol.**, v.7, p.169–174, 1981.

CLEAVER, B.D.; DAVIS, S.D.; GRUBAUGH, W.; SHEERIN, P.C.; SHARP, D.C. The role of constant light on circulating gonadotropin levels and on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovariectomized (OVX) pony mares. **Biol. Reprod.**, v.42, suppl.1, p.328, 1990. (abstract).

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v.60, p.855-865, 2003.

COSTA, W.P.; ALBUQUERQUE, J.F.G.; MOURA, C.E.B.; PEREIRA, H.M.; CARVALHO, R.C.; RESENDE, H.R.A.; JÁCOME, C.G.M.; SOUZA, J.A.T. Sincronização, indução ao estro e à ovulação em éguas Quarto-de-milha atletas (*Equus caballus*) no Nordeste brasileiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.57-59, 2003.

COY, R.E.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Follicular response of mares in deep or transitional anestrus to equine pituitary extract. In: EQUINE NUTRITION PHYSIOLOGY SYMPOSIUM, 16., 1999, Raileigh. **Proceedings...** Raileigh, 1999. p.65-68.

CUMMINS, L.J.; O'SHEA, T.; AL-OBAIDI, S.A.; BINDON, B.M.; FINDLAY, J.K. Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity. **J. Reprod. Fertil.**, v.77, p.365-372, 1986.

DAELS, P.F.; FATONE, S.; HANSEN, B.S.; CONCANNON, P.W. Dopamine antagonist-induced reproductive function in anoestrous mares: gonadotrophin secretion and the effects of environmental cues. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.56, p.173-183, 2000.

DAVIS, S.D.; SHARP, D.C. Intra-follicular and peripheral steroid characteristics during vernal transition in the pony mare. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.44, p.333-340, 1991.

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

DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of development. **Biol. Reprod.**, v.38, p.517-521, 1988.

DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, p.189-191, 2002.

DESAULNIERS, D.M.; LUSSIER, J.G.; GOFF, A.K.; BOUSQUET, D.; GUILBALT, L.A. Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. **Theriogenology** , v.44, p. 479-497, 1995.

DIPPERT, K.D.; 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**, v.38, p.695-710, 1992.

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

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v.124, p.875-885, 2002.

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. **Reproduction**, v.121, p.897-903, 2001.

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

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

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.

DRIANCOURT, M.A.; FRY, R.C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, v.27, p.279-292, 1992.

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

ELSDEN, R.P.; HASLER, J.F.; SEIDEL JR., G.E. Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v.6, p.523-529, 1976.

ELSDEN, R.P.; SEIDEL JR., G.E. **Procedures for recovery, bisection, freezing and transfer of bovine embryos**. 6. ed. Fort Collins: Colorado State University, 1995. n.9, p.6-7. (Animal Reproduction and Biotechnology).

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

EVANS, A.C.; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v.138, p.2963-2971, 1997.

EVANS, M.J.; IRVINE, C.H.G. Induction of follicular development and ovulation in seasonally acyclic mares using gonadotrophin-releasing hormones and progesterone. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.27, p.113-121, 1979.

EVANS, M.J.; IRVINE, C.H.G. Induction of follicular development, maturation and ovulation by gonadotropin releasing hormone administration to acyclic mares. **Biol. Reprod.**, v.16, p.452-462, 1977.

EVANS, M.J.; IRVINE, C.H.G. Measurement of equine follicle stimulating hormone and luteinizing hormone: response of anestrus mares to gonadotropin releasing hormone. **Biol. Reprod.**, v.15, p.477-484, 1976.

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. Anais da XIX reunião anual da SBTE, supl. 33; p135-138, 2005.

FAUSER, B.C.J.M.; HEUSDEN, A.M. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. **Endocr. Rev.**, v.18, p.71–106, 1997.

FAY, J.E.; DOUGLAS, R.H. Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.35, p.169-181, 1987.

FEVOLD, H.L. Extraction and standardization of pituitary follicle stimulating and luteinizing hormones. **Endocrinology**, v.24, p.435-446, 1939.

FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reprod. Fertil.**, v.6, p.127-139, 1994.

FITZGERALD, B.P.; AFFLECK, K.J.; BARROWS, S.P.; MURDOCH, W.L.; BARKER, K.B.; LOY, R.G. Changes in LH pulse frequency and amplitude in intact mares during the transition into the breeding season. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.485-493, 1987a.

FITZGERALD, B.P.; AFFLECK, K.J.; PEMSTEIN, R.L.; LOY, R.G. Investigation of the potencial of LHRH or na agonist to induce ovulation in seasonally anoestrous mares with observations on the use of the agonist in problem acyclic mares. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.35, p.683-684, 1987b.

FITZGERALD, B.P.; McMANUS, C.J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biol. Reprod.**, v.63, p.335-440, 2000.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; ALVARENGA, M. A.; DOUGLAS, R. H. Intervals to ovulation after treatment with oestradiol cypionate (ECP) or biorelease deslorelin (BRT-DES). Havemeyer Foundation Monograph Series n.14, p.89, 2004.

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

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.135-163, 2003.

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

FREEDMAN, L.J.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Influence of ovaries and photoperiod on reproductive function in the mare. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.27, p.79-86, 1979.

GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, p.1581-1584, 1975.

GARCIA, M. C.; GINTHER, O. J. Regulation of plasma LH by estradiol and progesterone in ovariectomized mares. **Biol. Reprod.**, v.19, p.477-453, 1978.

GARZA, F.; THOMPSON, D.L.; FRENCH, D.D.; WIEST, J.J.; St. GEORGE, R.L.; ASHLEY, K.B.; JONES, L.S.; MITCHELL, P.S.; McNEILL, D.R. Active immunization of intact mares against gonadotropin-releasing hormone: Differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. **Biol. Reprod.**, v.35, p.347-352, 1986.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; WILTBANK M.C.; GINTHER O.J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biol. Reprod.** v.61, p.31–39, 1999.

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

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

GESCHWIND, I.I.; DEWEY, R.; HUGHES, J.P.; EVANS, J.W.; STABENFELDT, G.H. Plasma LH levels in the mare during the oestrous cycle. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.23, p.207-212, 1975.

GINTHER, O. J.; GRIFFIN, P.G. Natural outcome and ultrasonic identification of equine fetal twins. **Theriogenology**, v.41, p.1193-1199, 1994.

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

GINTHER O.J., BEG M.A.,E.L. GASTAL, M.O. GASTAL Negative Effect of Estradiol on Luteinizing Hormone Throughout the Ovulatory Luteinizing Hormone Surge in Mares. **Biology of reproduction**, v.77, 543–550, 2007.

GINTHER, O.J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. **J. Equine Vet. Sci.**, v.13, p.18-25, 1993.

GINTHER, O.J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryos fixation in mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v.7, 1987, p.82-88.

GINTHER, O.J. **Reproductive biolog of the mare**: basic and applied aspects. 2. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1992. 640p.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.61-79, 2000.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, 1986. 378 p.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.4, p.197-213, 1988.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.119, 1990.

GINTHER, O.J.; MEIRA, C.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biol. Reprod.**, v.67, p.862-867, 2000.

GINTHER, O.J.; WENTWORTH, B.C. Effect of synthetic gonadotropin-releasing hormone on plasma concentrations of luteinizing hormone in ponies. **Am. J. Vet. Res.**, v.35, p.79-81, 1974.

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Follicle dynamics and selection in mares. **Anim. Reprod.**, v.1, p.45–63, 2004a.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. **Theriogenology**, v.38, p.807-821, 1992.

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v.105, p.417-423, 2008.

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

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**, v.21, p.471-483, 1984.

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

GOODMAN, R.L.; LEGAN, S.J.; RYAN, K.D.; FOSTER, D.L.; KARSCH, F.J. Two effects of estradiol that normally contribute to the control of tonic LH secretion in the ewe. **Biol Reprod**, v.23, p.415-422, 1980.

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

GOSSELIN N.; PRICE C. A.; ROY, R.; CARRIERE P.D. Decrease LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone. **Theriogenology**, v. 54, p.507-521, 2000.

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. Reprod.**, v.4, p.563-570, 1998.

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

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. **Biol. Reprod**, v.62, p.1322-1328, 2000.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Functional anatomy of reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000. p.1-68.

HANDLER, J.; AURICH, J.E. Physiologie des sexualzyklus der stute. In: AURICH, C. (Ed). **Reproduktionsmedizin beim Pferd**. Stuttgart: Parey Verlag, 2005. p.15-29.

HART, P.J., SQUIRES, E.L., IMEL, K.J., NETT, T.M. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. **Biol. Reprod.**, v.30, p.1055-1062, 1984.

HARTSHORNE, G.M.; SARGENT, I.L.; BARLOW, D.H. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles in vitro in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. **Hum. Reprod.**, v.9, p.1003-1112, 1994.

HAWK, H.W. Gamete transport in the superovulated cow. **Theriogenology**, v.29, p.125-142, 1988.

HENDERSON, K.M.; FRANCHIMONT, P.; LECOMTE-YERNA, M.J. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. **J. Endocrinol.**, v.102, p.305-309, 1984.

HILLMAN, R.B.; LOY, R.G. Oestrogen excretion in mares in relation to various reproductive states. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.23, p.223-230, 1975.

HINES, K.K.; AFFLECK, K.J.; BARROWS, S.P.; MURDOCH, W.L.; FITZGERALD, B.P.; LOY, R.G. Follicle-stimulating hormone pulse amplitude decreases with onset of the breeding season in the mare. **Biol. Reprod.**, v.44, p.516-521, 1991.

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

HOFFERER, S.; LECOMPTE, F.; MAGALLON, T.; PALMER, E.; COMBARNOUS, Y. Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.597-602, 1993.

HOUSEKNECHT, K.L.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E. The biology of leptin: a review. **J. Anim. Sci.**, v.76, 1998, p.1405-1420, 1998.

HUGHES, J.P.; STABENFELD, G.H.; EVANS, J.W. Estrus cycle and ovulation in the mare. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.161, p.1367-1374, 1972.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A.; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, p.217-226, 1995.

HYLAND, J.H.; WRIGHT, P.J.; CLARKE, I.J.; LARSON, R.S.; LANGFORD, D.A.; JEFFCOTT, L.B. Infusion of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) induces ovulation and fertile oestrus in mares during seasonal anoestrus. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.35, p.211-220, 1987.

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

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

JOHNSON A.L. Gonadotropin-releasing hormone treatment induces follicular growth and ovulation in seasonally anestrous mares. **Biol. Reprod.**, v.36, p.1199, 1987.

JOHNSON A.L. Induction of ovulation in anestrous mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.983-986, 1986.

JOHNSON A.L.; BECKER, S.E. Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrous mare. **J. Equine Vet. Sci.**, v.8, p.130, 1988.

JUENGEL, J.L.; BIBBY, A.H.; READER, K.L.; LUN, S.; QUIRKE, L.D.; HAYDON, L.J.; MCNATTY, K.P. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.25, p.78, 2004.

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

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.**, v. 46, p.1-14, 1997.

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

KOOISTRA, L.H.; GINTHER, O.J. Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, p.1413-1419, 1975.

KUBIAK, J.R.; CRAWFORD, B.H.; SQUIRES, E.L.; WRIGLEY, R.H.; WARD, G.M. The influence of energy intake and percentage of body fat on the reproductive performance of nonpregnant mares. **Theriogenology**, v.28, p.587-598, 1987.

LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. **J. Anim. Sci.**, v.44, p.834-842, 1977.

LINDZEY J.; JAVES FL; YATES MM; COUSE JF; KORACH KS. The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor-alpha. **J Endocrinol**, V.191, p309–317, 2006.

LOFSTEDT, R.M. Control of the estrous cycle in the mare. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.4, p.177-196, 1988.

LOGAN, N.L.; MCCUE, P.M.; ALONSO, M.A.; SQUIRES, E.L. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. *Anim Reprod Sci*, v.102, p.48-55, 2007.

LOOS, F.A.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; KRUIP, T.A.M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. **Theriogenology**, v.35, p.537-546, 1991.

LOSINNO, I.; AGUILAR, J..J.; LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. **Equine Embryo Transfer.**, v.3, p.81-83, 2000.

MACHADO, M.S. **Avaliação da dinâmica folicular de éguas superovuladas com extrato de pituitária equina e FSH equino purificado**. 2004. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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-se extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.506-508, 2003.

MCCUE, P.M. Superovulation. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.12, p.1-11, 1996.

McCUE, P.M.; CARNEY, N.C.; HUGHES, J.P.; RIVEIER, J.; YALE, W.; LASLEY, B.L. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against na inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, v.38, p.823-831, 1992.

McCUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASLEY, B.L. Effect on ovulation rate of passive immunization of mares against inhibin. **Equine Vet. J.**, suppl.15, p.103-106, 1993.

McKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASHEN, R.L.; GREENWOOD, P.E.; VASEY, J.R. Increased ovulation rates in mares after immunization against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. **Equine Vet. J.**, v.24, p.144-146, 1992.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.4, p.305-333, 1988.

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

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Identification of Potential Intrafollicular Factors Involved in Selection of Dominant Follicles in Heifers. **Biol. Reprod.**, v.63, p.811-819, 2000.

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

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v.47, p.3-12, 1997.

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

MOOS, J.; XU, Z.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase. **Dev. Biol.**, v.175, p.358–361, 1996.

NAGAMINE, N.; NAMBO, Y.; NAGATA, S.; NAGAOKA, K.; TSUNODA, N.; TANIYAMA, H.; TANAKA, Y.; TOHEI, A.; WATANABE, G.; TAYA, K. Inhibin secretion in the mare: localization of inhibin alpha, betaA, and betaB subunits in the ovary. **Biol. Reprod.**, v.59, p.1392-1398, 1998.

NAMBO, Y.; HASHIMOTO, K.; NAKAI, R.; ASAI, Y.; WATANABE, G.; TAYA, K. Biological Significance of Follicular Fluid discharged into the peritoneal cavity at ovulation in mares. **Animal Reprod Science**, v.94, p.228-231, 2006.

NAMBO, Y.; KANEKO, Y.; NAGATA, S.; OIKAWA, M.; YOSHIHARA, T.; NAGAMINE, N.; WATANABE, G.; TAYA, K. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.50, p.545-547, 1998.

NEQUIN, L.G.; KING, S.S.; JOHNSON, A.L.; GOW, G.M.; FERREIRA-DIAS, G.M. Prolactin may play a role in stimulating the equine ovary during the spring transition. **J. Equine Vet. Sci.**, v.13, p.631-635, 1993.

NEQUIN, L.G.; KING, S.S.; MATT, K.S.; JURAK, R.C. The influence of photoperiod on gonadotrophin-releasing hormone stimulated luteinising hormone release in the anoestrous mare. **Equine Vet. J.**, v.22, p.356-358, 1989.

NISWENDER, K.R.; ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.M.; HARDY, Q.P.; SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **J Equine Vet Sci**, v.23, p.497-500, 2003.

NISWENDER, K.D.; McCUE, P.M.; SQUIRES, E.L. Effect of purified equine follicle-stimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v.24, p.37-39, 2004.

NOAKES, D.E. **Fertility and obstetrics in cattle**. 2.ed. London: Blackwell Science, 1997. 146p.

NOYES, R.W. Fertilization of follicular ova. **Fertil. Steril.**, v.3, p.1-12, 1952.

ORLANDI, C.; BERGFELT, D.R.; WECHSLER, F.S; NOGUEIRA, G.P.; PUOLI FILHO, J.N.P.; MEIRA, C. Resposta ovariana durante a superovulação precedida pela emergência da onda folicular induzida por aspiração dos folículos em éguas cíclicas. **Anais da XX reunião anual da SBTE**, supl. 34; p. 278, 2006

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

OXENDER, W.D.; NODEN, P.A.; HAFS, H.D. Estrus, ovulation, and serum progesterone, estradiol, and LH concentrations in mares after an increased photoperiod during winter. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, p.203-207, 1977.

PALMER, E. Recent attempts to improve synchronisation of ovulation and to induce superovulation in the mare. **Equine Vet. J.**, suppl.3, p.11-18, 1985.

PALMER, E. Reproductive management of mares without detection of oestrus. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.27, p.263-270, 1979.

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

PERES, K.R. Avaliação do uso do Hormônio Folículos Estimulante equino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação em éguas na fase de transição de primavera. **Biblioteca digital da UNESP** (www.biblioteca.unesp.com.br) Cod. 1997, 2004

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

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the pre-ovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.359–368, 1985.

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

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

PRICE, C.A.; CARD R E, P. D.; GOSSELIN, N.; KOHRAM, H. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.37-46, 1999.

PRICE, C.A.; MORRIS, B.A.; O'SHEA, T.; WEBB, R. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p.161-168, 1987.

REMY, B.; BRUYAS, J.F.; BECKERS, J.F.; LEDUC, F.; FIÉNI, F.; TAINTURIER, D. Ovulation rates in donor mares treated with purified equine FSH. **Theriogenology**, v.47, p.394, 1997.

ROBINSON, G.; PORTER, M.B.; PELTIER, M.R.; CLEAVER, B.C.; FARMERIE, T.A.; WOLFE, M.W.; NILSON, J.H.; SHARP, D.C. Regulation of luteinizing hormone β and α messenger ribonucleic acid by estradiol or gonadotropin-releasing hormone

following pituitary stalk section in ovariectomized pony mares. **Biol. Reprod. Monogr. Ser.**, v.1, p.373-383, 1995.

ROCHA FILHO, A.N.; LOPES, E.P.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Efeito de baixa dose de extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado nas taxas de ovulações e recuperação embrionária em equinos. **Anais da XIX reunião anual da SBTE**, supl. 33; p. 196. 2005.

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

ROSER, J.F.; MCCUE, P.M., HOYE, E. Inhibin activity in the mare and stallion. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.87-100, 1994.

SAFIR, J.M.; LOY, R.G.; FITZGERALD, B.P. Inhibition of ovulation in the mare by active immunization against LHRH. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.35, p.229-237, 1987.

SCHIEWE, M.C.; HOWARD, J.G.; GOODROWE, K.L.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin $F_{2\alpha}$ synchronization is compromised by premature luteal regression. **Theriogenology**, v.34, p.469-486, 1990.

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.151-164, 2002.

SCOTT, T.J.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; SCOGGIN, C.F.; SQUIRES, E.L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology**, v.55, p.705-715, 2001.

SCRABA, S.T.; GINTHER, O.J. Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, v.24, p.667-679, 1985.

SEMENOV, V.V.; KITAEV, E.M.; ZELENINA, N.V. Ultrastructure of rat oocytes during the induction of superovulation. **Tsitologija**, v.28, p.1259-1261, 1986.

SHARP, D.C. Environmental influences on reproduction in horses. **Vet. Clin. North Am.**, v.2, p.207-223, 1980.

SHARP, D.C. Transition into the breeding season: clues to the mechanisms of seasonality. **Equine Vet. J.**, v.20, p.159-161, 1988.

SHARP, D.C.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Luteinizing hormone during sexual maturation in pony mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, p.584-586, 1979.

SHARP, D.C.; GRUBAUGH, W.R.; DAVIS, S.D.; WEITHENAUER, J.; SHEERIN, P. Effects of steroid administration on pituitary LH and FSH in ovariectomized pony mares in the early spring: pituitary responsiveness to GnRH and pituitary gonadotropin content. **Biol. Reprod.**, v.44, p.883-900, 1991.

SHARP, D. C.; WOLFE, M. W.; CLEAVER, B. D.; NILSON, J. Effects of estradiol-17 β administration on steady-state messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding equine α and LH/CG β subunits in pituitaries of ovariectomized pony mares. **Theriogenology**, v.55, p.1083-1093, 2001.

SILVIA, P.J.; SQUIRES, E.L.; NETT, T.M. Changes in the hypothalamic-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence. **Biol. Reprod.**, v.35, p.897-905, 1986.

SIROIS, J.; BALL, B.A.; FORTUNE, J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Vet. J.**, suppl. 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**, v.37, p.300, 1992.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MORGAN, G.L. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v.21, p.1-15, 2001.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.1-8, 2007.

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.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J.; VOSS, J.L.; SEIDEL, G.E. Comparasion of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone to superovulating mares. **Theriogenology**., v.26, p.661-670, 1986.

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**, v.28, p.609-613, 1987a.

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

SQUIRES, E.L.; ROWLEY, H.R.; NETT, T.M. Comparison of pulsatile versus constant release of GnRH for superovulation in mares. **Am. Soc. Anim. Sci.**, suppl.1, v.67, p.391-392, 1989. (abstract).

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Superovulation in collection and transfer of equine embryos. **Anim. Reprod.**, n.8, p.32-38, 1995.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E. Processos reprodutivos na fêmea. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. (Eds). **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.615-644.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 27, p.431-440, 1979.

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

THOMPSON, D. L.; GARZA JR, F.; ST. GEORGE, R. L.; RABB, M. H.; BARRY, B. E.; FRENCH, D. D. Relationships among LH, FSH and prolactin secretion, storage and response to secretagogue and hypothalamic GnRH content in ovariectomized pony mares administered testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, progesterone, dexamethasone or follicular fluid. *Domestic Animal Endocrinology*, v.8, p.189-199, 1991.

TOWNSON, D.H.; GINTHER, O.J. Size and shape changes in the preovulatory follicle in mares based on digital analysis of ultrasonic images. **Anim. Reprod. Sci.**, v.21, p.63-71, 1989.

TURNER, D.D.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and gonadotropic changes throughout the year in pony mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, p.1694-1700, 1979.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; WEBER, J.A. PGE₂ secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. **Equine Vet. J.**, suppl.15, p.24-27, 1993.

WALTON, E.A.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte normality after superovulation in immature rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.67, p.309-314, 1983.

WATSON, E.D.; AL-ZI'ABI, M.O. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mare during spring transition and the breeding season. **Reproduction**, v.124, p.227-234, 2002.

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

WEBEL, S.K.; SQUIRES, E.L. Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 32, p.193-198, 1982.

WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. **Equine Vet. J.**, suppl.15, p.36-38, 1993.

WESSON, J.A.; GINTHER, O.J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. **J. Anim. Sci.**, v.52, p.119-129, 1981.

WHITMORE, H.L.; WENTWORTH, B.C.; GINTHER, O.J. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **Am. J. Vet. Res.**, v.34, p.631-636, 1973.

WIEPZ, G.J.; SQUIRES, E.L.; CHAPMAN, P.L. Effects of norgestomet, altrenogest, and/or estradiol on follicular and hormonal characteristics of late transitional mares. **Theriogenology**, v.30, p.181-193, 1988.

WISE, T.; MAURER, R.R. Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge and progestin inhibition of LH surge. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.35-38, 1994.

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

WOODS, G.L.; GINTHER, O..J. Follicular dynamics in mares treated with na equine pituitary extract. **Theriogenology**, v.23, p.297-308, 1985.

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, v.20, p.347-355, 1983b.

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

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Ovarian response, pregnancy rate and incidence of multiple fetuses in mares treated with an equine pituitary extract. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.32, p.415-421, 1982.

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