

MILENA DA SILVA MACHADO

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR EM ÉGUAS
SUPEROVULADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA
EQUINA E FSH EQUINO PURIFICADO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal.

Orientador : Prof. Adj. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Botucatu

2004

Machado, Milena da Silva.

Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado / Milena da Silva Machado. – 2004.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução

CDD 636.108926

Palavras-chave: Dinâmica folicular; Égua; Extrato de pituitária eqüina; FSH eqüino purificado, Superovulação

*“A vida só pode ser compreendida olhando-se
para trás,
mas só pode ser vivida olhando-se para frente”*

(Soren Kierkegaard)

Dedico este trabalho....

*À minha mãe **Marli** que sempre me apoiou e
encorajou em todos os momentos da minha
vida.*

*Pelo seu amor, carinho, amizade, exemplo e
confiança.*

*Ao meu namorado **Luciano**, que tem sido meu maior estímulo, pelo amor, carinho e companheirismo não só neste trabalho, mas na minha vida.*

*À minha irmã, **Miriana** pela força que me transmite.
À **minha família**, que mesmo à distância me apoiou nos momentos mais difíceis.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga**, pelos ensinamentos passados durante estes últimos anos, apoio durante este trabalho e especial pela confiança, amizade e muita paciência.

À grande amiga **Dr^a. Neiva Deprá** a quem devo a disciplina e conhecimentos adquiridos, pelo entusiasmo, confiança e amizade.

À **Prof^a. Fernanda** e **Prof. Meira** por estarem sempre prontos a ajudar nos momentos que precisei.

À **Prof^a. Eunice Oba** pelos ensinamentos, dedicação e ajuda na concretização deste trabalho.

Aos **Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária** Sony, Papa, Nereu, Denise e João pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária **Miguel, Valter, Edílson, Márcio, Cristina e Marco** pela amizade e inúmeras ajudas prestadas para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas **Karen, Patrícia, Claudinha, Alexandre, Letícia, Gustavo (Bigu), Elen, Marcelo, Karen Peres, Luciana Leal** pelos momentos alegres que proporcionaram e pela amizade.

Aos colegas de Pós-Graduação: **Celi, Márcio, Alexandre, Gustavo, Antonio Sylvio e Renato**, pela ajuda e colaboração. Ao amigo **Marçel (Fester)** pela colaboração e ajuda nos experimentos.

Ao **Laboratório Bioniche** pelo fornecimento do FSH eqüino Purificado.

À **Dr^a. Jannet Roser** pela realização das dosagens hormonais.

À **Socil Guyomarch** pelo fornecimento da ração para a alimentação dos animais.

E, principalmente a **DEUS** por permitir este momento.

A todos, o meu MUITO OBRIGADA!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	25
2.	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1.	Ciclo Estral	28
2.2.	Dinâmica Folicular	29
2.2.1	Oogênese	30
2.2.2	Foliculogênese	31
2.2.3	Ondas Foliculares	32
2.2.4	Divergência e Seleção do Folículo Dominante	34
2.2.5	Atresia e ovulação	36
2.3	Endocrinologia do Ciclo Estral	38
2.4	Superovulação em éguas	40
2.4.1	Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)	41
2.4.2	Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH)	41
2.4.3	Imunização Contra a Inibina	41

2.4.4	Extrato de Pituitária Eqüina (EPE).....	42
2.4.5	Hormônio Folículo Estimulante (FSH)	45
2.5	Alterações em fêmeas Superovuladas	46
3.	MATERIAL E MÉTODO	51
3.1.	Experimento 1	51
3.1.1	Animais	51
3.1.2	Preparação de Extrato de Pituitária	52
3.1.3.	FSH Eqüino Purificado.....	53
3.1.4.	Tratamentos	53
3.1.5.	Avaliação Ultra-sonográfica	55
3.1.6.	Análise Estatística	56
3.2.	Experimento 2	61
3.2.1	Animais	61
3.2.2	Colheita dos Embriões	61
3.2.3	Ensaio Hormonais	62
3.2.4	Análise Estatística	63
4.	RESULTADOS	65
4.1	Experimento 1	65
4.2	Experimento 2	75
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÃO	106
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Bi	Blastocisto Inicial
Bl	Blastocisto
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bx	Blastocisto Expandido
CL	Corpo Lúteo
Const.	Constante
Dec.	Decrescente
E2	Estradiol - 17 β
eCG	Gonadotrofina Coriônica Eqüina
eFSH	Hormônio Folículo Estimulante Eqüino
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EPE	Extrato de Pituitária Eqüina
EV	Endovenoso
FIV	Fertilização <i>in-vitro</i>
Fol.	Folículo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSHp/pFSH	Hormônio Folículo Estimulante Suíno

GI / GII / GIII / GIV	Grupo I / Grupo II / Grupo III / Grupo IV
GIFT	Transferência Intrafalópio de Gametas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotrofina da Menopausa Humana
IA	Inseminação Artificial
ICSI	Injeção de Espermatozóide Intra - Citoplasmática
IGF1 / IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 / 2
IM	Intramuscular
LH	Hormônio Luteinizante
MFP	Fator Promotor de Maturação
Mo	Mórula
Nº	Número
OMI	Fator Inibitor de Maturação do oócito
OV.	Ovulação
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PMSG	Gonadotrofina do Soro da Égua Prenha
Trat.	Tratamento
SO	Superovulação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no início do tratamento (D0), conforme grupos.	65
Tabela 2 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no primeiro dia após o início do tratamento (D1), conforme grupos.....	66
Tabela 3 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no segundo dia após o início do tratamento (D2), conforme grupos.	67
Tabela 4– Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no terceiro dia após o início do tratamento (D3), conforme grupos.....	68
Tabela 5 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no quarto dia após o início do tratamento (D4), conforme grupos.....	69
Tabela 6 – Média e desvio padrão da taxa decrescimento e diâmetro de folículo, conforme grupos.....	73
Tabela 7 – Percentual de éguas que apresentaram de 0 a 2, 3 a 5 e mais de 5 ovulações, conforme grupos.....	76
Tabela 8 – Média e Desvio Padrão dos dias de tratamento, intervalos entre a aplicação da PGF e ovulações e entre ovulações, conforme grupos.....	77
Tabela 9 – Média e desvio padrão do número de ovulações e número de embriões recuperados, conforme grupos.....	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo I (EPE Constante). A dose de 25mg de EPE foi aplicada, diariamente, duas vezes ao dia..... 57
- Figura 2 - Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo II (EPE Decrescente). As doses decrescentes de EPE utilizadas foram em mg (miligramas) e aplicadas duas vezes ao dia, com intervalos de 12 horas..... 58
- Figura 3 - Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo III (FSH eqüino purificado). As doses de eFSH (12,5mg) foram administradas duas vezes ao dia, com intervalos de 12 horas..... 59
- Figura 4 - Ficha de acompanhamento diário, individual, utilizada para o mapeamento folicular..... 60
- Figura 5 - Número médio de folículos de 10 a 15 mm e 16 a 20mm de diâmetros observados nos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente), GIII (FSH) e GIV (Controle) durante os dias de tratamento..... 70
- Figura 6 - Número médio de folículos de 21 a 30mm e >30mm de diâmetros observados nos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente), GIII (FSH) e GIV (Controle) durante os dias de tratamento..... 71

Figura 7 - Perfil médio de crescimento dos folículos que atingiram a dominância dos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente), GIII (FSH) e GIV (Controle) durante os dias de tratamento..... 74

Figura 8 - Número médio de ovulações e embriões recuperados, segundo grupos. GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle)..... 82

Figura 9 - Dinâmica folicular, durante os dias de tratamento, observada no grupo GI (EPE Constante), individualmente. (—◆ folículos que ovularam; — folículos subordinados)..... 83

Figura 10 - Dinâmica folicular, durante os dias de tratamento, observada no grupo GII (EPE Decrescente), individualmente.(—◆folículos que ovularam; — folículos subordinados)..... 84

Figura 11 - Dinâmica folicular, durante os dias de tratamento, observada no grupo III (FSH eqüino purificado) individualmente. (—◆ folículos que ovularam; — folículos subordinados)..... 85

Figura 12 - Dinâmica Folicular observada ao longo dos dias de tratamento da égua 2, Grupo III. (—◆folículos que ovularam; —folículos subordinados)..... 86

Figura 13 - Dinâmica Folicular observada ao longo dos dias de tratamento da égua 6, Grupo III, a qual não ovulou durante o período observado..... 86

Figura 14 - Perfil médio de crescimento folicular ao longo dos dias de tratamento observados no grupo GIV (Controle)..... 87

Figura 15 - Perfil de crescimento folicular ao longo dos dias do tratamento e concentrações plasmáticas de Progesterona observadas na égua 1 do grupo 1 (EPE Constante) que apresentou ovulação de um folículo de 25mm de diâmetro no segundo dia de tratamento..... 88

Figura 16 - Perfil de crescimento folicular ao longo dos dias do tratamento e concentrações plasmáticas de Progesterona observadas na égua 4 do grupo 2 (EPE Decrescente) que ovulou um folículo de 25,2mm de diâmetro no quinto dia de tratamento..... 89

Figura 17 - Imagens ultra-sonográficas observadas no segundo (A) e quarto dia (B) do tratamento superovulatório com EPE Decrescente (Grupo II), na égua 5.....90

Figura 18 - Imagens ultra-sonográficas observadas no terceiro dia (A) e sétimo dia (B) do tratamento superovulatório com eFSH (Grupo III), na égua 2.....91

Figura 19 - Imagem ultra-sonográfica observada no terceiro dia do tratamento superovulatório com EPE Constante (Grupo I), na égua 4..... 92

Figura 20 - Embriões recuperados de égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (égua 4)..... 93

Figura 21 - Embriões e ovócito recuperados de égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (égua 2)..... 93

MACHADO, M.S. Avaliação da Dinâmica Folicular em éguas superovuladas com Extrato de Pituitária Eqüina e FSH Eqüino Purificado. Botucatu, 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

RESUMO

Vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de criar e aperfeiçoar protocolos para a superovulação eqüina. O extrato de pituitária eqüina (EPE) é um preparado parcial de gonadotrofina eqüina, sendo o único composto que regularmente induz ovulações múltiplas em éguas. Contudo, a resposta superovulatória e a taxa de embriões recuperados têm sido baixas, quando comparadas com outras espécies. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram uma melhora no percentual de ovulações múltiplas em éguas superovuladas com a administração do EPE duas vezes ao dia e em doses decrescentes, porém, com baixas taxas de recuperação embrionária. Estudos em bovinos demonstraram que altas contaminações de LH nos preparados hormonais, são deletérias para a resposta ovariana, qualidade dos embriões e fertilidade. A administração do FSH purificado duas vezes ao dia com doses decrescentes, elevou a taxa de embriões recuperados e qualidade dos embriões em vacas. Devido aos baixos índices obtidos até o momento com superovulação em éguas, a proposta do nosso trabalho foi de caracterizar a dinâmica de crescimento folicular, resposta superovulatória e produção de embriões em éguas tratadas com dois diferentes protocolos de EPE (doses constantes e decrescentes) e FSH eqüino purificado (Bioniche-Canadá). Foram utilizadas seis éguas em bom estado nutricional, com idade entre 4 e 15 anos e massa corpórea de 400 a 500 Kg, com bom histórico reprodutivo. Essas éguas passaram por quatro tratamentos: GI (EPE 25mg/IM, duas vezes ao dia), GII (EPE em doses decrescentes- 40, 35, 30, 25, 20, 15 e 10mg duas vezes ao dia), GIII (FSH eqüino purificado 12,5mg/IM, duas vezes ao dia) e GIV

(Controle). Essas éguas foram monitoradas diariamente para a detecção da ovulação e os tratamentos foram iniciados no sétimo dia pós-ovulação. Nos três grupos, o tratamento foi interrompido quando a maioria dos folículos atingiu diâmetro de ≥ 35 mm, neste momento foi administrado 3000UI de hCG. As colheitas dos embriões foram realizadas no oitavo dia após a detecção da primeira ovulação. Foi observada uma correlação positiva entre a população de folículos de 16-20mm de diâmetro 48 horas após o início do tratamento e o número de ovulações em todas os grupos tratados. Além disso, no grupo II foi observada uma correlação positiva entre o número de folículos de 16 a 20mm de diâmetro e o número de embriões recuperados. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com EPE em doses constantes, decrescentes e o FSH equino purificado quanto ao número de folículos de diferentes tamanhos nos demais dias de tratamento e taxa de crescimento do(s) folículo(s) dominante(s) ($P > 0,05$). O número de ovulações por égua foi similar entre os tratamentos superovulatórios (GI=3,3 \pm 1,6; GII=5,0 \pm 2,1; GIII=4,8 \pm 1,3) e significativamente maior ao GIV. O número de embriões recuperados apresentou tendência a ser superior ($P=0,067$) para as éguas tratadas com FSH equino purificado (GIII). Uma média de 1,2 \pm 1,3; 1,8 \pm 1,3; 2,6 \pm 0,5 e 0,5 \pm 0,5 embriões por lavado foram recuperados nas éguas dos grupos I, II, III e IV, respectivamente. O FSH equino purificado foi capaz de elevar o número embriões recuperados por lavado comparado ao grupo controle. Baseados nos resultados do presente estudo, concluímos que houve diferenças na dinâmica de crescimento folicular entre os tratamentos superovulatórios, a resposta superovulatória pode ser estimada pela avaliação da população folicular durante o tratamento e que o FSH equino purificado mostrou uma tendência a ser superior na habilidade de elevar a produção de embriões em éguas superovuladas.

Palavras chave: Dinâmica Folicular, Égua, Extrato de Pituitária Equina, FSH Equino Purificado, Superovulação.

MACHADO, M.S. Evaluation of Follicular Dynamic in mares treated with Equine Pituitary Extract and Purified Equine FSH. Botucatu, 2004. Dissertation (Mastership) – Animal Reproduction – College of Veterinary and Zootecnia - University of São Paulo State “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Several methods have been studied aiming to superovulated mares. Equine pituitary extract (EPE) has been the compound most used to induce multiple ovulation in mares, however in despite the consistent superovulation response the embryo recovery rate is lower than expected. In our laboratory, we observed that twice-daily administration of EPE increases superovulatory response, with a still low embryo recovery rate. Studies in cows have shown that LH high contamination in the FSH base prepared, affects adversely ovarian response, embryo quality and fertility rate. Administration of purified FSH twice daily in decreasing doses increased the quality of the embryos and also the embryo recovery rates in cows. This experiment was conducted to study the follicular dynamics superstimulatory (SO) response and embryo production in mares treated with two different EPE protocols (constant and decreasing doses) and purify equine FSH (Bioniche, Canada). Six crossbreed mares were utilized, the same animals were used in all experimental groups to avoid individual variability, as follows Group I (EPE 25mg/IM, twice daily), Group II (EPE in decreasing doses (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10) twice daily, Group III (equine FSH 12mg/IM, twice daily) and Group 4 (control). Follicular growth and ovulation were monitored daily by trans-rectal palpation and ultrasonography. Treatments were discontinued when the majority of follicles reached 35 mm of diameter and 3000UI of hCG was administered. Results were analyzed by Pearson Correlation Coefficients and Analysis of Variance. In group 2, it was observed a positive correlation between the number of initial follicles with 16-20mm and embryo production. However,

48 hours after the start of the treatment it was observed a positive correlation ($P < 0,05$) between populations of follicles with 16-20mm of diameter and number of ovulations in all treated groups. Follicular growth rate per day was similar between treated and non treated mares. After one day of treatment was observed on GI and GII a higher number ($P < 0,05$) on the population follicles between 16-20 mm. In other treated days no differences were observed on follicle population among groups. N° ovulation/mare was similar ($p > 0.05$) between the SO treatments (GI=3.3±1.6; GII=5.0±2.1; GIII= 4.8±1.3) and significantly higher ($p < 0.05$) than the control group (1,0±0). The number of embryos recovered per mare tended to be statistically higher ($P = 0.067$) on FSH treated mares. A total of 1.2±1.3; 1.8±1.3; 2.6±0.5; 0.5±0.5 embryos per flush were recovered of mares on GI, GII, GIII and GIV, respectively. Equine FSH allowed a five-fold improvement on embryo production when compared with no treated mares. Based on the results of the present study we can concluded that there are differences on follicular dynamic between SO treatments, the SO answer can be predicted by evaluation of follicle population during treatment and that equine FSH showed a tendency to be superior than EPE in the ability to improved embryo production in SO mares.

Key words: Follicular Dynamics, Mare, Equine Pituitary Extract, Purified Equine FSH, Superovulation.

I ntrodução

1- INTRODUÇÃO

No mercado do cavalo, se faz necessário um maior aproveitamento e intensificação do ritmo do melhoramento genético e eficiência reprodutiva dos animais. Para isso, se faz necessário a utilização de determinadas biotecnologias reprodutivas para se alcançar estes objetivos e, ao mesmo tempo, diminuir os custos envolvidos em Programas de Transferência de Embriões. Com este propósito, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de criar e aperfeiçoar protocolos para a superovulação eqüina, técnica que visa aumentar o número de embriões coletados, através da elevação da taxa de ovulação por ciclo. Tal biotecnologia tem como objetivo suprir a demanda existente em relação a produtos geneticamente superiores em sistemas de produção eqüina.

Estudos têm demonstrado que a espécie eqüina é refratária a drogas superovulatórias comumente utilizadas com sucesso em outras espécies, tais como o FSH suíno e PMSG. O único composto que, regularmente, induz uma resposta superovulatória em éguas é o Extrato de Pituitária Eqüina (EPE), porém a resposta superovulatória é baixa quando comparada a outras espécies domésticas. No entanto, um estudo recente realizado em nosso laboratório demonstrou que o EPE aplicado em maior freqüência e em doses constantes permitiu a obtenção de índices satisfatórios de múltiplas ovulações em éguas (7.0 ovulações/égua), porém os índices de recuperação embrionária apresentaram-se aquém do esperado.

Monniaux et al. (1983) obtiveram uma melhor estimulação ovariana em bovinos quando a gonadotrofina foi administrada duas vezes ao invés de 1 vez ao dia e também utilizando doses decrescentes. Com este tratamento obtiveram melhores taxas de ovulação e recuperação de embriões. Sendo este o protocolo padrão utilizado em programas de Transferência de Embriões em Bovinos.

Trabalhos com bovinos demonstraram que um alto nível de LH presente no preparado do FSH afeta adversamente a resposta ovariana, a taxa de fertilidade e a qualidade dos embriões, fazendo-se necessária a diminuição gradativa do FSH e LH aplicados.

Para o aprimoramento da técnica de superovulação em eqüinos, faz-se necessário o entendimento dos fatores relacionados a baixa resposta superovulatória e baixas taxas de recuperação embrionária, sendo para isto necessário o conhecimento e caracterização da dinâmica de crescimento folicular e dos eventos endócrinos que ocorrem em éguas submetidas a tratamentos superovulatórios.

O presente trabalho objetivou estudar diferenças na dinâmica ovariana entre éguas tratadas com Extrato de pituitária eqüina (EPE) (doses constantes e decrescentes) e FSH eqüino purificado, associando também achados da dinâmica com resposta superovulatória e produção de embriões. Também foi comparada a eficiência do FSH eqüino purificado contra o EPE no que diz respeito a indução da superovulação e produção de embriões.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral Eqüino

A clássica definição de ciclo estral é o intervalo entre duas ovulações (MCKINNON & VOSS, 1993). Este período compreende eventos estruturais e hormonais de duas fases distintas; estro ou fase folicular e diestro ou fase luteal (ANDRADE, 1986).

A duração média do ciclo estral varia de 19 a 22 dias, sendo que a fase luteal e fase folicular apresentam 14 a 15 dias e 5 a 7 dias, respectivamente. A duração do estro eqüino tem sido considerada muito variável entre vários autores, podendo variar de 2 a 12 dias. Estas variações podem ser de origem racial, individual, estação do ano e de diferentes métodos de avaliação do estro, além da dificuldade de predizer as fases exatas do estro e do diestro (GINTHER, 1992a; MCKINNON & VOSS, 1993).

A fase de estro ou fase folicular em éguas é caracterizada pela presença de um folículo dominante de 30 mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógeno pelas células da granulosa (GINTHER, 1992a). Em éguas Pôneis, Ginther et al. (2002) relataram uma dominância "deviation" folicular quando o folículo alcança um tamanho de 22,5 mm.

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem ao comportamento de estro e a elevação dos níveis de LH, pela ativação dos seus receptores na célula da granulosa, conseqüentemente, induzem a ovulação e a formação do corpo lúteo (GINTHER, 1992a).

A elevação dos níveis de estrógeno durante a fase estral, também é responsável pela instalação do edema uterino, o qual tende a diminuir dois dias antes da ovulação (BURATINI, 1997).

Já a fase de diestro ou luteal é caracterizada pelo término das manifestações dos sinais de cio, que ocorrem entre as 24 e 48 horas após a ovulação, resultando na formação do corpo lúteo (NEELY et al., 1989). Sirois et al. (1989), consideram a ovulação como o início da fase luteal. Na fase luteal, o corpo lúteo produz progesterona

em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia do ciclo estral. Esta secreção se mantém estável até o décimo segundo dia, quando ocorre uma queda acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona, ocasionando a luteólise entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo estral, a qual apresenta níveis plasmáticos de progesterona inferiores a 1 ng/ml (GINTHER, 1992a).

As fêmeas eqüinas são classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais, por apresentarem atividade sexual durante a época de maior luminosidade. Elas atingem a maturidade sexual ao alcançar a puberdade, o que ocorre por volta dos dois anos de idade; podendo ser alterada pela influência das condições corporais, peso, níveis de energia, ferormônio e a estação do ano (MCKINNON & VOSS, 1993).

Com o advento da ultra-sonografia, na década de 80, obteve-se uma maior precisão da atividade ovariana, no que diz respeito ao recrutamento, crescimento, divergência e atresia folicular (PALMER & DRIANCOURT, 1980), tendo sido relacionada a dinâmica folicular aos mecanismos reguladores hormonais (MAPLETOFT et al., 1992; FORTUNE, 1994).

A ultra-sonografia é um método diagnóstico extremamente prático, o qual fornece informações bastante precisas sobre o estado reprodutivo, principalmente sobre a ginecologia eqüina, através da reflexão de ondas sonoras de alta frequência sobre a vibração de tecidos em diferentes densidades (PALMER & DRIANCOURT, 1980).

2.2 Dinâmica Folicular em éguas

O desenvolvimento folicular é um processo que envolve uma complexa série de eventos que têm o papel de induzir o crescimento e regressão de folículos no ovário da fêmea. Com a utilização da ultra-sonografia, foi possível a visualização da dinâmica da população folicular, processo da ovulação, desenvolvimento, manutenção e regressão do corpo lúteo.

A dinâmica folicular está baseada nos princípios da oogênese e foliculogênese. Ambos os processos iniciam-se no estágio fetal e atuam juntamente

com outros fatores, para assegurar o desenvolvimento dos gametas femininos e da função ovariana.

2.2.1 Oogênese

No início do desenvolvimento fetal, as células primordiais, originárias do saco vitelínico, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a multiplicar-se através de divisões mitóticas (VAN DEN HURK et al., 1997). Em eqüinos, as células primordiais sofrerão mitoses, recebendo a denominação de oogônias ao redor dos 50 dias de gestação (DEANSLY, 1978).

Após a proliferação mitótica, as oogônias iniciam um processo de divisão meiótica, aproximadamente 75 a 160 dias de gestação, transformando-se em oócitos primários, os quais permanecem no diplóteno da profase I, conhecido como estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa da primeira prófase meiótica até a puberdade, quando os folículos selecionados estarão aptos a continuarem o seu crescimento e ovularem (PICTON, 2001). Os oócitos primários apresentam-se rodeados por uma estreita camada de células da granulosa, formando assim, os folículos primordiais (VAN DEN HURK et al., 1997).

Os oócitos permanecem em repouso meiótico até o início da puberdade, após este período, passam a forma secundária e oócito terciário. O oócito secundário é formado após a realização da primeira divisão meiótica e caracterizado pelo aparecimento do primeiro corpúsculo polar. O oócito terciário ou zigoto somente se forma no momento em que ocorre a fertilização, eles são identificados pelo aparecimento do segundo corpo polar e formação do pró-núcleo masculino e feminino. Estudos têm demonstrado que a realização da meiose secundária ocorre por meio do fator de ativação de maturação (MFP) e proteína Kinase ativador de mitose (MAPK) (GOUDET et al., 1998).

2.2.2 Foliculogênese

Quando as oogônias iniciam seu desenvolvimento, tornam-se circundadas por células precursoras da granulosa, conhecidas como células foliculares, significando o início da foliculogênese. Foliculogênese é um processo pelo qual os folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para a ovulação. O número de folículos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito baixo e estima-se que aproximadamente 99% dos folículos ovarianos sofrem atresia. Baseado no entendimento de espécies monovulatórias, o desenvolvimento folicular é dividido em três estágios subseqüentes: 1) início do crescimento do folículo primordial; 2) recrutamento e crescimento de outros folículos; 3) seleção do folículo dominante e atresia dos folículos subordinados (WEBB et al., 1999).

Folículos primordiais são os menos desenvolvidos e se apresentam em maior quantidade no ovário. A quantidade inicial e final de folículos é espécie-específico. Exames histológicos de ovários, obtidos de éguas em atividade cíclica, revelaram a presença de aproximadamente 36.000 folículos primordiais e 100 folículos em desenvolvimento (DRIANCOUT & PALMER, 1984).

Os folículos primordiais são caracterizados pela presença do oócito primário envolto por uma única camada de células foliculares (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores deste desenvolvimento ainda não foram completamente esclarecidos. Contudo, acumulam-se evidências de que o início e crescimento do folículo primordial requerem a expressão de vários fatores e receptores: receptores de gonadotrofinas, fator de crescimento β (TGF- β) e fator fibroblástico de crescimento 2 (McNATTY et al., 1999).

Em particular, membros do TGF- β têm se mostrado potentes reguladores da proliferação e diferenciação em diferentes espécies. Três membros da família TGF- β , fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), "bone morphogenetic protein" 15 (BMP-15) e (BMP-6), são expressos pelo oócito e acredita-se serem mediadores do crescimento do folículo pré-antral (ELVIN et al., 2000).

O desenvolvimento folicular é melhor caracterizado por diferenciação e proliferação das células da granulosa. Acompanhando este processo está a formação

da membrana translúcida ao redor do oócito, conhecida como zona pelúcida. A formação de múltiplas camadas ao redor do oócito indica a transformação do oócito primário em secundário (folículo primário a secundário). Folículos primários e secundários são identificados como folículos pré-antrais (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro quando atingem aproximadamente 300µm de diâmetro, o qual é preenchido por um líquido viscoso denominado de líquido folicular que apresenta em sua composição os hormônios esteróides, principalmente o estradiol, a progesterona, o fator inibidor da maturação do oócito (O.M.I) e a inibina. O volume e composição deste líquido modificam-se com o desenvolvimento folicular (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

De acordo com Kenney et al., 1979, junto a esse processo, uma bainha de células, conhecidas como células da teca, formam-se ao redor das células da granulosa. As células da teca formam duas sub-camadas: a teca externa, a qual está constituída, quase que totalmente, por tecido conjuntivo e a teca interna a qual é a camada vascular interna. Enquanto ocorre nova proliferação de células da granulosa, estas células se organizam em múltiplas camadas ao redor do oócito, formando o "cúmmulus oóphorus". Os principais produtos secretados pelas células da teca são os andrógenos esteróides, enquanto isso, as células da granulosa produzem estrógeno e inibina. Todos estes eventos indicam a transição de folículo secundário a terciário, o qual inicia novo desenvolvimento, até ser eleito à ovulação.

2.2.3 Ondas Foliculares

Com a formação do antro folicular, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas para novo desenvolvimento, o qual é evidente pela expressão de receptores de FSH pelas células da granulosa e receptores de LH pelas células da teca (WEBB et al., 1999). Vários destes folículos crescem em sincronia, estabelecendo uma onda de crescimento folicular. As espécies monovulatórias, como bovinos e eqüinos, geralmente apresentam uma ou duas ondas foliculares durante os 19-22 dias do ciclo estral (GINTHER, 1992).

De acordo com Driancourt et al., (1982) as ondas foliculares são caracterizadas pela emergência de pequenos folículos antrais, de aproximadamente 0,2 a 0,4 mm de diâmetro.

Segundo Ginther (1992) a definição de onda folicular maior se aplica a um conjunto de folículos que inicialmente exhibe crescimento sincronizado, sucedido pelo crescimento preferencial de apenas um, ou ocasionalmente dois folículos.

As éguas podem apresentar uma ou duas ondas foliculares (SIROIS et al., 1989; GINTHER, 1989), havendo uma maior predisposição a uma única onda. Existem trabalhos que indicam uma tendência a duas ondas foliculares na primeira metade da estação reprodutiva (PIERSON & GINTHER, 1987; GINTHER & PIERSON, 1989; GINTHER, 1989) e uma maior tendência a uma onda folicular na segunda metade da estação reprodutiva (GINTHER, 1989; BURATINI, 1997).

Em eqüinos, a onda folicular maior divide-se em onda primária e onda secundária. A onda folicular primária inicia-se na a metade do diestro e dá origem ao folículo ovulatório (>35mm). A onda secundária emerge no início do estro e usualmente resulta na formação de grandes folículos anovulatórios (>20 mm) ou, mais raramente, em ovulação durante o diestro. E, finalmente, ondas que não apresentam folículos dominantes são classificadas como ondas menores.

A primeira elevação de FSH está geralmente associada com a onda maior primária e, assim, envolvida na estimulação de folículos até tornarem-se aptos a ovular (BERFELT & GINTHER, 1993).

Conforme Ginther (1992), nas espécies monovulatórias, um único folículo, usualmente, emergirá da onda maior e chegará a folículo dominante. Durante a onda maior, vários folículos emergem e começam a crescer a uma taxa similar (fase paralela).

O pico da concentração de FSH ocorre quando o folículo maior atinge, aproximadamente, 4mm de diâmetro em vacas e 13mm de diâmetro em éguas e, então começa a declinar. A fase paralela do crescimento folicular finaliza quando o maior folículo alcança um diâmetro de 8mm em vacas (BODENSTEINER et. al., 1996) e

22mm em éguas, e começam a ocorrer diferenças nas taxas de crescimento entre o maior folículo e os demais (GASTAL et al., 1997).

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

De acordo com Buratini (1997), a duração média do intervalo interovulatório para ciclos que apresentaram uma ou duas ondas foliculares maiores foram de 19,4 e 23,3 dias respectivamente, em éguas Mangalarga.

O crescimento diário dos folículos recrutados pelas ondas foliculares pode variar de 2,5 a 3,0 mm (GINTHER, 1986). Porém, quando se beneficiam da estimulação ovariana através de preparados hormonais, o crescimento folicular diário pode alcançar 3,0 mm ou mais (MOURA & MERKT, 1996).

Conforme Palmer et al. (1993) foi observada uma taxa de crescimento folicular de 2,1 mm ao dia em éguas pôneis superovuladas com o EPE.

2.2.4 Divergência e Seleção do Folículo Dominante

Seleção é um termo geralmente utilizado em espécies monovulatórias para indicar que, usualmente, somente um folículo da onda folicular chega ao estágio de dominância e adquire a capacidade de ovular (GINTHER et al., 1993).

Squires et al. (1986) identificaram que a seleção ocorre ou se inicia antes da detecção ultra-sonográfica da emergência dos folículos. Por esta razão, outros fatores podem determinar qual o momento em que os folículos tornam-se sensíveis aos níveis de FSH.

Os mesmos autores salientaram que o folículo “não dominante” conserva sua capacidade para iniciar dominância até após a divergência. Portanto, o segundo maior folículo inicia sua dominância quando se realiza a ablação do folículo dominante; neste

momento, ocorre o suposto início da divergência. Além disso, o tratamento com FSH, iniciado precocemente, resulta no desenvolvimento da dominância de vários folículos, demonstrando a capacidade de pré-divergência dos folículos.

O declínio nas concentrações de FSH tem demonstrado ser temporariamente associado com a divergência folicular em éguas (GASTAL et al., 1997) e em novilhas (GINTHER et. al., 1999). Além disso, mudanças na estrutura da parede do maior folículo também são observadas no dia anterior à divergência (GASTAL et al., 2000), indicando que mudanças estruturais podem ser responsáveis pelo mecanismo de divergência.

Os controles dos mecanismos envolvidos na divergência foliculares são tópicos de intensos estudos e discussões em muitas espécies (DRIANCOURT, 1991; FORTUNE, 1994), incluindo eqüinos (GINTHER, 2000a).

O estímulo necessário para o recrutamento folicular, ou seja, para a continuidade do crescimento folicular depende de uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH.

Conforme GINTHER (2000a) o maior folículo emerge, em média, um dia antes do segundo maior folículo. As concentrações de FSH que estimulam a emergência da onda folicular iniciam seu declínio quando os folículos atingem um diâmetro de aproximadamente de 13mm em éguas e 8,5 mm em vacas. Neste momento, os dois maiores folículos crescem paralelamente (fase paralela). Ambos os folículos secretam inibina causando o contínuo declínio das concentrações de FSH, as quais são requeridas por eles para o seu crescimento. Quando o maior folículo atinge 22,5mm de diâmetro em éguas e 8,5mm de diâmetro em vacas, a fase de crescimento paralelo finaliza-se e inicia-se a fase de divergência folicular. A divergência é caracterizada pela contínua taxa de crescimento do maior folículo (ou folículo dominante) e diminuição da taxa de crescimento do menor folículo (ou folículo subordinado).

Possivelmente, durante este recrutamento, o futuro folículo dominante, ou seja, aquele cujo estágio de desenvolvimento está melhor sincronizado com o estímulo gonadotrófico, diferencia-se dos demais folículos e adquire a capacidade de

refratariedade aos níveis decrescentes de FSH, desencadeados por ele próprio e por supressores do desenvolvimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994). Este decréscimo das concentrações de FSH, usualmente, ocorre quando o maior folículo atinge um decisivo diâmetro (aproximadamente 22mm) (GASTAL et al., 1997). O futuro folículo dominante é apto a utilizar baixas concentrações de FSH para o seu crescimento e desenvolvimento, devido a um aumento da expressão dos receptores de FSH (WEBB et al., 1999).

Embora alguns mecanismos de divergência sejam desconhecidos, acredita-se que através da secreção de estradiol e inibina, o folículo dominante cause uma redução nos níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (BERGFELT & GINTHER, 1986).

De acordo com Monniaux et al. (1997), existe a participação decisiva de fatores de crescimento no processo de seleção e diferenciação do folículo dominante. Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs) são considerados os fatores locais mais importantes desta fase. Foi demonstrado que a biodisponibilização dos IGFs aumenta no fluido folicular dos folículos dominantes na fase terminal do seu desenvolvimento (FORTUNE, 2003).

Provavelmente, no momento da redução das concentrações de FSH, essa maior bio-disponibilidade de IGFs no fluido folicular do folículo dominante cause uma elevação da sensibilidade das células da granulosa e uma potencialização das ações do FSH (FORTUNE et al., 2001).

Bodensteiner et al. (1996) descreveram que outro fator fundamental da seleção folicular é a alteração da dependência gonadotrófica do folículo dominante. A observação de receptores para o LH nas células da granulosa de folículos dominantes antes da divergência folicular sugere uma participação do LH no mecanismo de seleção.

Reforçando esta afirmativa, Gastal et al., (1997) demonstraram que o nível circulatório de LH tem se mostrado aumentado durante o momento de divergência folicular. Em um estudo subsequente, demonstraram um aumento transitório na

concentração de LH durante a emergência da onda folicular e um constante aumento na proporção de LH: FSH (GASTAL et al., 2000).

2.2.5 Atresia e Ovulação

De acordo com WEBB et al. (1999), após ocorrer a divergência e seleção do folículo dominante, os folículos restantes ou subordinados sofrem atresia. Aproximadamente 99% de todos os folículos, em espécies monovulatórias, sofrem atresia, conseqüentemente, somente alguns folículos derivados de uma enorme população de células primordiais, chegam a ovulação. A atresia é geralmente considerada um processo irreversível, que ocorre por morte celular ou apoptose.

Conforme Pierson & Ginther (1987) os folículos subordinados iniciam seu declínio e o folículo dominante inicia seu crescimento rapidamente. Em éguas, a taxa de crescimento médio do folículo dominante é, aproximadamente, 3 a 5 milímetros por dia.

O mecanismo de atresia pôde ser observado em várias espécies, incluindo eqüinos e bovinos (KENNEY et al., 1979).

Driancourt & Palmer (1984) estudando ovários retirados cirurgicamente de éguas indicaram que os folículos pequenos e não o folículo dominante, são capazes de exercer feedback negativo na secreção de FSH. Portanto, acumulam-se evidências de que os futuros folículos subordinados são responsáveis pelo declínio de seu próprio crescimento e sua subseqüente atresia.

Conforme Pierson & Ginther (1987), quando os folículos subordinados iniciam o seu declínio, o folículo dominante começa a crescer rapidamente. Em éguas, a taxa média de crescimento do folículo dominante é aproximadamente de 3 a 5 mm por dia.

Imagens ultra-sonográficas do folículo dominante pré ovulatório demonstraram um aumento no volume do antro e um espessamento da parede folicular (TOWNSON E GINTHER, 1989). Em eqüinos o grande folículo ovulatório, usualmente, alcança um diâmetro de aproximadamente 40mm e a parede pode apresentar 6mm.

Mudanças também ocorrem no interior do folículo, evidenciadas por um aumento nas concentrações de estrógenos, andrógenos e inibina dentro do fluido folicular (PIERSON E GINTHER, 1987). No aspecto molecular, ocorre um aumento expressivo de receptores de LH pelas células da teca, deste modo tornando o folículo responsivo ao LH pituitário (WEBB et al., 1999).

Em muitas espécies, a ovulação ocorre sobre o pico de LH. Em éguas, a ovulação ocorre após uma constante e lenta elevação na concentração circulatória de LH (GINTHER, 1987). Sob um certo limiar no estímulo de LH, o folículo rompe-se e o oócito é expelido. Adotando um caminho para a fossa de ovulação, o oócito é recolhido pela fimbria e liberado no infundíbulo do oviduto até ocorrer a fertilização. Ocorre, inicialmente, uma hemorragia após a ruptura do folículo, para a formação do corpo hemorrágico. As células da granulosa e da teca, sofrem luteinização para formar o corpo lúteo. A partir deste momento, inicia-se a fase lútea (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

2.3 Endocrinologia do ciclo estral

Em éguas que ciclam normalmente, duas ondas de FSH ocorrem aproximadamente 20 e 11 dias antes da ovulação. O ovário da égua é menos sensível ao FSH do que o da vaca, ovelha e cabra (GINTHER, 1992).

A elevação do FSH ocorre aproximadamente a cada 10 dias de intervalo, no meio do cio e após a ovulação. Existem períodos em que as concentrações de FSH e LH apresentam-se diferenciadas como no início do cio em que o nível de FSH está baixo enquanto o de LH aumenta. E também, no diestro quando as concentrações de FSH aumentam e o LH permanece baixo (ALEXANDER et al., 1996).

Vários estudos documentaram que mudanças nas concentrações sistêmicas de FSH e LH estão relacionadas com o desenvolvimento folicular durante

o ciclo estral em éguas (GINTHER, 1992; GINTHER & BERGFELT, 1992).

Irvine et al. (1998) descreveram que as curvas das concentrações circulatórias de FSH e LH são mais sincronizadas durante a fase lútea do que durante

a fase folicular em éguas, mesmo quando as amostras foram colhidas entre minutos (pulsos) ou entre horas de intervalo (curvas).

O desenvolvimento contínuo do folículo dominante na fase de diminuição da concentração de FSH é provido pela indução do aumento do número de receptores de FSH nas células da granulosa, pelo estradiol. Acredita-se que através da secreção de estradiol e inibina, o folículo dominante cause uma redução nos níveis de FSH circulantes, o que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos outros folículos subordinados (BERGFELT & GINTHER, 1985).

Estudos posteriores demonstraram que em éguas, a concentração circulatória de inibina imunoreativa é alta durante a fase folicular e baixa durante a fase luteal, como ocorre na maioria das fêmeas mamíferas. E que ocorre um aumento nas concentrações circulatórias de inibina durante a ovulação, o qual pode ser um evento único das éguas (NAGAMINE et al. 1998).

Conforme Ginther et. al. (2000b) existe a hipótese de que 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 paralela. Este efeito seria atribuído a secreção de inibina de acordo com a relação entre o aumento das concentrações de inibina e a diminuição das concentrações de FSH.

Após o desenvolvimento folicular, ocorre um aumento nos pulsos de LH juntamente com um aumento do número de receptores nas células da granulosa, levando o folículo dominante ao estágio pré-ovulatório, para isso é necessária a ação prévia da prostaglandina $F_2 \alpha$, responsável pela luteólise com conseqüente queda nos níveis circulantes de progesterona (SAVIO et al., 1993).

A liberação de LH é prolongada na égua, os níveis aumentam no início do estro, atingindo o pico um a dois dias após a ovulação. Este aumento das concentrações de LH pode estimular a maturação do folículo durante o cio. O padrão de LH plasmático na égua difere de outras espécies e, é possível que a persistência das altas concentrações de LH resulte de uma meia vida longa do LH endógeno (GESCHWIND et al., 1975).

No entanto, durante a fase luteal os níveis de progesterona impedem o aumento da frequência dos pulsos de LH, necessários a maturação final do folículo dominante. Conseqüentemente, o folículo dominante regride e passa a secretar quantidades decrescentes de estradiol e inibina, permitindo um aumento dos níveis de FSH e a emergência de uma nova onda folicular (MONNIAUX et al., 1997).

A maturação final do folículo dominante e ovulação é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH), o qual aumenta gradativamente durante o estro e atinge o pico próximo ao período da ovulação (MONNIAUX et al., 1997).

O desenvolvimento folicular é, portanto, um processo de dinâmica de crescimento e regressão. A ovulação ocorrerá apenas na presença da progressão da estimulação gonadal (PIERSON et. al., 1990).

2.4 Superovulação em éguas

A superovulação tem como objetivo aumentar a eficiência reprodutiva e econômica dos programas de transferência de embriões (ANDRADE, 1986), através do recrutando um elevado número de folículos dentro de uma onda, estimulando-os a continuar seu desenvolvimento até a ovulação (PIERSON & GINTHER, 1990).

O número de ovulações por ciclo estral é espécie-específico e corresponde à quantidade de folículos dominantes que são selecionados dentre os recrutados. Normalmente, nas espécies bovina e eqüina apenas um folículo é selecionado e ao longo da onda folicular passa a exercer dominância sobre os demais, e chegar à ovulação (BERGFELT & GINTHER 1985).

Apesar da espécie eqüina ser classificada como monovulatória, relatos de ovulações múltiplas espontâneas, em determinadas raças, foram relatados. Ginther (1986,1992) observou uma incidência de 15 a 25% para a raça Puro Sangue Inglês, 13 a 15% para animais de trote, 24% para as raças de tração, 8 a 10% para éguas Quarto-de-Milha e 8% para Appaloosa. Losinno et al. (2000) relataram a ocorrência de 38% de ovulações múltiplas em éguas da raça Pólo Argentino. E, Carmo et al. (2002) após o

acompanhamento de 829 ciclos de éguas da raça Brasileiro de Hipismo, relataram que em 53% dos ciclos ocorreram duplas ou triplas ovulações.

As técnicas para induzir múltiplas ovulações utilizadas para todas as espécies são similares, visando o desenvolvimento folicular iniciado por alguma forma de gonadotrofina, como o HMG (Gonadotrofina da mulher na menopausa), PMSG (Gonadotrofina sérica da égua prenhe) e mais usualmente o FSH (Hormônio folículo estimulante) (SHARP et al., 1991).

Vários estudos têm demonstrado que a égua é refratária a todas as drogas rotineiramente utilizadas para outras espécies, como o FSH de origem suína e o eCG na indução de respostas superovulatórias, o único composto que atualmente induz a superovulação em éguas é o extrato de pituitária eqüina (EPE) (McCUE, 1996).

2.4.1 Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG)

O primeiro estudo com manipulação experimental, de ondas foliculares, em eqüinos foi relatado por Day (1940) no qual observou o efeito do eCG no estro e na ovulação, porém o tratamento não apresentou efeito benéfico nos aspectos avaliados, nas éguas submetidas ao tratamento.

A partir daí, outros estudos foram realizados para testar a capacidade do eCG na resposta superovulatória em éguas, no entanto os resultados não foram animadores (ALLEN, 1982; GINTHER, 1992).

2.4.2 Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH)

A administração de GnRH também foi utilizada na tentativa de induzir a estimulação ovariana em éguas ciclando, mas não apresentou resultados satisfatórios (JOHNSON, 1986).

Johnson & Becker (1988) utilizando éguas em anestro sazonal, observaram taxas de ovulações de 1,3, 2,9 e 3,5 para a administração de 2, 20 e 100µg de GnRH por hora, respectivamente. O GnRH foi administrado através de uma bomba de liberação por um período médio de 11,4 dias.

Acredita-se que a eficácia do tratamento com GnRH durante a estação ovulatória é reduzida, devido ao “feedback” negativo de hormônios ovarianos (inibina) sobre a liberação de FSH, sendo seu uso mais efetivo durante o anestro (McCUE, 1996).

Os protocolos descritos na literatura envolvem a utilização de doses elevadas de GnRH em numerosas aplicações ou sistemas de liberação contínua por meio de bombas, sendo assim, restrito o seu uso na prática (JOHNSON, 1986).

2.4.3 Imunização contra a Inibina

A Inibina é um hormônio glicoproteico secretada pelas células da granulosa, que tem um efeito específico sobre a secreção de FSH e pouca ou nenhuma ação, sobre a secreção de LH (GINTHER, 1992). A principal fonte de inibina é o folículo dominante, que através da inibição da secreção de FSH, promove a supressão dos folículos menores (IRVINE, 1981).

Baseados nestas informações foi suposto que a neutralização da inibina permitiria que as concentrações de FSH se mantivessem elevadas durante as fases de crescimento e seleção folicular, prevenindo a regressão de alguns folículos e aumentando o número folículos que chegariam a ovulação (McCUE, 1996).

Os primeiros estudos de imunização contra a inibina foram realizados por McKinnon et al. (1992) que imunizaram cinco éguas com uma subunidade alfa recombinante de inibina bovina, realizando duas aplicações com 35 dias de intervalo e obtiveram uma média de 2,3 ovulações/égua após a segunda imunização, que foi superior ($P < 0,02$) ao grupo controle (1,2 ovulações/égua).

Em um outro estudo, seis éguas foram imunizadas cinco vezes em intervalos de três semanas com um fragmento sintético da subunidade alfa de inibina suína e

obtiveram taxa de ovulação média superior quando comparadas as não tratadas (2,8 vs 1,1), um aumento na taxa de embriões recuperados por égua (1,6 vs 0,7), e a porcentagem de recuperação embrionária por ovulação foi similar para ambos os grupos, 58% e 57%, respectivamente (McCUE et al., 1992).

O inconveniente da utilização desta técnica está relacionado com os efeitos colaterais relatados por diversos autores, estes efeitos podem variar de um edema a um abscesso no local da aplicação (McCUE et al., 1992; SQUIRES & SEIDEL, 1995).

2.4. 4 Extrato de Pituitária Eqüina (EPE)

O extrato de pituitária eqüina tem sido o preparado mais utilizado em estudos sobre indução de múltiplas ovulações em éguas (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Atualmente, o extrato utilizado pela grande maioria dos pesquisadores é obtido através da homogeneização de pituitárias eqüinas e extração das gonadotrofinas em uma solução com 40% de etanol e 6% de acetato de amônia. As gonadotrofinas são precipitadas a -20°C elevando-se a concentração de etanol para 80%, sendo então dissolvidas em tampão fosfato, dializadas e liofilizadas (GUILLOU & COMBARNOUS, 1983).

O primeiro relato onde se obteve sucesso na tentativa de superovulação em éguas foi descrito por Douglas et al. (1974), onde trataram éguas em anestro sazonal com EPE e uma porção parcialmente purificada de EPE e relataram que todas as éguas tratadas demonstraram estro e ovulação no período máximo de 12 dias após o início do tratamento. Porém, a resposta superovulatória foi superior nas éguas tratadas com EPE do que nas tratadas com uma fração purificada de EPE (2,3 vs 1,5 ovulações/égua).

Em 1977, estudos também foram realizados na tentativa de obterem respostas superovulatórias em éguas pôneis em anestro sazonal e demonstraram que houve uma indução da atividade ovariana e ovulação com a administração de GnRH com intervalo de 8h por 14 dias, mantidas em um manejo de 16h luz e 8h de escuridão (BAILEY & DOUGLAS, 1977). E, também, quando o EPE foi administrado uma vez ao dia por um período de 14 dias (LAPIN & GINTHER, 1977).

O primeiro relato de múltiplas ovulações em éguas cíclicas foi demonstrado por Lapin & Ginther (1977), utilizaram 21 éguas pôneis que receberam o EPE por via subcutânea, uma vez ao dia, durante o diestro (10° dia pós-ovulação) ou durante o estro (1° ao 6° do estro). Neste experimento as taxas de ovulações foram semelhantes para ambos os grupos tratados (1,7 vs 1,7 ovulações/égua), no entanto, superiores ao grupo controle (1,0 ovulação/égua). Uma maior proporção de éguas expressaram múltiplas ovulações quando o EPE foi administrado no 10° dia pós-ovulação (4/7) ou durante o estro (3/7) do que o grupo controle.

Outros estudos foram realizados com o objetivo de aumentar a resposta ovariana em éguas cíclicas com tratamentos superovulatórios. Woods & Ginther (1983) relataram um aumento na taxa de ovulação (4,0 ovulações/égua) quando o EPE foi iniciado no 10° dia pós-ovulação.

Os mesmos autores demonstraram a necessidade da administração da PGF_{2α} se o tratamento superovulatório for iniciado no diestro, com a finalidade de sincronizar o estro e as ovulações (WOODS & GINTHER, 1983).

Baseados nestes estudos, Dippert et al. (1992) ao aplicar 25mg/dia de EPE a partir do dia 5 do ciclo estral (dia 0 = ovulação) até o momento da ovulação do primeiro folículo, observaram melhores resultados, comparado ao mesmo tratamento iniciado no dia 12 do ciclo estral (2,9 vs 1,1 ovulações/égua).

De acordo com McCue, (1996) a resposta superovulatória ao tratamento com o EPE parece estar relacionada com o tamanho do folículo no início do tratamento, ele observou melhor resultado quando as éguas em anestro transicional apresentavam um folículo de 30 mm de diâmetro. Por outro lado, em éguas cíclicas, a melhor resposta foi quando a população dos folículos foi uniforme e o maior folículo apresentava no máximo 25 mm de diâmetro, concordando com Pierson & Ginther (1990), que descreveram que quanto maiores as diferenças entre o diâmetro dos dois maiores folículos no início do tratamento superovulatório com EPE, menor será a resposta superovulatória obtida.

Woods & Ginther (1982) observaram que as éguas, em anestro, com folículos menores que 25 mm no início do tratamento, tiveram uma resposta menos efetiva na

indução da ovulação. Posteriormente, os mesmos autores (1983), trabalhando também com éguas em anestro sazonal, verificaram uma maior efetividade do E.P.E. em induzir a ovulação quando um folículo maior (30-35 mm) estava presente no início do tratamento.

Pierson & Ginther (1990) iniciaram o tratamento com E.P.E. em quatro momentos diferentes, quando o maior folículo apresentou um tamanho de 15, 20, 25 ou 30 mm. Eles determinaram que a seleção ocorreu quando o diâmetro do maior folículo alcançou de 25 a 30 mm, pois a administração do E.P.E. quando o maior folículo tinha 15, 20 ou 25 mm no início do tratamento, resultou em uma resposta superestimulatória, o que não ocorreu quando o folículo já havia atingido 30 mm, provavelmente porque, neste momento, o estabelecimento da dominância por parte do maior folículo e repressão dos demais já havia ocorrido.

Alvarenga et al. (1999) utilizaram o EPE em aplicações uma ou duas vezes ao dia, e relataram que 25mg de EPE aplicado duas vezes ao dia, com o tratamento iniciado logo após a aplicação de $PGF_2\alpha$ entre os dias 6 e 8 do diestro, induziu a uma resposta ovariana significativamente maior do que a aplicação do produto em 1 vez ao dia (6,1 vs 2,0 folículos/cio).

Em um experimento subsequente, Alvarenga et al. (2001) utilizando o mesmo protocolo, observaram uma melhor resposta superovulatória e um maior número de embriões coletados quando o EPE foi administrado na mesma dosagem e administração (2 vezes ao dia), desde que nenhum folículo maior ou igual a 20mm de diâmetro tivesse sido detectado no momento do início do tratamento. Quando a metade destes folículos alcançou 35mm de diâmetro, uma dose de 2500 UI de HCG foi administrada para promover a ovulação. Com este protocolo, relataram que o número de ovulações foi de 1,2 para o ciclo anterior ao tratamento, 2,3 e 7,1 ovulações para os tratamentos uma e duas vezes ao dia, respectivamente. E o número de embriões recuperados por égua foi de 1,6 e 3,5 para os grupos tratados uma e duas vezes ao dia respectivamente.

Scoggin et al. (2002) relataram que o tratamento com EPE em éguas, duas vezes ao dia e em doses decrescentes, promoveu uma resposta ovariana (3,3 vs 1,2

ovulações/égua) e número de embriões coletados mais satisfatórios (2,3 vs 0,6 embriões/égua) quando comparados com o grupo controle.

No entanto, Carmo (2003) utilizando doses constantes e decrescentes de EPE duas vezes ao dia, não encontrou diferença significativa nas taxas de ovulação (3,5 vs 5,0) e de recuperação embrionária (1,2 vs 1,8) entre os tratamentos, porém, numericamente o valor do grupo em doses decrescentes foram superiores.

2.4.5 Hormônio Folículo-estimulante (FSH)

Os primeiros relatos da utilização de hormônio folículo-estimulante (FSH) para indução de múltiplas ovulações em éguas se referem ao uso de FSH de origem suína (pFSH), devido à sua ampla disponibilidade.

Alguns trabalhos foram realizados na tentativa de indução de resposta ovariana utilizando-se pFSH, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios. A taxa de ovulação obtida por Irvine (1981) foi de 1,7 ovulações por égua, quando utilizado o pFSH em quatro animais. Além disso, o EPE foi mais eficiente do que o FSH suíno (pFSH) em realizar múltiplas ovulações, obtendo-se resposta superovulatória em 75% das éguas (em média 2 a 3 ovulações por égua) e nenhuma resposta nos animais tratados com pFSH (SQUIRES et al., 1987).

Entretanto, outros autores utilizando um protocolo de superovulação com EPE, associado ou não a somatotrofina suína, concluíram que a adição desta não altera a taxa de ovulações (HOFFERER et al., 1991).

O uso de pFSH para promover uma estimulação ovariana em éguas foi também utilizado por Fortune et al. (1993) em três diferentes dosagens e, observaram taxas de ovulações de 1,8, 1,5 e 1,5 para éguas tratadas com 8,0, 16,0 e 32,0 mg de pFSH, respectivamente, e 1,2 ovulações para o grupo controle.

Em estudos subseqüentes, avaliou-se a eficácia de preparados contendo frações enriquecidas de FSH de origem eqüina (eFSH) na superovulação de éguas. Em 1998, Rosas et. al. compararam a eficiência do EPE com uma fração enriquecida de FSH eqüino na indução de resposta superovulatória e na taxa de embriões recuperados

em 10 éguas durante a estação ovulatória. A dose diária administrada para ambos os grupos foi de 25mg. Neste trabalho, o número de embriões recuperados por éguas superovuladas foi similar entre os grupos eFSH e EPE (2,0 vs 2,0).

Outro trabalho realizado recentemente, testou a eficácia de eFSH (12,5mg) em éguas em fase transicional com o objetivo de antecipar a fase ovulatória e obtiveram desenvolvimento folicular em 80% das éguas (8/10), com em média 5,2 dias de tratamento (NISWENDER et. al., 2004), neste estudo não realizaram a colheita dos embriões. Por outro lado, Peres (2004), avaliou o número de embriões recuperados em éguas tratadas com eFSH em fase transicional e observou uma taxa de ovulação superior (5.57 vs 1.0) e um aumento no número de embriões recuperados (2.0 vs 0.69) por égua, quando comparados ao grupo controle.

2.5 Alterações em fêmeas superovuladas

Para a indução de superovulação se faz necessária suplementação com gonadotrofinas com o intuito de aumentar o número de folículos aptos a ovular, através do recrutamento de folículos menores, evitando a atresia destes (RIESENBERG et al., 2001).

Em decorrência das variações dos resultados obtidos, estudos têm demonstrado que os preparados gonadotróficos estão diretamente relacionados com as variações observadas nos tratamentos superovulatórios, visto que a alta concentração de LH causa efeitos deletérios na resposta superovulatória (MURPHY et al., 1984; DONALDSON & WARD, 1986; GONZALES et al., 1990) e na qualidade dos embriões (KAFI & MCGOWAN, 1997), em consequência da luteinização folicular e da maturação prematura do oócito (CALLESEN et al., 1986).

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

respectivamente aos protocolos superovulatórios em doses decrescentes e em doses contínuas.

Em estudos posteriores, os mesmos autores demonstraram que a indução da superovulação e a taxa de recuperação de embriões, além de serem superiores com a administração de FSH duas vezes ao dia, foi também superior quando a administração foi conduzida em doses decrescentes. Os autores realizaram um experimento com 26 vacas e obtiveram uma média de 15,9 ovulações e 12,2 embriões recuperados com a administração de doses decrescentes, e uma média de 9,3 ovulações e 5,8 embriões recuperados utilizando doses constantes (MONNIAUX et al. 1993). Entretanto, vacas com altas respostas de estimulação folicular com FSH (20 ou 30 ovulações), obtiveram taxas relativamente baixas de recuperação embrionária (ELSDEN & SEIDEL, 1995).

A baixa resposta superovulatória e a baixa recuperação de embriões viáveis por colheita ainda podem estar relacionadas a fatores individuais como raça, causas genéticas ou fisiológicas, estado nutricional, estação do ano e repetições sucessivas de tratamento superovulatório. Além disso, esses fatores podem estar relacionados com o tratamento superovulatório; momento de se iniciar o tratamento com relação ao ciclo estral, tipo de gonadotrofina utilizada, relação FSH e LH nos preparados, duração do tratamento, dose de gonadotrofina e a via de administração (ADANS et al., 1992; GINTHER & PIERSON, 1989).

Porém, Dippert et al. (1994), coletando ovários e ovidutos de éguas superovuladas e não superovuladas dois dias após a última ovulação determinaram que mais de 90% dos corpos lúteos formados são provenientes de ovulações e não de luteinizações. Após lavagem dos ovidutos, eles recuperaram uma média de 1,0 e 1,6 oócitos por oviduto nas éguas tratadas e não tratadas, respectivamente. Posteriormente, Bézard et al. (1995) verificaram que embora o ambiente folicular seja diferente em éguas superovuladas, em comparação às não superovuladas, a maturação ovocitária é alcançada em ambos os grupos de animais.

Mesmo após a realização de vários estudos com o objetivo de ajustar protocolos de superovulação para a espécie eqüina, os resultados não são satisfatórios quando comparados com os obtidos em outras espécies. Hipotetiza-se que a baixa

recuperação embrionária deve-se a vários aspectos, tais como: altos níveis de progesterona que podem alterar o transporte do espermatozóide e/ou ovócito; folículos que não ovularam, mas tornaram-se luteinizados, conseqüentemente, causarão influência no baixo número de embriões recuperados, e/ou maturação inadequada do ovócito de folículos de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios (ALVARENGA et al. 2001).

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

Para o melhor entendimento das variações endócrinas na resposta superovulatória, bem como nos baixos índices de recuperação embrionária, se faz necessário o conhecimento detalhado dos mecanismos de dinâmica folicular e dos perfis hormonais que estão envolvidos neste processo, onde a ultra-sonografia tem contribuído para uma melhor caracterização das ondas foliculares em éguas (GINTHER, 1992).

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

Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Experimento 1: Avaliação da dinâmica folicular em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE) em doses constantes e decrescentes e FSH eqüino purificado.

Os experimentos foram conduzidos no Posto de Monta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, localizado na Fazenda Lageado – UNESP – no município de Botucatu (LAT. 22^o S e LONG. 48^o W), estado de São Paulo, onde as éguas foram mantidas em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo.

3.1.1 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:

1^o ciclo: Acompanhamento para a detecção da ovulação (D0).

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

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

5^o ciclo: Tratamento superovulatório (Constante ou Decrescente).

6^o ciclo: Observação do intervalo interovulatório.

Na segunda estação reprodutiva as mesmas éguas foram acompanhadas durante 03 (três) ciclos consecutivos; sendo o primeiro para a detecção da ovulação (D0), o segundo utilizado para o grupo controle e o terceiro ciclo para o tratamento superovulatório com FSH eqüino purificado. 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 os mesmos meses do ano dos grupos anteriores.

Foi utilizado sêmen de um único Garanhão da raça Árabe, com bom histórico de fertilidade, para as inseminações das éguas de todos os experimentos. Utilizou-se 1×10^9 de espermatozóides viáveis por inseminação.

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.

3.1.2 Preparação do Extrato de Pituitária Eqüina (EPE)

As pituitárias foram adquiridas no matadouro da cidade de Araguari-MG e preparadas no laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, conforme metodologia proposta por Guillou & Combarous (1983). Resumidamente, o EPE foi extraído com 40% de etanol, 6% de acetato de amônia e a fração ativa foi precipitada para aumentar a concentração de etanol em 80%, após ter sido dializado e liofilizado.

Imediatamente antes de 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, através da técnica de radioimunoensaio (R.I.A.) – LH 493µg / FSH 331µg - (60% e 40% respectivamente).

3.1.3 FSH Eqüino Purificado

O FSH eqüino purificado utilizado para o tratamento superovulatório foi adquirido no Laboratório Bioniche (Bioniche Animal Health Inc., Canadá).

3.1.4 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, 5mg/IM de Prostaglandina F₂alfa “PGF₂α” (Dinoprost, Lutalise[®], Rhodia-Mérieux, Paulínia-SP).

2º dia: 7:00 horas, aplicação do EPE e, novamente, 5mg/IM de PGF₂α 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 (EV) 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 (Figura 1).

Grupo II (GII): Doses Decrescentes

As éguas foram tratadas com frações decrescentes de EPE. As doses de EPE foram administradas duas vezes ao dia (7:00 e 18:00), em frações decrescentes; 40mg, 35mg, 30mg, 25mg, 20mg, 15mg e 10mg/IM para 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º dias, respectivamente, quando necessário, seguiu-se com a dose de 10mg, a cada 12 horas, de acordo com o seguinte protocolo:

1º dia: (7º dia pós-ovulação)- 18:00 horas, aplicação de 40mg/IM de EPE, sendo aplicado concomitantemente 5mg/IM de PGF₂α.

2º dia: 7:00 horas aplicação de 35mg de EPE e, novamente, PGF₂α 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, foram aplicados 3000 UI de hCG (EV) 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 (Figura 2).

Grupo III (GIII): FSH Eqüino Purificado

Neste grupo os animais receberam aplicações duas vezes ao dia de FSH eqüino purificado (12,5mg IM), nos mesmos horários do GI e GII. O tratamento com eFSH purificado foi interrompido quando a maioria dos folículos em desenvolvimento atingiu diâmetro médio de 35mm e realizada a aplicação de 3000UI de hCG. As inseminações foram realizadas a partir da aplicação do hCG, seguindo diariamente, até a última ovulação (Figura 3).

Grupo IV (GIV): Ciclo Controle

As éguas não foram submetidas ao tratamento superovulatório. Foi aplicado 5mg “PGF₂alfa” (Lutalise[®], Rhodia-Mérieux, Paulínia-SP) no 7º dia pós-ovulação, e acompanhado o desenvolvimento folicular, através de ultra-sonografia. A ovulação foi induzida com 3000UI de Gonadotrofina Coriônica Humana “hCG” (Vetecor[®] - Laboratório Calier, São Paulo-SP) EV, quando um folículo de 35mm de diâmetro foi observado, e realizado a primeira inseminação artificial.

3.1.5 Avaliação Ultra-sonográfica

As éguas foram submetidas, previamente, a exames ultra-sonográficos para a detecção de qualquer alteração uterina e ovariana que pudesse influenciar nos resultados do estudo. Além disso, foi realizada citologia uterina em todas as éguas utilizadas. Para os exames ultra-sonográficos foi utilizado um aparelho modelo Scanner 240 Vet (Pie-Medical, Holanda) com transdutor linear de 5,0 MHz.

Quando em estro, as éguas foram submetidas a exames ultra-sonográficos para a detecção da ovulação (D0). Após sete dias da ovulação (D7) um outro exame de ultra-som foi realizado para verificar a presença de edema uterino e folículo com diâmetro médio superior a 25mm, com a presença destes, não se iniciaria o protocolo superovulatório.

Através do exame ultra-sonográfico realizou-se uma exploração detalhada dos ovários verificando-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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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 evitar 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 e obtendo-se o diâmetro médio, esse acompanhamento foi efetuado até a última ovulação dos folículos dominantes.

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, conforme ilustrado na figura 4.

Para a avaliação da dinâmica folicular foram utilizados 2 métodos: 1º) método de identidade, o qual identifica individualmente os folículos, diariamente, e representado por linhas individuais, conforme o descrito por Ginther (1990). O outro método (2º) utilizado para a avaliação da dinâmica folicular foi o método de grupo, o qual os folículos são apresentados graficamente em grupos de acordo com o seu diâmetro, diariamente. Este método foi descrito por Pierson & Ginther (1987).

3.1.6 Análise estatística

Os dados da dinâmica folicular ovariana e comparação entre os grupos I, II e III, quanto ao número de ovulações obtidos através de ultra-sonografia, foram calculados por análise de variância (ANOVA), utilizando-se modelos lineares de acordo com os procedimentos do SAS (1989).

A proporção de éguas com diferentes números de ovulações entre os grupos foram comparados utilizando o Chi-quadrado e Goodman. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

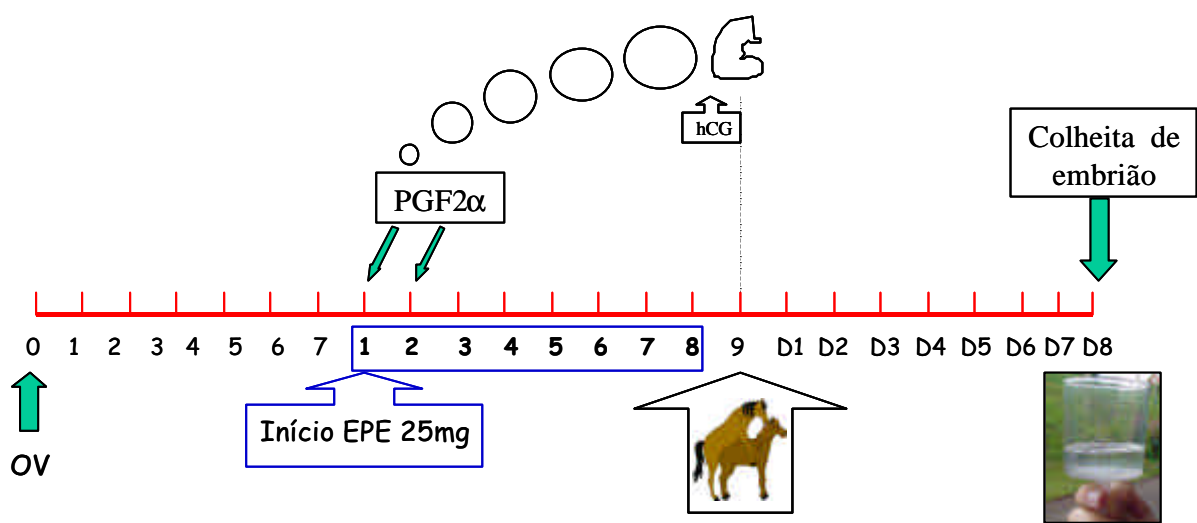


Figura 1- Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo I (EPE Constante). A dose de 25mg de EPE foi aplicada, diariamente, duas vezes ao dia.

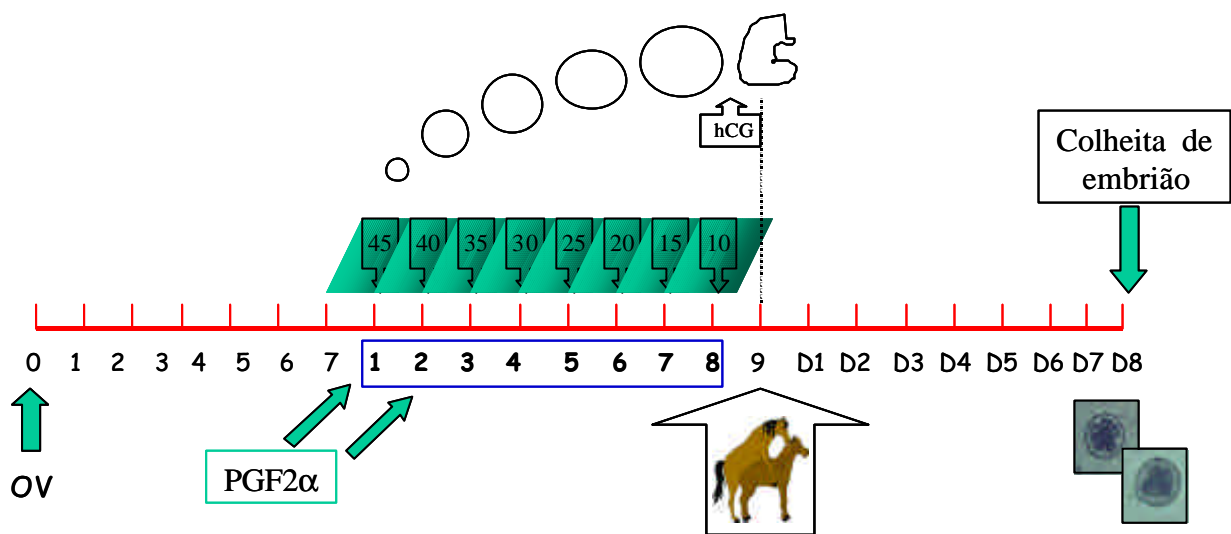


Figura 2- Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo II (EPE Decrescente). As doses decrescentes de EPE utilizadas foram em mg e aplicadas duas vezes ao dia, com intervalos de 12 horas.

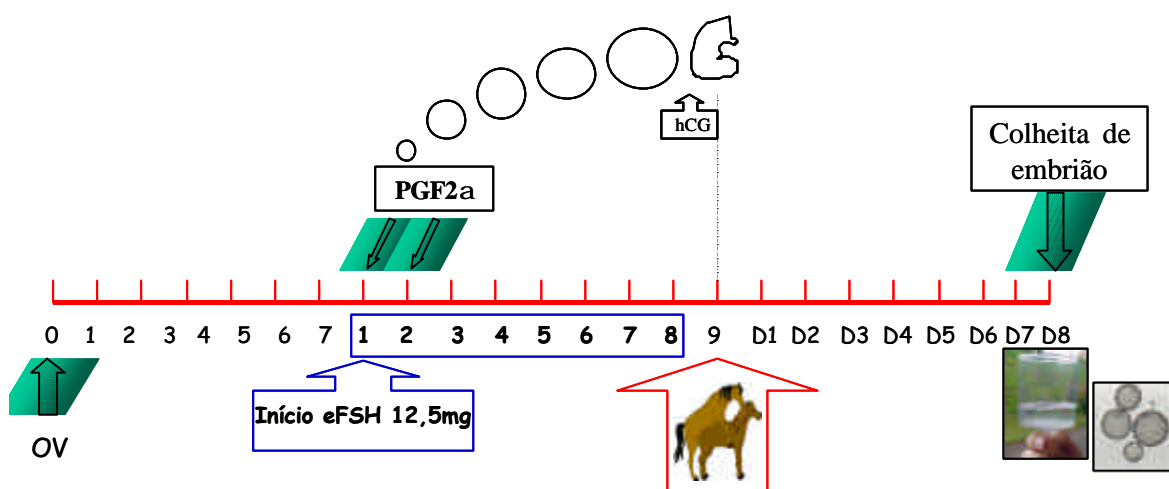


Figura 3- Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo III (eFSH). As doses de eFSH (12,5mg) foram administradas duas vezes ao dia, com intervalos de 12 horas.

EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO

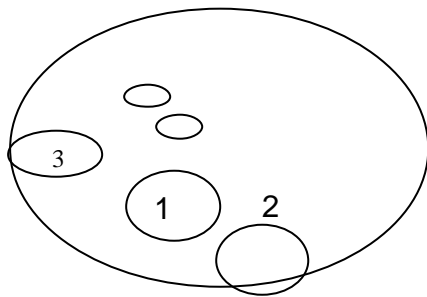
ANIMAL: XXXXXXXX

DATA: XX/XX/XX

GRUPO: XXXX

Dia de Tratamento: XXX

OE

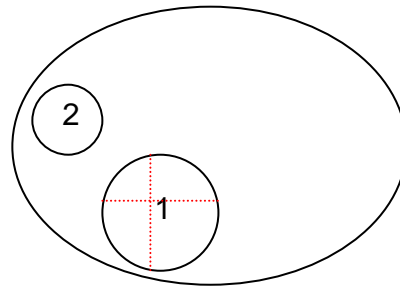


1 - $15 \times 13 = 14\text{mm}$

2 - $12 \times 12 = 12\text{mm}$

3 - $10 \times 11 = 10,5\text{mm}$

OD



1 - $18 \times 19 = 18,5\text{mm}$

2 - $13 \times 14 = 13,5\text{mm}$

Figura 4: Ficha de acompanhamento diário, individual, utilizada para o mapeamento folicular.

3.2 Experimento 2: Comparação entre achados de dinâmica folicular, resposta superovulatória e recuperação de embriões.

3.2.1 Animais

Foram utilizados os mesmos animais do experimento 1.

O experimento foi conduzido simultaneamente ao experimento 1, portanto, utilizou-se dos tratamentos que foram descritos anteriormente.

3.2.2 Colheita dos embriões

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

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

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

Foram realizados três lavados uterinos de um litro por lavado, onde cada litro infundido para o interior do útero, teve seu refluxo para dentro de um filtro coletor de 0,75 µc. Após os três lavados, o filtro foi levado ao laboratório e acrescido de 10 ml do

meio Ham-F 10 + BSA (Nutricell Nutrientes Celulares Ltda, Campinas, S.P.) com o intuito de nutrir o meio onde se encontravam os embriões.

O conteúdo do filtro foi então despejado em uma placa de Petri de 45x25 com o fundo quadriculado, lavou-se o filtro novamente com 20 ml de Ham-F 10 + BSA com o auxílio de uma seringa de 20 ml e uma agulha 30x0,8, para remoção de todo o conteúdo presente no filtro para dentro da placa.

A placa de Petri foi conduzida à lupa, e submetida a uma rigorosa inspeção com o aumento de 20 x e 40x. Localizados os embriões, estes foram banhados em quinze gotas do meio Ham-F 10 + BSA presentes em uma placa de petri 45 x 25, com a finalidade de remover restos de descamações uterinas que pudessem estar aderidos ao embrião.

Sete dias após a colheita de embriões, realizou-se um exame ultrasonográfico minucioso, para diagnosticar-se uma possível gestação de embrião que por ventura não fora recuperado nos lavados uterinos. Portanto, não foi administrada a $PGF_2\alpha$ logo após a colheita dos embriões.

3.2.3 Ensaios Hormonais

Diariamente, após o acompanhamento ultra-sonográfico (descrito no experimento 1), foram coletadas amostras de sangue (em duplicata) obtidas por punção da veia jugular, com auxílio de um tubo "vacutainer" heparinizado, das éguas tratadas nos diferentes tratamentos. As amostras foram coletadas, no mesmo horário, iniciando-se as coletas 02 dias antes do tratamento até 02 dias após a última ovulação (progesterona) e, novamente no 8° dia após ovulação para dosagem de progesterona, com intuito de observar estes níveis, no caso de algum animal apresentar distúrbios na ovulação.).

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 concentrações de progesterona foram

determinadas por radioimunoensaio através do Kit de Progesterona Coat-A-Count (CAC – Diagnostic Products CO Los Angeles, CA) seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras foram avaliadas na Universidade da Califórnia – Davis, EUA, no Laboratório de Endocrinologia sob responsabilidade da Doutora Jannet Roser, pesquisadora da Universidade da Califórnia.

3.2.4 Análise estatística

Os intervalos entre o início do tratamento/controle e o folículo pré-ovulatório, início do tratamento/controle e primeira ovulação, e entre a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a segunda ovulação, foram analisados pelo teste T de Student. Para o estudo das correlações entre o número de folículos no início do tratamento e o número de ovulações, e entre o número de ovulações e as concentrações plasmáticas de progesterona, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

Os níveis plasmáticos de progesterona foram submetidos à análise de regressão linear e múltipla em função do tempo. A diferença estatística foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação da Dinâmica Folicular em éguas tratadas com Extrato de Pituitária Eqüina em doses constantes e decrescentes e FSH eqüino purificado.

No início do acompanhamento ultra-sonográfico dos animais foi observada a população inicial de folículos nos ovários e constatada a presença de vários folículos de diferentes tamanhos, em todos os grupos, os quais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no início do tratamento (D0), conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Nº de folículos totais	7,3±2,0 ^b	7,5±1,8 ^b	7,4±2,3 ^b	12,3±3,4 ^a
Fol de 10 a 15mm	3,5±2,5 ^b	4,5±1,6 ^b	5,6±3,2 ^b	11,3±3,2 ^a
Fol de 16 a 20mm	3,0±2,6 ^a	2,3±1,6 ^a	1,6±1,1 ^a	0,8±0,4 ^a
Folículos > 20 mm	0,8±1,6 ^a	0,7±0,8 ^a	0,2±0,4 ^a	0,2±0,4 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

A partir do início dos tratamentos foi observado o crescimento de vários folículos de diâmetros iniciais de aproximadamente 10mm, em todos os animais. Os animais dos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente) e GIII (FSH) apresentaram o crescimento de vários folículos, simultaneamente, que alcançaram diâmetros médios iguais ou maiores a 30mm. A população média dos folículos, de diferentes tamanhos (10 a 15mm; 16 a 20mm; 21 a 30mm e >30mm), durante os primeiros quatro dias do tratamento dos Grupos I, II, III e IV estão representados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no primeiro dia após o início do tratamento (D1), conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	II	III	GIV
Nº de folículos totais	8,8±1,3	8,0±2,7	11,5±6,1	9,5±2,7
Fol de 10 a 15mm	4,5±2,0	5,8±1,5	5,5±3,3	7,3±1,9
Fol de 16 a 20mm	3,3±1,2 ^{ab}	2,0±1,3 ^b	5,5±3,3 ^a	1,7±1,5 ^b
Fol. de 21 a 30mm	1,0±1,0	0,2±0,4	0,5±0,5	1,7±1,5
Fol. >30mm	0,0	0,0	0,0	0,2

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

Tabela 3 – Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no segundo dia após o início do tratamento (D2), conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Nº de folículos totais	7,5,0±4,0	9,0±2,0	9,0±2,1	10,3±3,7
Fol de 10 a 15mm	4,8±2,7	4,0±1,4	4,3±3,0	7,2±2,6
Fol de 16 a 20mm	3,4±1,3	4,0±0,6	3,6±2,0	2,8±3,5
Fol. de 21 a 30mm	1,5±0,7	1,5±0,6	1,6±0,9	1,3±0,6
Fol. >30mm	0,2	0,0	0,0	0,2

Valor de $P > 0,05$. GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

Tabela 4 - Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no terceiro dia após início do tratamento (D3), conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Nº de folículos totais	8,5±1,5	8,0±3,0	8,5±2,1	6,3±4,8
Fol de 10 a 15mm	3,0±1,8	3,5±2,0	3,0±2,4	3,3±2,2
Fol de 16 a 20mm	3,8±2,0	3,0±2,4	3,0±1,4	1,8±2,1
Fol. de 21 a 30mm	1,3±1,4	2,0±1,4	2,5±1,9	1,0±1,3
Fol. >30mm	0,3	0,0	0,0	0,2

Valor de $P > 0,05$. GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

Tabela 5 - Média e desvio padrão do número de folículos e seus diâmetros, no quarto dia após o início do tratamento (D4), conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Nº de folículos totais	9,0±1,3	9,8±2,6	8,8±1,9	5,3±5,0
Fol de 10 a 15mm	3,0±2,3	1,8±0,8	2,3±2,3	2,2±1,7
Fol de 16 a 20mm	3,5±2,2	4,5±2,2	2,5±1,5	1,8±2,6
Fol. de 21 a 30mm	1,7±1,6	3,2±2,4	3,2±1,6	1,2±1,5
Fol. >30mm	0,8±1,3	0,3±0,8	0,8±1,0	0,2±0,4

Valor de $P > 0,05$. GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

Quando avaliados os Grupos em conjunto foi possível traçar um paralelo entre a população de folículos de diferentes diâmetros (10 a 15mm; 16 a 20mm; 21 a 30mm e >30mm), durante os quatro dias de tratamento, conforme ilustrados nas Figuras 5 e 6.

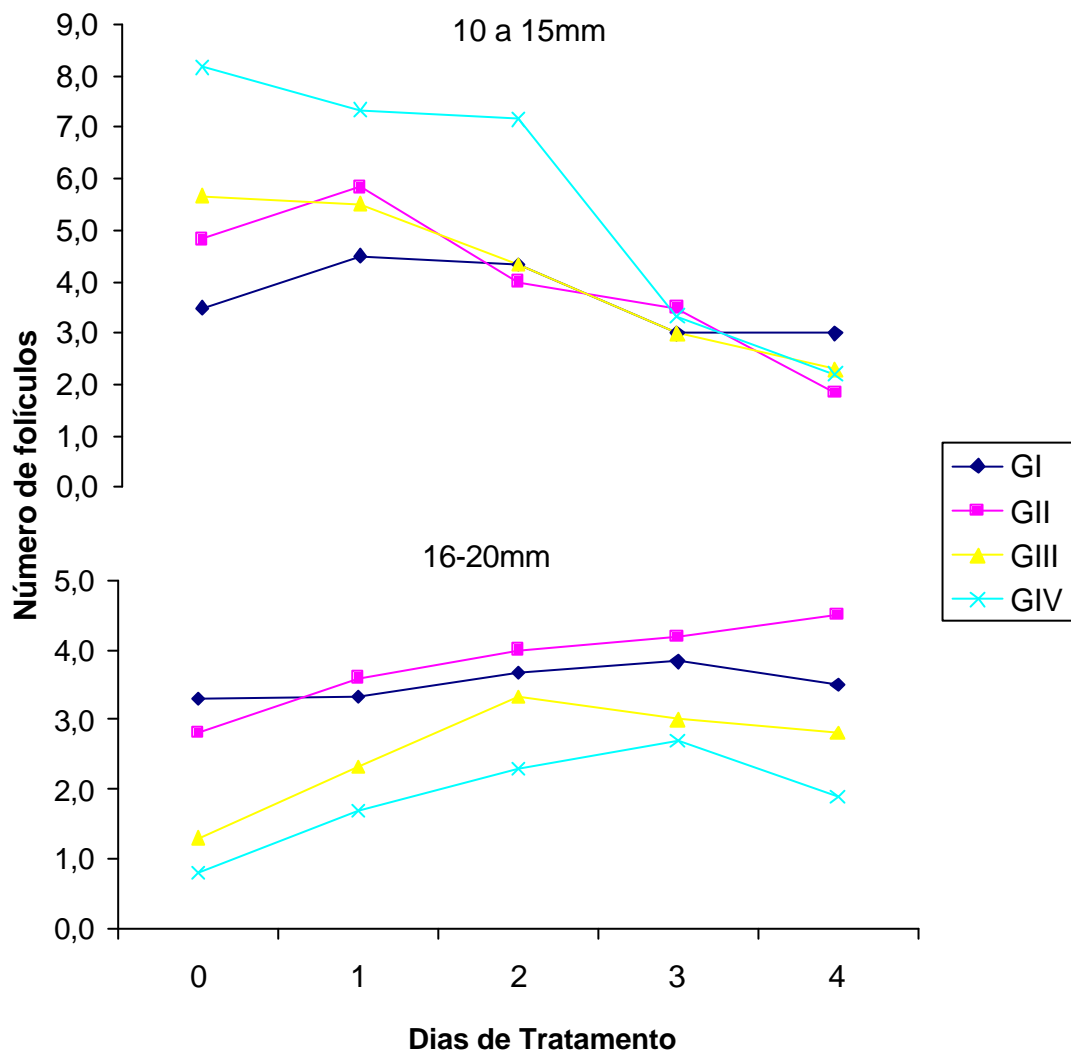


Figura 5 – Número médio de folículos de 10 a 15 mm e 16 a 20mm de diâmetros observados nos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente), GIII (FSH) e GIV (Controle) durante os dias de tratamento.

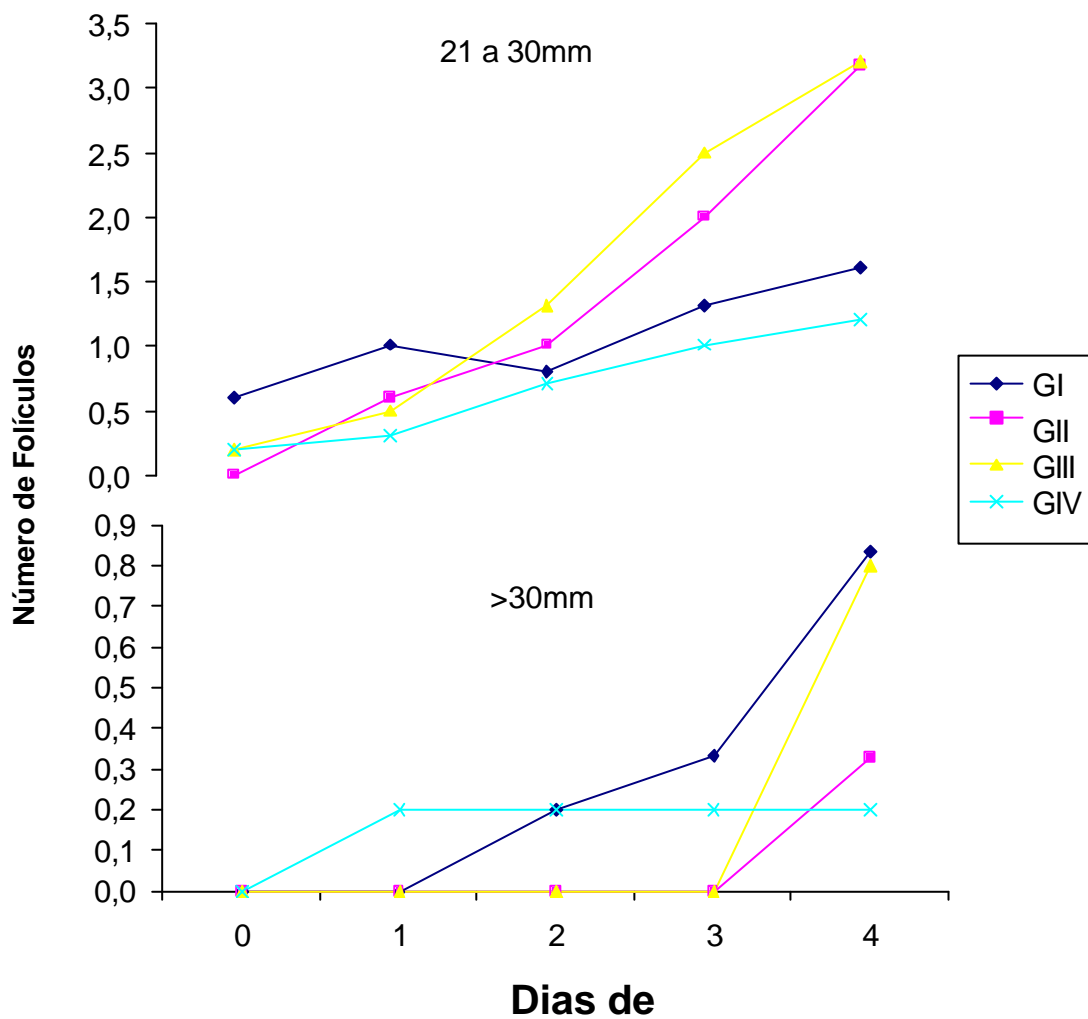


Figura 6– Número médio de folículos de 21 a 30mm e >30mm de diâmetros observados nos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente), GIII (FSH) e GIV (Controle) durante os dias de tratamento.

Nas éguas dos grupos I, II e III ocorreu na maior parte dos ciclos a divergência de mais de um folículo dominante, os quais, a maioria chegou à ovulação. Não houve diferença estatística entre o número médio de folículos que alcançaram diâmetros iguais ou maiores a 30mm entre os grupos, porém os grupos I (EPE Constante), GII (EPE Decrescente) e GIII (FSH) foram numericamente superiores ao grupo controle, no D4.

Por outro lado, conforme o esperado, as éguas do Grupo IV (Controle) apresentaram o crescimento de um único folículo dominante, culminando em ovulação.

Os perfis médios da dinâmica de crescimento do(s) folículo(s) dominante(s), ao longo dos ciclos estrais, a partir da aplicação da Prostaglandina $F_{2\alpha}$, dos Grupos I (EPE Constante), II (EPE Decrescente) III (FSH) e IV (Controle) estão apresentados na Figura 7.

O diâmetro médio do folículo(s) dominante(s) foi superior no grupo IV (Controle) em relação aos grupos I e II e similar ao grupo III. A taxa de crescimento do(s) folículo(s) dominante(s) durante o intervalo entre o início do tratamento a última ovulação não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. Estes dados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Média e Desvio Padrão da Taxa de Crescimento e Diâmetro do Folículo pré ovulatório, conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Nº de folículos que alcançaram 30mm	3,5±1,2 ^{ab}	4,2±1,6 ^b	5,0±1,5 ^b	1±1,0 ^a
Diâmetro médio do Fol. Pré-ovulatório (mm)	35,4±4,4 ^b	35,1±4,2 ^b	38,4±1,3 ^{ab}	41,8±1,7 ^a
Taxa de crescimento do(s) Fol.(s) Dominante(s) (mm/dia)	2,2±0,5 ^a	2,2±0,8 ^a	2,6±0,4 ^a	2,5±0,2 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

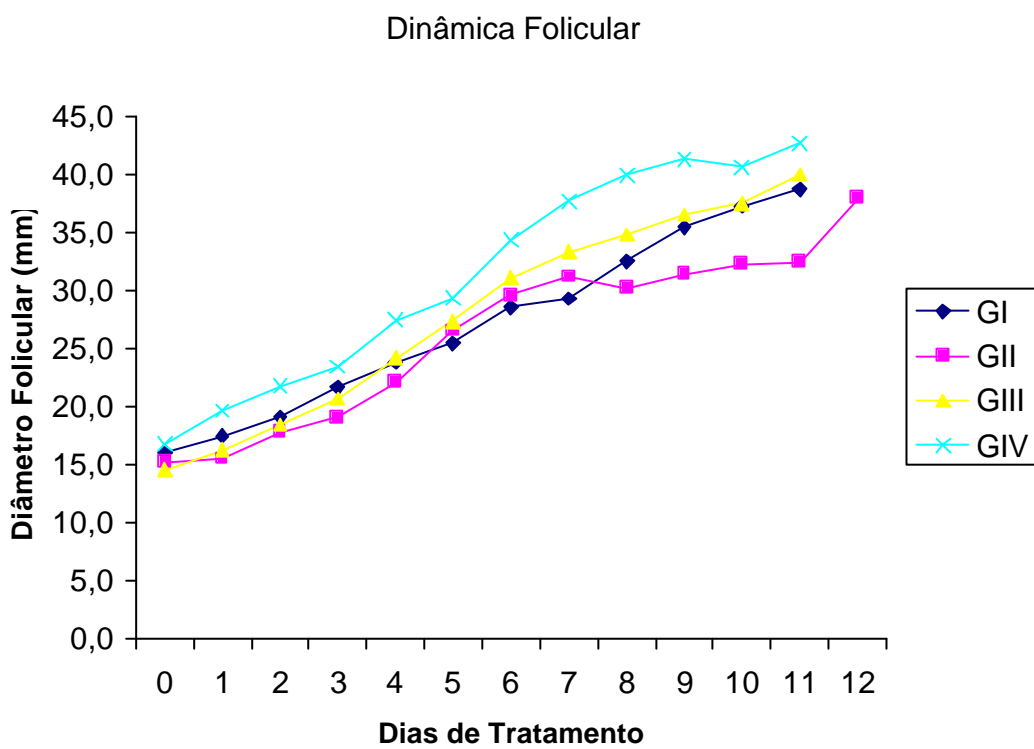


Figura 7 – Perfil médio de crescimento folicular dos folículos que atingiram a dominância dos grupos GI (EPE Constante), GII (EPE Decrescente), GIII (FSH) e GIV (Controle) durante os dias de tratamento.

Experimento 2: Comparação entre achados de dinâmica folicular, resposta superovulatória e recuperação de embriões.

Nos grupos submetidos a tratamentos superovulatórios foram observadas, em média, múltiplas ovulações e um número superior a um embrião por égua.

Quando avaliamos o número de ovulações foi observado, em média, mais de duas ovulações nos grupos submetidos a tratamentos superovulatórios, as porcentagens de animais que apresentaram de 0 a 2, 3 a 5 e mais de 5 ovulações nos grupos estão descritas na tabela 7. De acordo com o número de ovulações observados nos grupos, o GIV (Controle) apresentou diferenças estatísticas ($P < 0,05$) quando comparado ao GII (EPE Decrescente) e GIII (eFSH), no entanto, o GI (EPE Constante) obteve um valor intermediário, sendo semelhante estatisticamente ($P > 0,05$) aos três grupos (GII, GIII e GIV).

Os dados referentes às ovulações observados nos grupos estão apresentados na tabelas 8 e 9.

O número de dias em que os animais foram tratados não apresentou diferença estatística entre os grupos I, II e III, conforme demonstrado na tabela 8. O intervalo entre o dia da aplicação da $PGF_{2\alpha}$ e/ou início do tratamento superovulatório e a primeira ovulação foi semelhante estatisticamente entre os grupos ($P < 0,05$). O intervalo entre a primeira e a última ovulação, foi numericamente inferior para o grupo III (eFSH) em relação aos demais grupos, porém, não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$), conforme demonstrado na tabela 8.

O número médio de embriões recuperados por grupos apresentou diferença estatística entre o GIII e GIV ($P < 0,05$), no entanto, os grupos I e II obtiveram resultados intermediários. Os resultados do número de folículos que alcançaram 30mm, número de ovulações e número de embriões recuperados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 7 - Percentual de éguas que apresentaram de 0 a 2, 3 a 5 e mais de 5 ovulações, conforme grupos.

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

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

GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle)

Tabela 8 - Média e desvio padrão dos dias de tratamento, intervalos entre a aplicação de PGF_{2α} e ovulação e entre ovulações, conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Dias de tratamento	8,0±2,3 ^a	7,2±1,5 ^a	7,8±1,5 ^a	-
À 1 ^o ovulação	9,8±2,9 ^a	9,8±1,5 ^a	9,8±1,3 ^a	10,0±1,6 ^a
Intervalo do início do trat. à última ovulação (dias)	10,3±1,9 ^a	9,8±2,5 ^a	10,2±1,9 ^a	10,0±1,6 ^a
Intervalo da 1 ^o à última ovulação (dias)	1,5±1,3 ^a	1,2±1,2 ^a	0,6±1,0 ^a	-

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).
 GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

Tabela 9- Média e desvio padrão do número de ovulações e número de embriões recuperados, conforme grupos.

Variáveis	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Nº de ovulações	3,3±1,6 ^{ab}	5,0±2,1 ^a	4,8±1,3 ^a	1,0±0 ^b
Ovulação de folículos <30mm	0,3±0,9 ^a	1,0±1,3 ^a	0	0
Número de Embriões	1,2±1,3 ^{ab}	1,8±1,3 ^{ab}	2,6±0,5 ^a	0,5±0,5 ^b
Embriões 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).

GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

O número médio de embriões recuperados foi similar entre os grupos tratados ($P>0,05$), porém os grupos I e II foram também semelhantes estatisticamente ao grupo controle, conforme verificado na tabela 9. Por outro lado, o grupo III foi diferente estatisticamente ($P<0,05$) do grupo controle e semelhante aos demais grupos tratados. Porém, o Grupo III apresentou uma tendência estatisticamente superior aos demais grupos tratados ($P=0,067$).

Foram recuperadas duas estruturas não fertilizadas (ovócitos) na colheita realizada em uma égua do grupo III (égua 3). Este animal apresentou 5 (cinco) ovulações, tendo 3 (três) embriões recuperados e 2 (dois) ovócitos. Nos demais grupos, nenhum ovócito foi identificado.

A taxa de recuperação embrionária, ou seja, o número médio de embriões recuperados por ovulação observada no grupo III foi superior estatisticamente ($P<0,05$) aos demais grupos tratados e semelhante estatisticamente ao grupo controle, conforme figura 8.

A duração do primeiro ciclo que sucedeu os tratamentos superovulatórios foi acompanhada em todos os grupos. Foram observadas durações de 23,9, 22,8, 22,6 dias para os grupos I, II e III respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre eles e quando comparado ao grupo controle (21,4 dias).

Quando se avaliou a correlação entre o número de folículos de diferentes tamanhos no início do tratamento, número de ovulações e embriões recuperados dos grupos isoladamente, foi possível detectar no GI (EPE Constante) uma correlação negativa entre o número de folículos de 10 a 15mm de diâmetro e o número de ovulações, isto é, quanto maior o número de folículos de 10 a 15mm de diâmetro observados no início do tratamento, menor foi o número de ovulações. Além disso, observou-se também uma correlação positiva entre o número de folículos de diâmetro de 16 a 20mm no segundo dia após o início do tratamento e o número de ovulações ($r=0,85$; $P=0,09$).

No GII (EPE Decrescente) uma correlação significativa foi observada entre o número de folículos de 16 a 20mm de diâmetro no segundo dia após o início do tratamento e o número de ovulações ($r= 0,77$; $P=0,06$).

Já no GIII (FSH) houve uma correlação positiva entre o número de folículos iniciais e o número de folículos de 10 a 15mm de diâmetro no início do tratamento ($r=0,98$; $P=0,0001$). E também, uma correlação positiva entre o número de folículos de 16 a 20mm de diâmetro no segundo dia após o início do tratamento e o número de ovulações ($r=0,74$; $P=0,07$).

Nos grupos II e III (EPE Decrescente e FSH) foi observada uma correlação positiva entre o número de ovulações e o número de embriões recuperados, portanto, quanto maior o número de ovulações, maior o número de embriões recuperados ($r=0,71$; $P=0,07$ e $r=0,78$; $P=0,06$, para os grupo GII e GIII, respectivamente).

Nos grupos GI, GII e GIII, os quais receberam tratamentos superovulatórios houve o crescimento, na maioria dos casos, de mais de um folículo que chegou a ovulação durante o período observado. Ocorreram intervalos inter-ovulatórios, superiores a 24 horas, em 50%, 67% e 17% das éguas para os grupos I, II, e III, respectivamente. Os perfis médios do crescimento folicular das éguas, individualmente, por grupo estão demonstrados nas figuras de 9 a 14, e as imagens ultra-sonográficas de uma égua, aleatoriamente por grupo estão demonstradas nas figuras de 17 a 19.

Foi observado em um ciclo do GIII (FSH) o crescimento de seis folículos que atingiram diâmetro médio de 43,5mm no dia em que se aplicou hCG (dia 11), conforme o protocolo utilizado, e estes folículos permaneceram sem grandes alterações de diâmetro médio durante, aproximadamente, 15 dias após a aplicação, passado este período ocorreu a regressão destas estruturas, e o animal voltou a ciclar normalmente após 18 dias da regressão total dos folículos, este animal foi retirado da análise total dos dados. A dinâmica folicular desse animal (égua 6) durante o início do tratamento com FSH eqüino purificado até cinco dias após a aplicação de hCG está demonstrada na figura 13.

Apenas em um ciclo de uma égua (égua 1), não houve resposta ao tratamento superovulatório no GI (EPE Constante), ocorrendo a divergência de apenas um folículo pré-ovulatório acarretando em ovulação, neste mesmo animal foi observado a ovulação de um folículo de diâmetro médio de 25,2mm, no segundo dia de tratamento. Em outro animal no GII (EPE Decrescente) foi observado também um

folículo de diâmetro médio de 25,5mm no 5º dia de tratamento, que chegou a ovulação antes da aplicação do hCG (égua 4). Nestas éguas que apresentaram ovulação de diestro foi realizada a dosagem de progesterona ao longo dos dias de tratamento, com o objetivo de verificar se ocorreu a formação de um corpo lúteo funcional durante o diestro.

O perfil médio do crescimento folicular e as concentrações de Progesterona, ao longo dos dias de tratamento, dos animais que apresentaram ovulações de diestro, estão demonstradas nas figuras 15 e 16.

A maioria dos folículos pré-ovulatórios chegou à ovulação, no entanto, em apenas uma égua do GI, onde foi observada a presença de sete folículos pré-ovulatórios, ocorreu a ovulação de somente cinco destes folículos (diâmetro médio de 35,1mm). Três dias após a ovulação dos cinco folículos, os dois folículos restantes luteinizaram, apresentando um diâmetro médio de 38,2 mm.

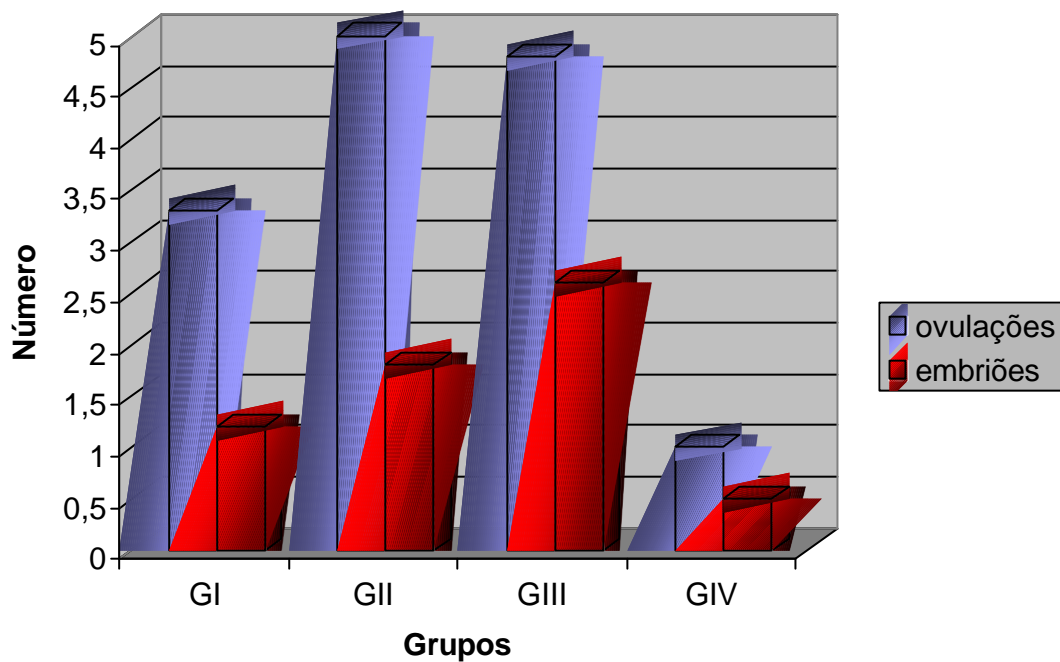


Figura 8 – Número médio de ovulações e embriões recuperados, segundo grupos. GI (EPE Constante); GII (EPE Decrescente); GIII (FSH); GIV (Controle).

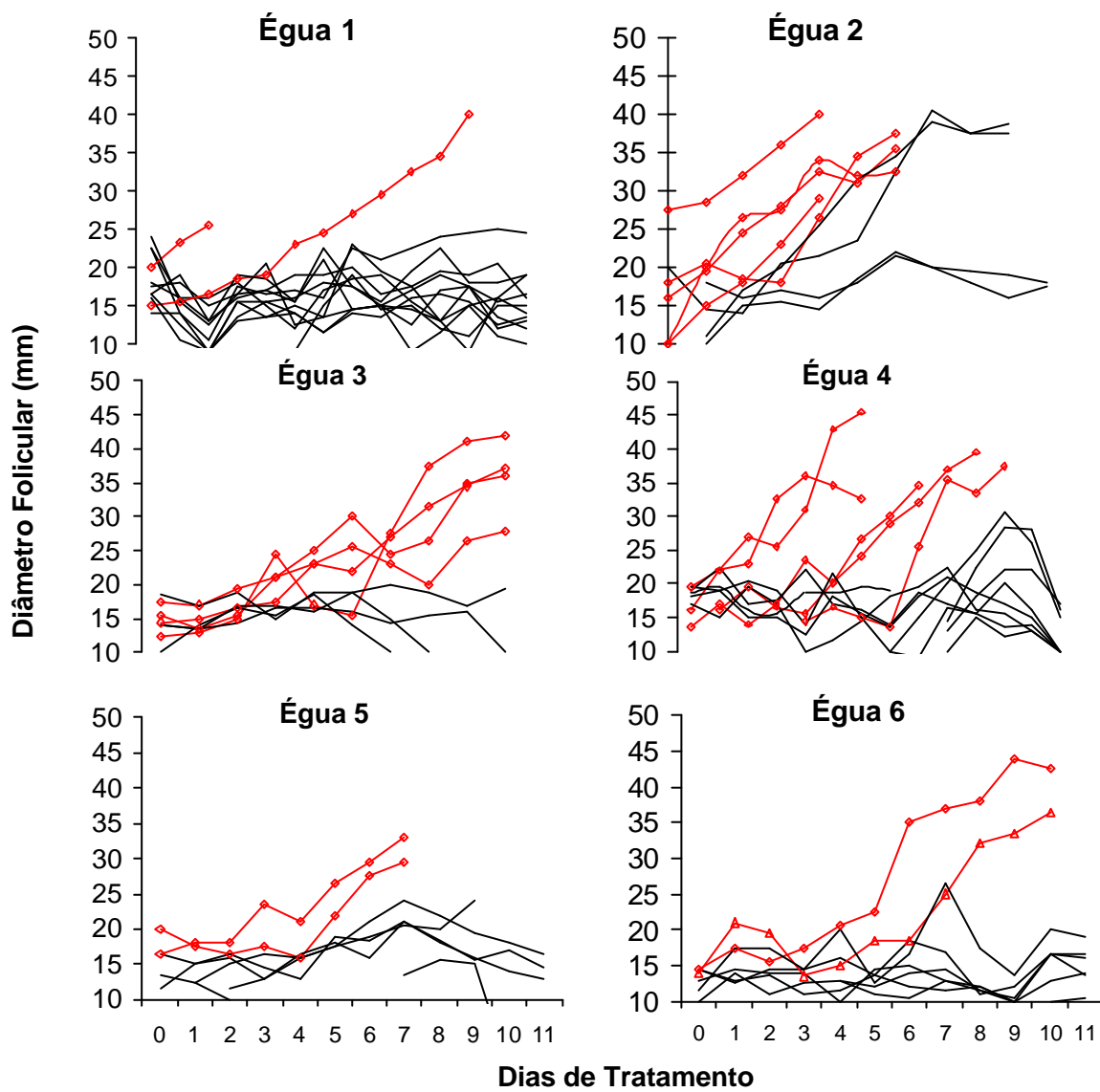


Figura 9 – Dinâmica folicular, durante os dias de tratamento, observada no grupo GI (EPE Constante), individualmente. (—◆ folículos que ovularam; — folículos subordinados).

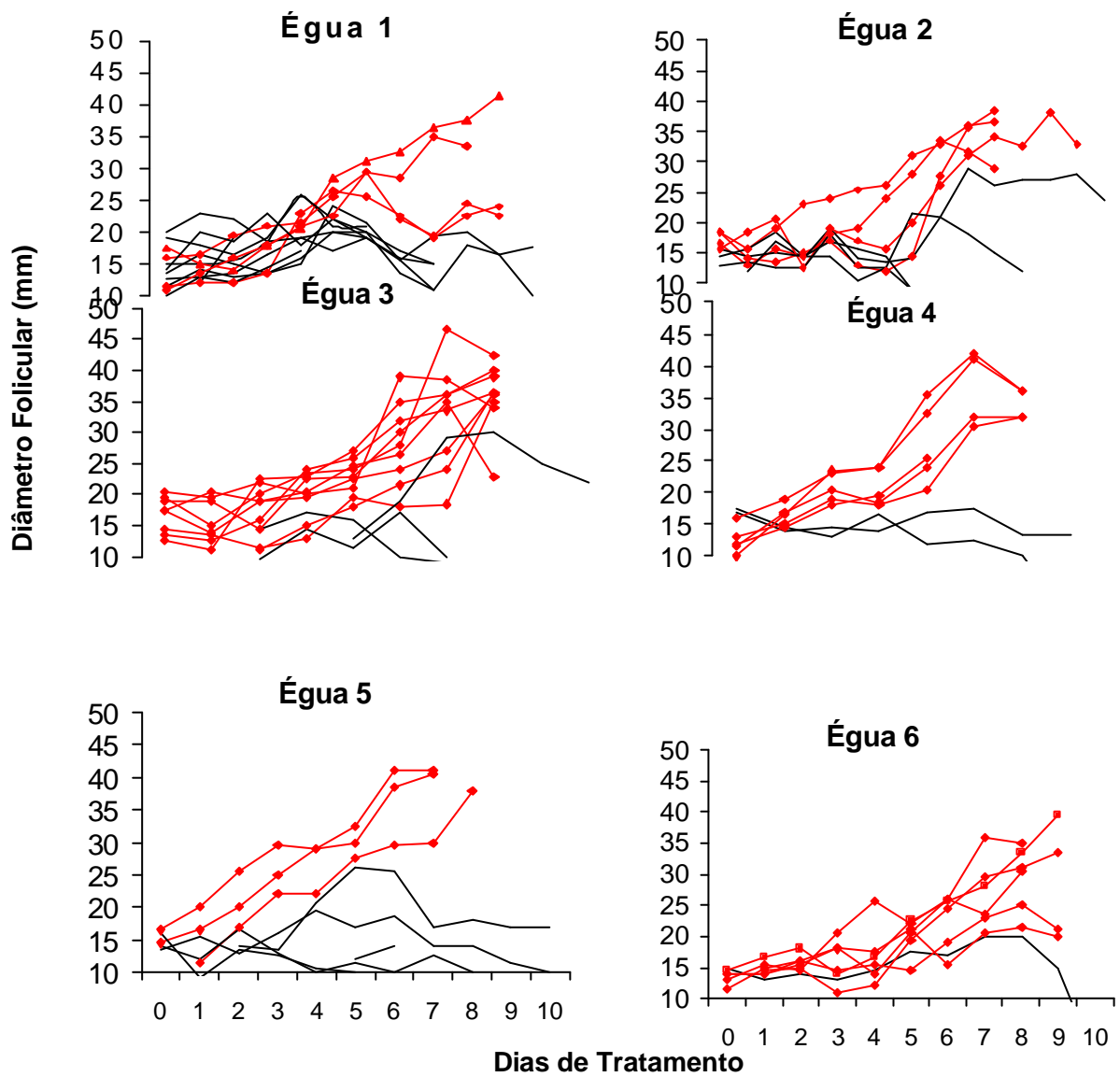


Figura 10 – Dinâmica folicular, durante os dias de tratamento, observada no grupo GII (EPE Decrescente), individualmente. (—♦— folículos que ovularam; — folículos subordinados).

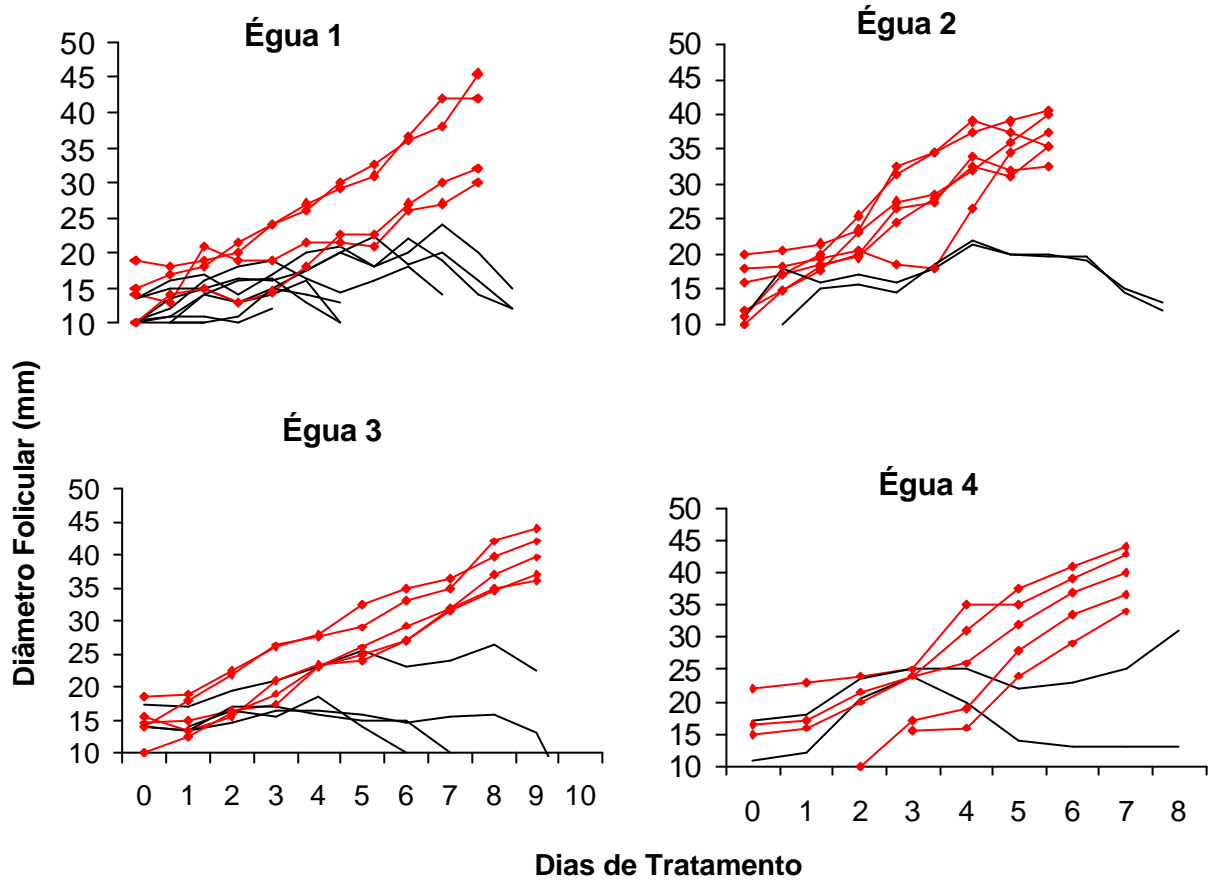


Figura 11 – Dinâmica folicular, durante os dias de tratamento, observada no grupo III (FSH eqüino purificado) individualmente. (—♦ folículos que ovularam; — folículos subordinados).

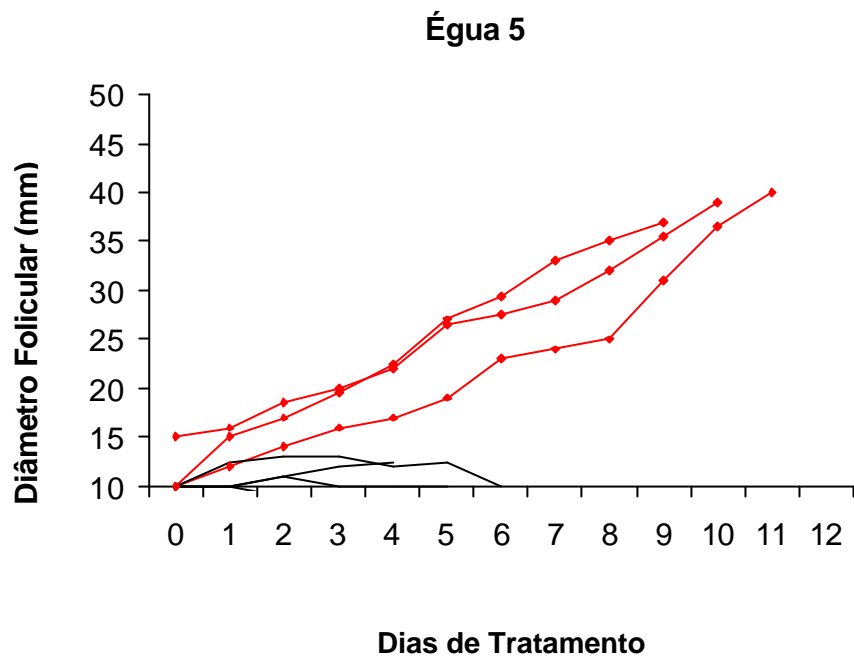


Figura 12 – Dinâmica Folicular observada ao longo dos dias de tratamento da égua 2, Grupo III. (◆ folículos que ovularam; ◆ folículos subordinados).

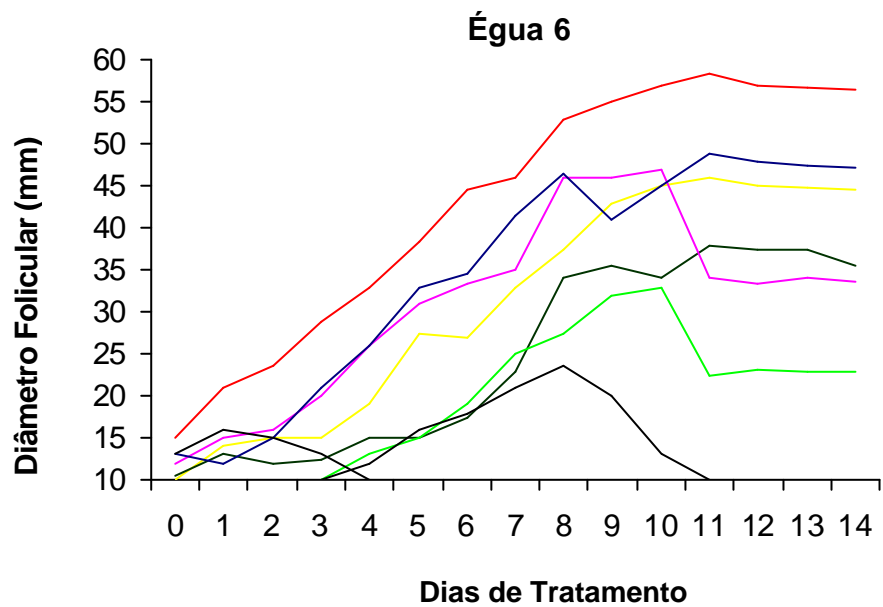


Figura 13 – Dinâmica Folicular observada ao longo dos dias de tratamento da égua 6, Grupo III, a qual não ovulou durante o período observado.

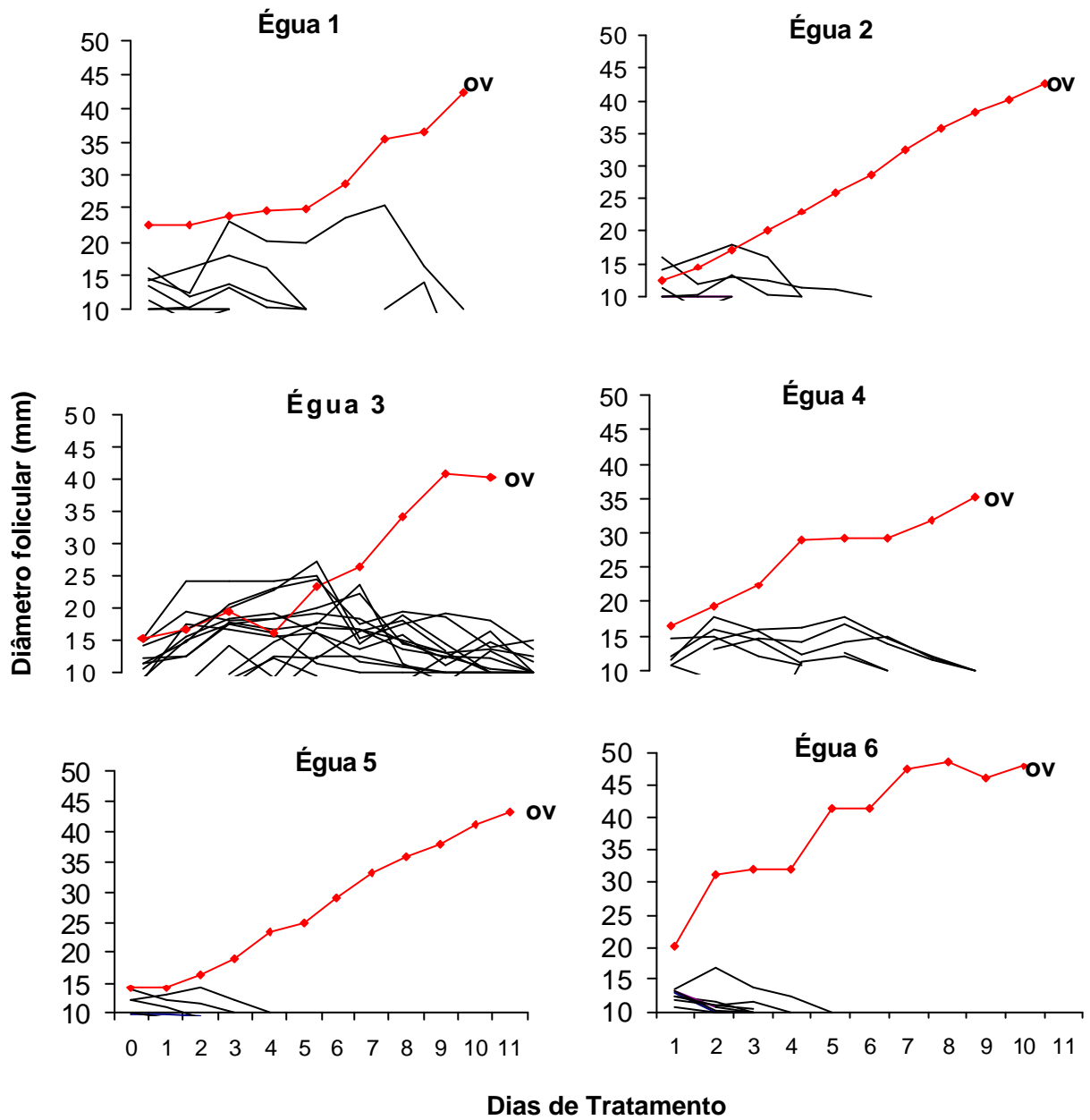


Figura 14 – Perfil médio de crescimento folicular ao longo dos dias de tratamento observados no grupo GIV (Controle).

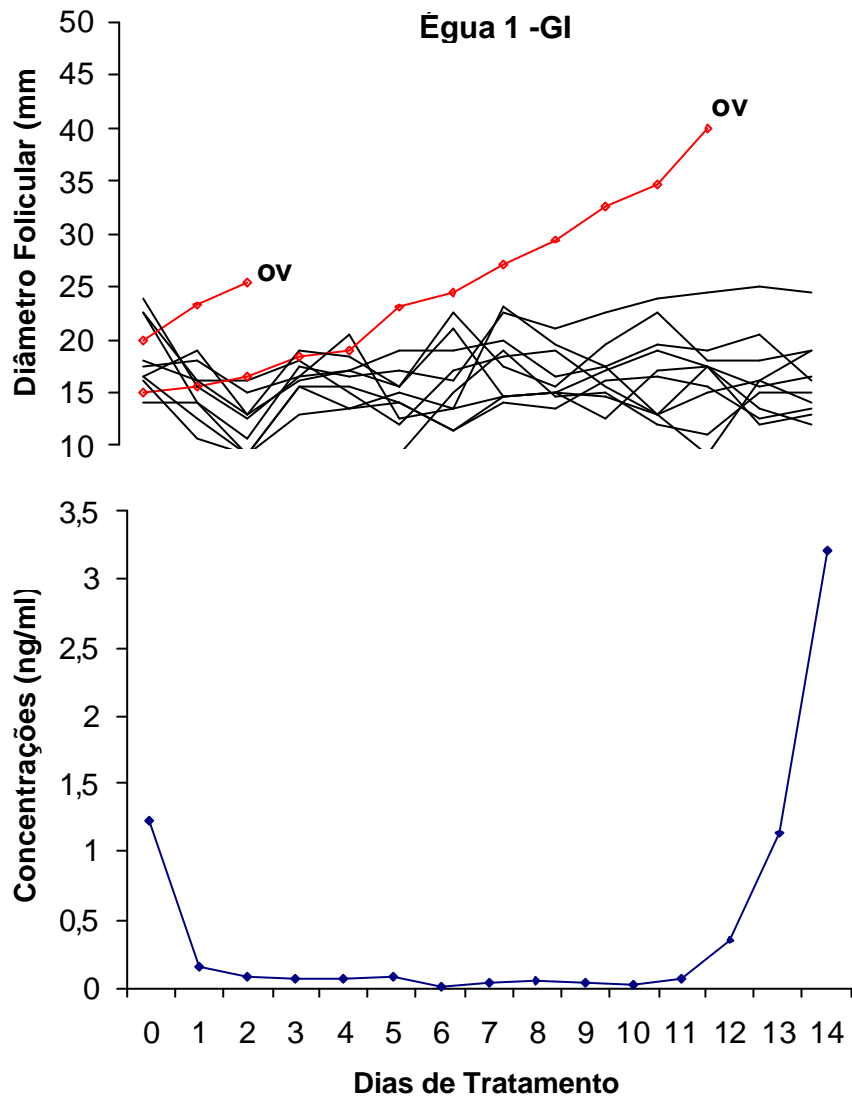


Figura 15– Perfil de crescimento folicular ao longo dos dias do tratamento e concentrações plasmáticas de Progesterona observadas na égua 1 do grupo 1 (EPE Constante) que apresentou ovulação de um folículo de 25mm de diâmetro no segundo dia de tratamento.

Égua 4 - GII

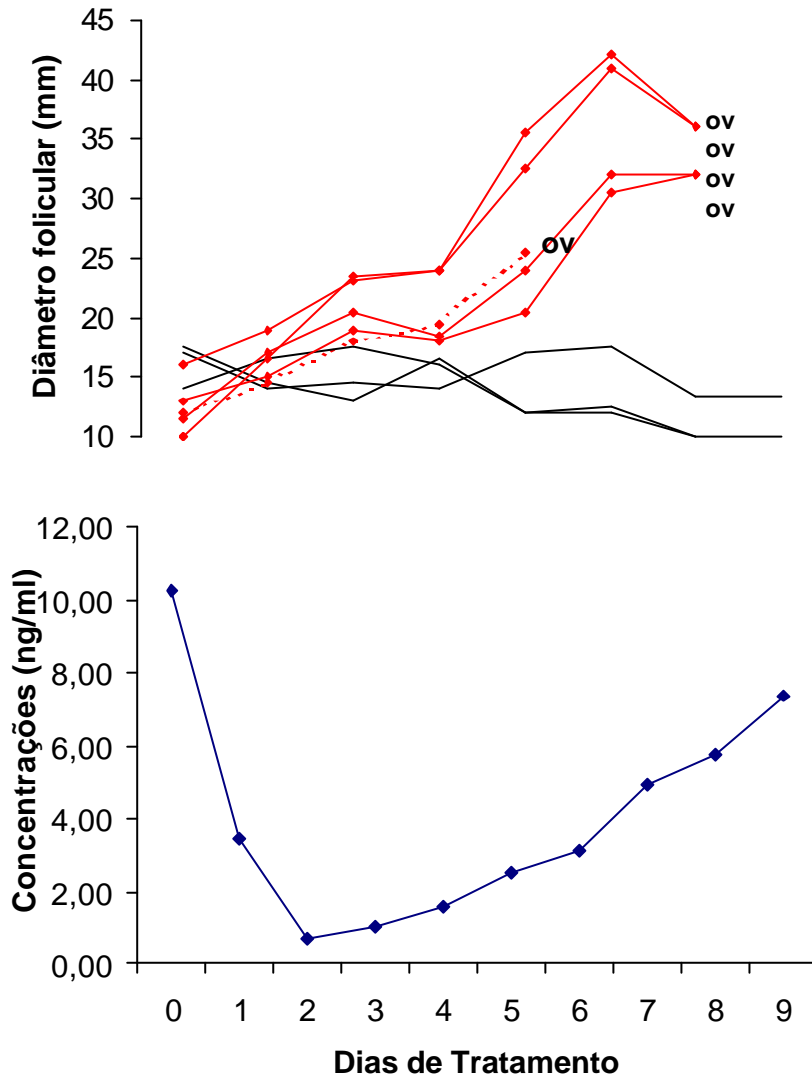
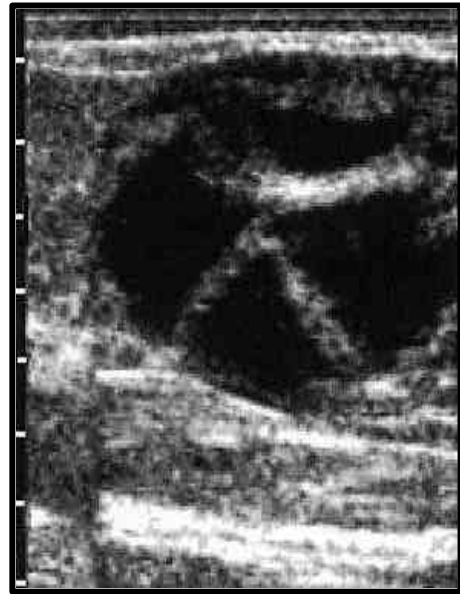


Figura 16- Perfil de crescimento folicular ao longo dos dias do tratamento e concentrações plasmáticas de Progesterona observadas na égua 4 do grupo 2 (EPE Decrescente que ovulou um folículo de 25,2mm de diâmetro no quinto dia de tratamento).



A



B

Figura 17 – Imagens ultra-sonográficas observadas no segundo (A) e quarto dia (B) do tratamento superovulatório com EPE Decrescente (Grupo II), na égua 5. A distância entre 2 pontos equivale a 10mm.



A



B

Figura 18 – Imagens ultra-sonográficas observadas no terceiro dia (A) e sétimo dia (B) do tratamento superovulatório com FSH eqüino (Grupo III), na égua 2. A distância entre 2 pontos equivale a 10mm.

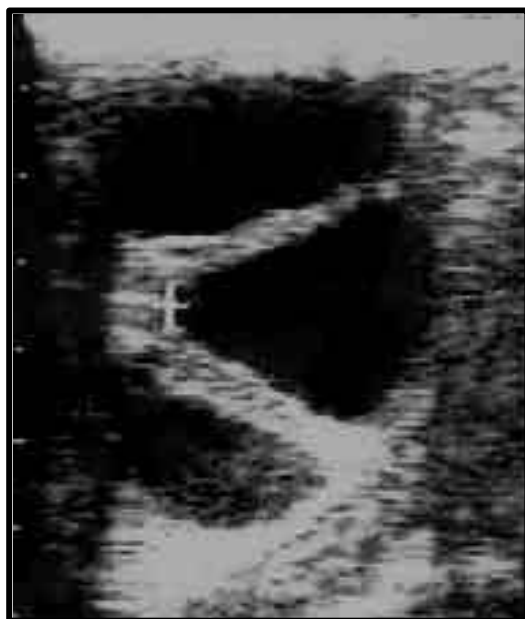


Figura 19 – Imagem ultra-sonográfica observada no terceiro dia do tratamento superovulatório com EPE Constante (Grupo I), na égua 4.

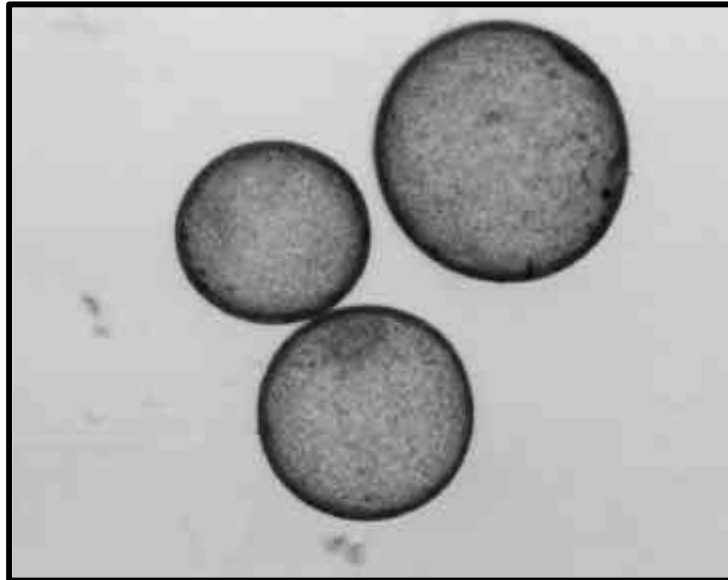


Figura 20 – Embriões recuperados de égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (égua 4).

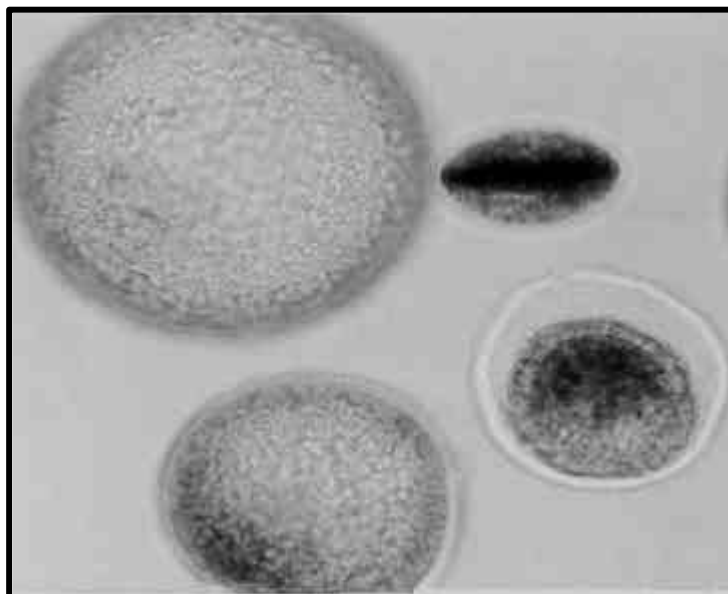


Figura 21 – Embriões e ovócito recuperados de égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (égua 2).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Segundo Woods e Ginther (1985) o número de folículos existentes no dia do início do tratamento está diretamente relacionado com o número de ovulações dos grupos submetidos a tratamentos superovulatórios. Contudo, neste experimento o tratamento superovulatório iniciou-se após o dia 10 do diestro, e neste momento já deve ter ocorrido o recrutamento de uma onda folicular.

Em nosso estudo, inicialmente, analisamos as modificações que ocorreram na população de folículos durante os primeiros quatro dias de tratamento. Por ter havido uma grande variação em relação ao momento da primeira ovulação entre as éguas após o início do tratamento, padronizamos os dados num período de tempo em que nenhuma ovulação tivesse ocorrido. Para isso, utilizamos as seguintes denominações: DO para o dia em que se iniciou o tratamento, D1 para o primeiro dia do início do tratamento, D2 para o segundo e assim sucessivamente até o D4.

No primeiro dia após o início do tratamento foi possível observar diferença significativa ($P < 0,05$) entre o número de folículos de 16 a 20 mm de diâmetro entre os grupos. O grupo III (FSH eqüino) foi semelhante ao GI (EPE Constante), porém apresentou uma tendência a ser superior ($P = 0,06$) a todos os outros. Observamos que no grupo III houve um aumento do número total de folículos já no primeiro dia depois de iniciado do tratamento. Observamos, também, um aumento do número de folículos de 16 a 20mm e a permanência do número de folículos de 10 a 15mm, indicando uma superioridade em relação ao estímulo mais precoce do crescimento de novos folículos no grupo III, quando comparado com os demais grupos.

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) no segundo dia após o início do tratamento (D2) nas diferentes categorias de folículos entre os grupos. Entretanto, quando comparado ao primeiro dia de tratamento foi possível observar no grupo III (eFSH) um aumento significativo ($P < 0,05$) no número de folículos de 21 a 30mm e uma redução do número de folículos de 16 a 20mm, indicando um crescimento dos folículos de 16 a 20mm do dia anterior. Este achado foi

menos evidente nos outros grupos tratados (I e II) e concordando com os achados de Woods e Ginther (1985), os quais descreveram um aumento no número de folículos >20mm de diâmetro após o início do tratamento superovulatório com EPE.

No entanto, no D2, foi observada correlação positiva entre o número de folículos de 16 a 20mm de diâmetro e o número de ovulações, em todos os grupos tratados. Dados específicos para ser discutidos, sobre estes achados, não foram encontrados na literatura. Outros estudos se referem ao dia do início do tratamento (Woods & Ginther, 1984; Carmo, 2003).

No quarto dia após início de tratamento (D4) foi observada uma tendência ($P=0,064$) ao aparecimento mais precoce de folículos de >30mm de diâmetro nos grupos I (EPE Constante) e III (eFSH) em relação aos grupos II (EPE Decrescente) e IV (Controle).

Quando os dados da população de folículos foram analisados em conjunto durante os dias, foi observada uma curva decrescente no número de folículos de 10 a 15mm em todos os grupos. Já o número de folículos de 16 a 20mm apresentou uma curva crescente até o D2 nos grupos I, III e IV e a partir daí houve um leve decréscimo. Contudo, no grupo II (EPE Decrescente) a curva do número de folículos de 16 a 20mm foi crescente durante os dias avaliados, até D4. Este fato nos leva a supor que doses decrescentes de EPE estimulam, com maior eficiência, o crescimento de folículos pequenos.

A partir do D2 também foi observada uma curva crescente do número de folículos de 21 a 30mm em todos os grupos, porém os grupos II e III apresentaram um crescimento mais acentuado. A curva do número de folículos de diâmetro >30mm começou a ser crescente a partir do D1 no grupo I (EPE Constante) e a partir do D2 nos grupos II (EPE Decrescente) e III (FSH). O surgimento do folículo >30mm no Grupo IV (controle) ocorreu no D1 em uma única égua.

É possível afirmar, baseado nos resultados apresentados, que em éguas submetidas aos tratamentos superovulatórios propostos, as diferenças na dinâmica de crescimento folicular começam a surgir no 3º ou 4º dia após o início do tratamento.

Essas diferenças são mais evidentes nos grupos tratados com EPE em doses decrescentes (GII) e com FSH eqüino purificado (GIII).

Portanto, o EPE em doses constantes e decrescentes e o eFSH purificado foram capazes de induzir vários folículos subordinados a prosseguir o seu crescimento e culminar com ovulação. Isso foi claramente demonstrado pela diminuição da população de folículos de 10 a 15mm de diâmetro e aumento do número de folículos de diâmetros de 16- 20 e 21-30mm, durante os primeiros quatro dias de tratamento.

Os folículos que chegaram a ovulação em todas as éguas dos grupos tratados já eram evidenciáveis através do exame ultra-sonográfico no início do tratamento, portanto, estes mesmos folículos foram potencializados a ovular e não folículos de uma nova onda folicular. Talvez o recrutamento destes folículos tenha ocorrido antes do D7 pós-ovulação, momento este em que se aplicou o luteolítico e iniciou-se o tratamento superovulatório. Isto também foi observado no grupo controle (não tratado) onde um folículo já existente no dia 7 pós-ovulação seguiu seu crescimento chegando a ovulação. Estes achados entram em conflito com os resultados de Woods & Ginther (1985) que observaram que os folículos de diâmetros superiores a 10mm palpados no dia 15 do diestro teriam sido recrutados na metade do diestro. No entanto, concordando com o relatado por Buratini (1997) que em éguas com uma onda folicular a emergência folicular ocorre, em média, no dia 6 do diestro, o que pode justificar a presença destes folículos no dia 7.

O fato do número de folículos de 16 a 20mm e 21 a 30mm de diâmetro ter aumentado significativamente durante os primeiros cinco dias de tratamento nos grupos tratados (GI, GII e GIII) indica que o momento do início do tratamento superovulatório foi anterior a atresia dos folículos subordinados. Vários dos folículos “subordinados” continuaram seu crescimento, o que não foi observado, como esperado, no grupo controle (GIV) onde foi observado o crescimento de um único folículo que chegou a ovulação.

A taxa de crescimento médio diário do(s) folículo(s) dominante(s) observada nos grupos tratados GI (2,2mm), GII (2,2mm) foram numericamente semelhantes à taxa relatada por Palmer et al. (1993) os quais observaram um crescimento de 2,1 mm ao

dia em éguas pôneis superovuladas com o EPE, e 2,0mm/dia para Pierson & Ginther (1990) em éguas superestimuladas com EPE.

O crescimento diário dos folículos observados no grupo III (eFSH; 2,6mm) e grupo IV (Controle; 2,5mm) foram semelhantes ao relatado por Ginther, (1986) (2,5 a 3,0 mm) para éguas não superovuladas. Demonstrando com estes achados que o estímulo provocado pelo FSH eqüino purificado foi similar ao que ocorre fisiologicamente.

O diâmetro médio do(s) folículo(s) pré-ovulatório(s) dos grupos I, II III e IV ($35,4\pm 4,4$; $35,1\pm 4,2$; $38,4\pm 1,3$ e $41,8\pm 1,7$ mm, respectivamente) demonstrou haver diferença estatística entre o grupo IV (controle) e os grupos I e II, sendo que o grupo III (eFSH) apresentou valor intermediário, portanto foi semelhante estatisticamente aos demais. Essas observações entram em conflito com o descrito por Ginther (1992) que relata que éguas com duplas ou mais ovulações possuem folículos pré ovulatórios menores devido à compressão destes folículos no ovário. Por outro lado, o fato do Grupo III apresentar valores semelhantes ao grupo controle tem relação com o tamanho homogêneo dos folículos pré-ovulatórios melhor observado neste grupo (III) do que nos demais grupos tratados.

A média e o desvio padrão entre os dias de tratamento com o EPE Constante, Decrescente e o FSH eqüino ($8,0\pm 2,3$; $7,2\pm 1,5$ e $7,8\pm 1,5$ dias, respectivamente) e o intervalo entre o início do tratamento e a primeira ovulação ($9,8\pm 2,9$; $9,8\pm 1,5$ e $9,8\pm 1,3$ dias respectivamente) não apresentaram diferenças estatísticas.

Quando realizamos a avaliação em conjunto da resposta superovulatória dos grupos tratados foi observado que 94% das éguas responderam ao tratamento, ou seja, responderam com mais de uma ovulação.

Nossos achados foram superiores a vários dados descritos na literatura em relação a porcentagem de resposta superovulatória de éguas tratadas com EPE, tais como os relatados por Lapin & Ginther (1977) que 57% das éguas que foram superovuladas no período do diestro e 43% das éguas superovuladas no período do estro, responderam ao tratamento; e também Douglas (1974) que observou resposta

superovulatória em 75% das éguas tratadas. Por outro lado foram similares aos achados de Woods & Ginther (1983), Squires et al. (1987), Dippert et al. (1994), Alvarenga et al. (2001), Scoggin et al. (2002) que obtiveram resposta superovulatória em 85,7%, 92%, 92,9%, 100% e 90% das éguas, respectivamente.

Como visto anteriormente, não houve diferença entre os grupos quanto ao percentual de éguas que responderam aos tratamentos, onde a grande maioria dos animais (94%) apresentou mais de uma ovulação. A observação de uma égua no grupo III (eFSH purificado) não haver ovulado a despeito de apresentarem 6 folículos pré-ovulatórios merece ser mais bem estudado, já que não foram encontrados na literatura relatos por outros autores.

As éguas que apresentaram ovulações durante o período de tratamento, com folículos de tamanhos menores aos folículos pré-ovulatórios foram avaliadas isoladamente. A égua 1 do grupo 1(EPE Constante) foi observada a ovulação de um folículo de diâmetro médio de 25,2mm, no segundo dia de tratamento, esta égua não apresentou resposta ao tratamento superovulatório, ocorrendo a divergência de apenas um folículo pré-ovulatório que culminou em ovulação. Neste caso foi realizada a dosagem de progesterona ao longo dos dias de tratamento para observar se houve formação um corpo lúteo funcional. Após a ovulação observada, foi observado que as concentrações de progesterona não ultrapassaram 1ng/ml após a ovulação do folículo de 25,2mm, somente elevou após a ovulação no 10º dia de tratamento.

Em outro animal no GII (EPE Decrescente) foi observado também um folículo de diâmetro médio de 25,5mm no 4º dia após o início do tratamento, que chegou a ovulação antes da aplicação do hCG (égua 4). Nesta égua, também foi realizada a dosagem de progesterona ao longo dos dias de tratamento e observado um aumento nas concentrações plasmáticas deste hormônio a partir do dia 2 (D2) e estando acima de 1ng/ml no dia da ovulação de diestro (D4).

Neste animal, aparentemente, houve formação de um corpo lúteo funcional, isto é, este corpo lúteo contribuiu para o aumento das concentrações de progesterona, já que os níveis plasmáticos deste hormônio ficaram acima de 1ng/ml após a ovulação. Esta égua apresentou mais 4 ovulações e 2 embriões recuperados, tendo uma resposta

superovulatória e número de embriões recuperados similar aos outros animais do grupo. Demonstrando que mesmo a progesterona tendo permanecido elevada, não houve interferência na resposta superovulatória. Interessante foi o fato deste animal ter ciclado normalmente sem a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para lisar o corpo lúteo que se formou.

Similarmente a este fato observado em nosso trabalho, Riesenber et al. (2001) relataram que as concentrações plasmáticas de progesterona estiveram aumentadas durante o pré-estro e pós-estro em ovelhas superovuladas com FSH suíno, não afetando a resposta superovulatória.

No que diz respeito a ovulações de diestro, Ginther (1992) relatou que ovulações de diestro ocorrem em 3 a 4% dos ciclos, entre os dias 2 e 15 do ciclo estral, não são acompanhadas de estro e ocorrem mesmo com concentrações de progesterona altas. Corpos lúteos oriundos de ovulações de diestro contribuem para o aumento da fase luteal por dois motivos; primeiro por ser imaturo e não responsivo no momento da liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio e provavelmente por contribuir com a manutenção de altos níveis de Progesterona.

O número médio de ovulações por égua observado nos grupos I, II, III e IV ($3,3 \pm 1,6$; $5,0 \pm 2,1$; $4,8 \pm 1,3$; $1,0 \pm 0$ ovulações, respectivamente) demonstrou uma diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle, o que já era esperado. Com isso podemos afirmar que os protocolos utilizados são capazes de super estimular, com eficiência, a atividade ovariana em éguas cíclicas.

O número médio de ovulações por égua, observados no grupo submetido a tratamento superovulatório com EPE em doses constantes (3,3 ovulações/égua), foi inferior aos descritos por Alvarenga et al. (2001) e Scoggin et al. (2002) que obtiveram 7,1 e 4,7 ovulações por égua, respectivamente utilizando 25mg de EPE duas vezes ao dia. Por outro lado, o número de ovulações obtido neste grupo foi superior aos números médios de ovulações observados por Douglas (1974), Hofferer et al. (1991) e Dippert et al. (1992) quando administraram EPE 1 vez ao dia (2,3, 2,2 e 2,9 ovulações/égua, respectivamente).

A resposta superovulatória do Grupo II (EPE Decrescente - 5,0 ovulações/égua) observada em nosso trabalho foi superior a relatada por com Scoggin

et al. (2002) quando também utilizaram doses decrescentes de EPE duas vezes ao dia (3,3 ovulações/égua).

Quando avaliamos o número de ovulações por égua (4,8 ovulações/égua) obtido com o tratamento com FSH eqüino purificado (Grupo III) este foi superior ao descrito por Rosas et al. (1998) e Alvarenga et al. (2003) que utilizaram o eFSH em éguas ciclantes, e alcançaram taxas iguais a 4,6, e 4,0, respectivamente; e também superior ao relatado por Niswender et al. (2004), que obtiveram 2,5 ovulações por égua, utilizando protocolo para éguas em fase transicional com eFSH.

No entanto, o número médio de ovulações com eFSH purificado observado em nosso trabalho foi inferior ao relatado por Peres et al. (2004) quando tratou éguas em fase transicional (5,57 ovulações/égua).

Em relação a recuperação embrionária, não foi observada diferença estatística entre os grupos submetidos a tratamentos superovulatórios (1,2, 1,8 e 2,6 embriões/égua para os grupos I, II e III, respectivamente). No entanto, o número de embriões recuperados no grupo III (eFSH) foi numericamente superior aos grupos I e II (EPE constante e decrescente), além disso, apresentou uma tendência a ser superior aos demais grupos tratados ($P=0,067$). O reduzido número de animais utilizados nos grupos experimentais pode ter interferido na análise estatística dos dados. Os índices de recuperação embrionária observados nos grupos II e III foram estatisticamente superiores ($P<0,05$) do que o grupo IV (controle).

Foi observada uma grande variação no tamanho dos embriões, mesmo tendo ocorrido as ovulações de forma sincronizada. Esta observação indica que, provavelmente, alguns ovócitos podem ter completado seu processo de maturação no oviduto, fato este que pode ocorrer segundo Armstrong (1993) e Scott et al., (2001).

Porém, todos os embriões recuperados nos grupos foram classificados como embriões morfolologicamente normais, concordando com Squires et al. (1987) que observaram que a viabilidade dos embriões oriundos de éguas com ovulação simples, ovulações múltiplas espontâneas e ovulações múltiplas induzidas, é a mesma. Da mesma forma, Alvarenga et al. (2001) observaram variações no desenvolvimento

embrionário de éguas superovuladas, demonstrando também serem morfologicamente normais os embriões recuperados.

As taxas de recuperação embrionárias observadas nos grupos tratados com EPE em doses constantes e decrescentes foram similares entre si e inferiores ao grupo controle (36%, 36% e 50% para os grupos I, II e IV, respectivamente) estando de acordo com o reportado por vários autores (DOUGLAS et al., 1974; WOODS & GINTHER, 1982; PALMER et al., 1993) que decreveram que a taxa de recuperação embrionária por ovulação é similar ou até inferior a taxa observada em éguas que não foram submetidas a um tratamento superovulatório.

No entanto, a taxa de recuperação embrionária observada no eFSH foi similar ao controle (54% vs. 50%). Essa informação nos permite concluir que o tratamento com FSH eqüino purificado foi o que mais se aproximou das condições fisiológicas.

Poucos estudos foram realizados com o eFSH em éguas. Rosas et al. (1998) utilizaram uma fração enriquecida de FSH eqüino comparado ao EPE, e decreveram que o número de ovulações foi superior para o grupo FSH (4,6 vs. 3,6/égua), porém o número de embriões recuperados em éguas superovuladas foi similar entre os grupos eFSH e EPE em doses crescentes (2,0 e 2,0), sendo estes resultados inferiores aos observados no presente trabalho.

O número de embriões recuperados no Grupo III (eFSH; 2,6) foi superior ao reportados por vários autores que utilizaram diferentes doses e freqüências de administração de EPE: Woods et al. (1984), Squires et al. (1987), Dippert et al. (1994) e Soggin et al. (2002) porém inferior ao relatado por Alvarenga et al. (2001) que obtiveram o melhor resultado superovulatório demonstrado até hoje, utilizando o EPE em éguas, com a proposta em fazer as administrações duas vezes ao dia, obtendo neste experimento 7,1 ovulações e 3,5 embriões recuperados por égua.

Além disso, ocorreu a recuperação de dois ovócitos em uma égua do grupo III (eFSH) apesar de ser reconhecido o evento de retenção de estruturas não fertilizadas no oviduto das éguas (McKinnon & Voss, 1993). Este achado também foi relatado por Peres (2004) que recuperou seis estruturas não fertilizadas (ovócitos) em éguas tratadas com eFSH na fase de transição. De acordo com Vanderwall et al. (1993),

possivelmente, estes ovócitos foram carreados para o útero em virtude da PGE₂ produzida pelos outro(s) embrião(ões) presentes.

Portanto, quando comparado o FSH eqüino com o EPE em doses constantes e decrescentes foi possível observar uma maior eficiência do FSH perante os demais em relação ao número de embriões recuperados. A baixa recuperação embrionária nos tratamentos superovulatórios em éguas utilizando EPE é motivo de vários estudos, alguns fatores são citados como possíveis responsáveis por este baixo índice. Entre eles: baixa taxa de fertilização (Armstrong, 1993), anormalidades na maturação ovocitária (Moor et al., 1985), assincronia entre os eventos de maturação do ovócito e do folículo (Loos et al., 1991); ocorrência de luteinização ao invés de ovulação; ou ainda falha dos ovócitos para entrarem no oviduto (Dippert et al., 1994).

A hipótese da falha na captação do ovócito pelo oviduto foi também descrita por Lapin & Ginther (1977) que observaram que apenas 14 dos 24 corpos lúteos observados, mostraram traços na fossa da ovulação, ou seja, nem todos os folículos pré-ovulatórios alcançaram a fossa da ovulação. A incapacidade de alguns folículos pré-ovulatórios alcançarem a fossa da ovulação e o distúrbio da maturação dos ovócitos pode ser devido as grandes quantidades de LH contidas nas altas doses de EPE administradas durante a fase de crescimento folicular. O que vem de encontro com nossos achados onde a taxa de recuperação embrionária foi semelhante ao grupo controle quando do uso do FSH eqüino purificado.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, Liu et al. (1991) descreveram que a falha na captação dos ovócitos pela fímbria do infundíbulo pode ser em decorrência do líquido folicular apresentar uma consistência gelatinosa, o que pode reter o ovócito, impedindo-o de cair para o interior do infundíbulo ou mesmo bloqueando o lúmen do oviduto impedindo que o embrião migre do oviduto para o útero. Este relato foi semelhante ao descrito por Palmer et al. (1993) que acreditam que a baixa taxa na recuperação embrionária é conseqüência da não fertilização do ovócito, em função da falha do folículo em liberá-lo e também a produção do mesmo de baixa qualidade.

Outras hipóteses sobre as baixas taxas de recuperação de embriões merecem destaque, Alvarenga et al. (2001) descreveram que alguns dos folículos

podem ter luteinizado e não ovulado, afetando assim a taxa de recuperação de embriões. Por outro lado, Dippert et al. (1994), descreveram que 92,7% dos corpos lúteos formados, após um tratamento superovulatório, foram provenientes de ovulação e não de luteinização dos folículos.

Além disso, Alvarenga et al. (2001) relataram que um grande número de ovulações resultou em corpos lúteos funcionais, devido ao aumento nas concentrações de progesterona. E que o baixo índice de recuperação embrionária pode estar relacionado ao aumento das concentrações de Progesterona no momento periovulatório nos animais superovulados que pode interferir no transporte do espermatozóide e/ou ovócito.

Variações individuais na resposta superovulatória têm sido descritas na espécie bovina (ARMSTRONG, 1993), sendo que, 43% das vacas que respondem ao tratamento superovulatório, apresentam uma baixa taxa de embriões recuperados transferíveis ou nenhum embrião transferível (NOGUEIRA, 2001).

Observando a duração do primeiro ciclo estral que sucedeu o tratamento superovulatório, devemos destacar que a mesma foi semelhante ao grupo controle (23,9, 22,8, 22,6 e 21,4 dias para os grupos I, II, III e IV, respectivamente) demonstrando que a duração do ciclo estral pós-tratamento não sofreu interferência do tratamento superovulatório. Este fato foi também descrito por Carmo (2003) que identificou uma duração semelhante entre os dois ciclos com tratamento superovulatório e o ciclo que sucedeu o segundo tratamento (23,7, 21,5 e 24,1 dias, respectivamente).

Mais estudos são necessários para o aprimoramento da técnica e estudos com o uso de eFSH, o qual é um produto que se mostrou eficiente tanto em animais ciclando quanto em transição como descrito por Peres (2004). O eFSH pode ser um marco na superovulação, contribuindo para o avanço da técnica e otimização de Programas de Transferência de Embriões em eqüinos.

Conclusões

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, permite-nos concluir que:

- 1) As diferenças na dinâmica folicular entre animais superovulados e não superovulados se evidenciam a partir do 4º dia de tratamento, quando ocorre um aumento no número de folículos de 21-30mm e maiores de 30mm de diâmetro;
- 2) A taxa de crescimento folicular observada nos animais tratados com FSH eqüino purificado foi similar a dos animais não tratados, sendo assim, o que mais se aproximou das condições fisiológicas;
- 3) O mapeamento ovariano no segundo dia após o início do tratamento pode ser utilizado como rotina para estimar resposta superovulatória, pois foi observada correlação positiva entre o número de folículos de 16-20mm e o número de ovulações;
- 4) O FSH eqüino purificado apresentou tendência em ser superior aos demais grupos, quanto ao número de embriões recuperados por lavado;
- 5) O FSH eqüino purificado parece induzir uma melhor maturação folicular pois os animais tratados com eFSH apresentaram uma maior taxa de recuperação embrionária por ovulação, semelhante ao grupo controle;
- 6) Os embriões provenientes de éguas submetidas aos tratamentos superovulatórios mostraram-se visualmente normais;

- 7) A maioria das éguas manteve a atividade cíclica ovariana após a suspensão dos tratamentos superovulatórios com EPE em doses constantes, decrescentes e eFSH, indicando que os tratamentos superovulatórios não interferem nos ciclos subsequentes.

Referências
Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Journal Reproduction Fertility**, London, v.94, p.177 - 188, 1992.
- ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H.G. GnRH secretion in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.173-180, 1996.
- ALLEN, W.R. Embryo transfer in the horse. In: ADAMS, C.E. (Ed). **Mammalian egg transfer**. Boca Raton: CRC Press, p.135-54. 1982.
- 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., SQUIRES, E.L., NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulation in mares treated with EPE twice daily. **Arq.Fac.Vet. UFRGS**, v.27(suppl), p.197, 1999.
- ALVARENGA, M.A., MCCUE, P.M., SQUIRES, E.L., NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory. Response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-887, 2001.

- ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. **In: Fisiologia e manejo da reprodução eqüina.** 2^o ed, Recife, p. 57-63, 1986.
- ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7-24, 1993.
- BAILEY, V.E., DOUGLAS, R.H. Induction of ovulation in seasonally- anovulatory mares with GnRH. **American Society Animal Science Meeting. Abstr.** p.133, 1977.
- BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.99-108, 1985.
- 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.
- BÉZARD, J., GOUDET, G., DUCHAMP, G., PALMER, E. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Biology Reproduction**, v.1, p.261-71, 1995.
- 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.
- BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal Reproduction Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.

BURATINI JR. J. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando a ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de Progesterona e hormônio Luteinizante.** Botucatu, 1997. 66p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

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

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

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, n.3, p.252-4, 2002.

DAY, F.T. Clinical and experimental observations on reproduction in the mare. **J. Agric. Sci. Camb.**, v.30, p.244-61, 1940.

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

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

DIPPERT, K.D., HOFFERE, E., PALMER, E., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L. Initiation of superovulated 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, G.E.Jr, SQUIRES, E.L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41, p.1411-23, 1994.
- DONALDSON, L.E., WARD, D.N. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. **Vet. Rec.**, 119, p.625-626, 1986.
- DOUGLAS, R.H., NUTI, L., GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, v.2, p.133-42, 1974.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-79, 1991.
- DRIANCOURT, M.A., MARIANA, J.C., PALMER, E. Effect of stage of oestrous cycle on follicular population in pony mares. **Reprod. Nutr. Develop.**, v.22, p.803-812, 1982.
- DRIANCOURT, M.A., PALMER, E. Time of ovarian follicular recruitment in cyclic pony mares. **Theriogenology**, v.21, p.591-600, 1984.
- ELSDEN, R.D., SEIDEL, G.E.Jr. Procedures for Recovery, Bisection, Freezing and Transfer of bovine embryos. 6th ed., **Animal Reprod. and Biotechn.** Laboratory Bulletin, n^o 09, Fort Collins, CO: Colorado State University, p.6-7, 1995.
- ELVIN, J.A., YAN, C., MATZUK, M.M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Molec.Cell.Endoc.** v.159, p.1-5, 2000.
- 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.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology Reproduction**, v.50, p.225-32, 1994.

- FORTUNE, J.E., RVERA, G.M., EVANS, A.C.O, TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v 65, p.648–654, 2001.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.135-63, 2003.
- GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology Reproduction**, 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.
- GESTWIND, I.I., DEWEY, R, HUGHES, J.P., EVANS, J.W., STABENFELDT, G.H. Plasma LH levels in the mare during the oestrus cycle. **Journal Reproduction Fertility**, v.23 (Suppl.), p.207-212, 1975.
- GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare.** Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, 378 p., 1986.
- GINTHER, O.J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryos fixation in mares. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.82-88, 1987.
- GINTHER, O.J., PIERSON, R.A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Equine Vet. Sci.**, Wildomar, v.9, p.4-12, 1989.
- GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal Reproduction Fertility**, v.90, p.311-320, 1989.

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

GINTHER, O.J. Characteristics of the ovulatory season. In: Reproductive Biology of the Mare, 2 Ed. Cross Plains: **Equiservices**, p.173-232, 1992.

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., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079-1093, 1999.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.61-79, 2000a.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology Reproduction**, v.62, p.920-927, 2000b.

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

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

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

- GORDON, I. Recovering the primary oocyte. In: Gordon, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: Raven Press, 1994. p. 71-82.
- GOUDET, G., BELIN, F., BEZARD, J., GERARD, N. Maturation-promoting factor (MFP) and mitogen activated protein Kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Mol. Hum. Reproduction**, 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.229-36, 1983.
- HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. Functional anatomy of reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 7^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000. p.1-68.
- HOFFERER, S., DUCHAMP, G., PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **Journal Reproduction Fertility**, v.44 (suppl), p.341, 1991.
- HANSEL, W., CONVEY, E.M. Physiology of the oestrous cycle. **Journal Animal Science**, v.57 (Suppl. 2), p. 404-424, 1983.
- IRVINE, C.H.G. Endocrinology of the estrous cycle of the mare: applications to embryo transfer. **Theriogenology**, v.15, p.85-104, 1981.
- IRVINE, C.H.G., TURNER, J.E., ALEXADER, S.L., SHAND, N. Gonadotropin profiles and dioestrous pulsative release patterns in mares as determined by collection of jugular blood at 4h intervals throughout an oestrous cycle. **Journal Reproduction Fertility**, v.113, p. 315-322, 1998.
- JOHNSON A.L. Induction of ovulation in anestrus mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.983-6, 1986.

- JOHNSON A.L., BECKER, S.E. Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrus mare. **J. Equine Vet. Sci.**, v.8, p.130, 1988.
- KAFI, M., MCGOWAN, MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.137-157, 1997.
- KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares. In: **ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONER**, v.21, p.327-336, 1975.
- KENNEY, R.M., CONDON, W., GARJAN, V.K., CHANNING, C.P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresy. **Journal Reproduction Fertility**, v.27, p.163-171, 1979.
- 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.834-42, 1977.
- LIU, I.K.M., LANTS, K.C., SCHLAFKES, S., BOWERS, J.M., ENDERS, A.C. Clinical observations of oviductal masses in the mare. **Proc. Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract**, Lexington, p.41-45, 1991.
- LOOS, de F.A.M., BEVERS, M.M., DIELEMEN, S.J., KRUIP, T.A.M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 35, p. 537-545, 1991.
- LOSINNO, I., AGUILAR, J.J., LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. **Equine Embryo Transfer.**, v.3, p.81-3, 2000.
- MAPLETOFT, R.J., NASSER, L.F., BO, G.A., DEL CAMPO, M.R. The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single

subcutaneous injection in beef heifers. PROC. 12th Int. **Congr. Anim. Reprod., De Hague**, v.1, p. 237-239, 1992.

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.823-31, 1992.

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.144-6, 1992.

McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. USA: Williams & Wilkins, 1993. 1137p.

McNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUNDY, T., FIDLER, A.E., SMITH, P. Control of early ovarian follicular development. **Journal Reproduction Fertility**, v.54, p.3-16, 1999.

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

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

- 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.167-72, 1985.
- MOURA, J. C. A., MERKT, H. **A ultra-sonografia na reprodução equina**. 2 ed., Salvador: Universitária America, 1996, p.162.
- MURPHY, B.D., MAPLETOFT, R.J., MANNS, J., HUMPHREY, W.D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, v.21, p.117-125, 1984.
- NAGAMINE, N., NAMBO, Y., NAGATA, S., NAGAOKA, K., TSUNODA, N., TANIWAMA, H. Inhibin secretion in the mare: Localization of inhibin α , β A and β B subunits in the ovary. **Biology Reproduction**, v.59, p.1392-1398, 1998.
- NEELY D.P., KIU, I.K.M., HILLMAN R.B. Endocrinología Reproductiva y Fertilidad en La Yegua. **Reproduccion equina**, Buenos Aires, Hemisferio Sur, , p. 1 – 25, 1989.
- 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, n.1, p.37-9, 2004.
- NOGUEIRA M.F.G. **Superovulação associada à inseminação artificial com tempo pré determinado em vacas da raça Nelore**. 2001, p.67. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- 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.

- PALMER, E., DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic ecography in equine gynecologic. **Theriogenology**, v.21, p.471-83, 1980.
- PERES, K.R. **Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera.** Botucatu, 2004. Dissertação (Mestrado) -Reprodução Animal- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista .
- PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**. Los Altos, v. 55, p. 193-210, 2001.
- PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v.14, p.219-31, 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., MORRIS, B.A., O'SHEA, T., WEBB, R. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. **Journal Reproduction Fertility**, v.81, p.161-8, 1987.
- PRICE, C.A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology** , v.122, p.2222-2231, 1988.
- RIESENBERG, S., MEINECKE-TILLMAN, S., MEINECKE, B. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in german merino ewes. **Theriogenology**, v.55, p.847-865, 2001.
- ROSAS, C.A., ALBERIO, R.H., BARANÃO, J.L., AGUERO, A., CHAVES, M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, p. 1257-1264, 1998.

- SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal Reproduction Fertility**, London, v.83, p.663-671, 1988.
- SAVIO, J.D., THATCHER, W.W., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the estrous cycle in cows. **Journal Reproduction Fertility**, v.97, p.197-203, 1993.
- SCOGGIN, C.F., MEIRA, C., McCUE, P.M., CARNEVALE, E.M., NETT, T.M., SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v.58, p.151-64, 2002.
- 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.705-15, 2001.
- 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.
- SIROIS, J., BALL, B.A., FORTUNE J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycles and after hemiovariectomy in mares. **Equine Vet. J.**, v.8 (suppl.), p. 43-48, 1989.
- SQUIRES, E.L., GARCIA, R.H., GINTHER, O.J., VOSS, J.L., SEIDEL, G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone to superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, p.661-70, 1986.
- SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. Superovulation. In: SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. **Collection and transfer of equine embryos**. 8. Fort Collins: Colorado State University, 1995. p.32-8. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory.

SQUIRES, E.L., MCKINNON A.O., CARNEVALE, E.M., MORRIS, R., NETT, T.M. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulation mares and superovulated. **Journal Reproduction Fertility**, v.35, p.399-403, 1987.

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

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

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.24-7, 1993.

WEBB, R., CAMPBELL, B.K., GARVERICK, H.A., GONG, J.G., GUTIERREZ, C.G., ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal Reproduction Fertility**, suppl.54, p.33-48, 1999.

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

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

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