

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA OVARIANA E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS
DE FSH EM ÉGUAS CÍCLICAS, SUBMETIDAS À ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E TRATADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA
EQÜINA (EPE)**

CÁSSIA MARIA BARROSO ORLANDI

BOTUCATU – SP

Março 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA OVARIANA E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS
DE FSH EM ÉGUAS CÍCLICAS, SUBMETIDAS À ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E TRATADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA
EQÜINA (EPE)**

CÁSSIA MARIA BARROSO ORLANDI

Orientador: Prof. Adj. Cezinande de Meira

Tese apresentada junto ao programa de pós-
graduação em Medicina Veterinária como parte
dos requisitos para obtenção do título de doutor
em Reprodução Animal

Botucatu - SP
Março 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO- DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Orlandi, Cássia Maria Barroso.

Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas cíclicas, submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE) / Cássia Maria Barroso Orlandi. – Botucatu [s.n.], 2008.

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

Orientador: Cezinande de Meira

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução

CDD 636.20824

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

Cássia Maria Barroso Orlandi, 26 de Fevereiro de 2008

TÍTULO: RESPOSTA OVARIANA E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FSH EM ÉGUAS CÍCLICAS, SUBMETIDAS À ASPIRAÇÃO FOLICULAR E TRATADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Cezinande de Meira
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Doutor Sony Dimas Bicudo
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP-Botucatu

Prof. Adj. Marco Antônio Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira
Membro
Departamento de Apóio, Produção e Saúde Animal
FOA - UNESP- Araçatuba, SP

Prof. Adj. Júlio César Ferraz Jacob
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UFRRJ - Rio de Janeiro; RJ

DEDICATÓRIA

Tudo que move é sagrado e remove as montanhas com todo cuidado...

Sim, todo amor é sagrado, e o fruto do trabalho é mais que sagrado...

Beto Guedes/ Ronaldo Bastos (Amor de índio)

Dedico estes anos de estudo e aprendizado os quais levaram à elaboração deste trabalho, aos meus pais, Atílio Orlandi e Gracinda Barroso Orlandi que com muito amor sempre apoiaram as minhas escolhas durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma, fizeram parte deste trabalho.

Especialmente agradeço:

Ao Prof. Adj. Cezinande de Meira pela orientação, paciência e dedicação durante todas as atividades desenvolvidas no doutorado, contribuindo imensamente para minha formação profissional e para a realização deste estudo.

À Yvone, Janaína e Vinício de Meira pelo apoio e amizade, fazendo me sentir muito acolhida durante nossa convivência.

A família Cassiano por ter me recebido com muito carinho em Botucatu.

Aos colegas e amigos Ian Martin, Cely Marini, Eder Nunes Ferreira, Antônio de Medeiros, Daniela Montechiesi, Fernanda Saules, Gustavo Araújo, Carla Moia e Eduardo Cassiano por estarem sempre dispostos a trabalhar ao meu lado, enfrentando os desafios e colaborando ativamente para a realização deste experimento.

A todos os funcionários, residentes e estagiários deste departamento pela atenção e apoio.

Aos funcionários Miguel Alves e Benedito Fogaça pela dedicação, responsabilidade e carinho com as éguas utilizadas neste estudo e por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável, que deixará muita saudade.

A todos os professores deste departamento pela colaboração facilitando-nos o uso de equipamentos necessários à realização deste estudo, em especial as professoras Eonice Oba, Fernanda Alvarenga e professor Frederico Ozanan Papa.

Ao professor Marco Antônio Alvarenga e ao colega Márcio Teoro do Carmo pelo processamento do extrato de pituitária eqüina.

Ao professor Nicolau Puoli Filho pelo apoio durante a manutenção das éguas na fazenda Edgárdia e aos Profs. Armen Thomassian e Carlos Alberto Hussni, por algumas éguas cedidas ao experimento.

Ao professor Guilherme de Paula Nogueira pelos ensaios hormonais de FSH e a técnica Devani Mariano Pinheiro pelo trabalho, dedicação e companheirismo.

Ao pesquisador Donald Rick Bergfelt pela orientação durante a preparação dos dados e colaboração para a realização deste estudo.

Ao pesquisador Mohamed Amim Beg pelas mensurações do FSH e LH contidos no EPE.

Ao professor Francisco Wechsler e ao colega Gustavo Henrique Araujo pelas análises estatísticas.

À Fapesp e Capes pelo suporte financeiro do projeto e do doutorado.

À empresa Nutricell por nos ceder a probe de aspiração folicular; Calier e Shering pela doação de produtos.

Às amigas Leonor, Cláudia Rodrigues, Fabiana Araújo, Rose dos Santos Fabíola Lopes, Carmen Izilda e Maria Angélica Zysmanski por estarem sempre presentes compartilhando momentos alegres e difíceis desta jornada.

Aos meus pais pela colaboração e incentivo durante este trabalho.

SUMÁRIO	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
1.INTRODUÇÃO	15
2.REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. <i>Dinâmica folicular</i>	16
2.1.1. <i>Divergência e dominância folicular</i>	17
2.2. <i>Resposta ovariana aos tratamentos superovulatórios em éguas cíclicas</i>	22
2.3. <i>Aspiração folicular e controle do ciclo estral</i>	26
3. HIPÓTESE	28
4. OBJETIVOS	28
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1. <i>Animais</i>	29
5.2. <i>Aspiração Folicular</i>	29
5.3. <i>Tratamento</i>	30
5.4. <i>Colheita de sangue e ensaio hormonal</i>	32
5.5. <i>Acompanhamento do desenvolvimento folicular</i>	32
5.6. <i>Preparação do extrato de pituitária eqüina (EPE)</i>	33
5.7. <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	33
6. RESULTADOS	35
7. DISCUSSÃO	50
8.CONCLUSÕES	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Valores máximos, mínimos, médios basais (Média±EPM) e flutuações das concentrações de FSH (ng/mL) a partir da aspiração folicular até o início do tratamento com EPE ou Salina em éguas cíclicas	41
Tabela 2: Valores máximos, mínimos, médios basais (Média±EPM) e flutuações das concentrações de FSH (ng/mL) a partir do tratamento com EPE ou salina até a detecção das ovulações em éguas cíclicas	42
Tabela 3: Diâmetro atingido pelo maior folículo (Média±EPM) imediatamente antes do início do tratamento com EPE ou salina e diâmetro máximo atingido pelos cinco maiores folículos (F1,F2,F3,F4 e F5) antes da detecção das ovulações.	47
Tabela 4: Resposta ovariana e recuperação embrionária em éguas cíclicas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE) ou salina, precedida da aspiração folicular (Média±EPM).	48
Tabela 5: Intervalos durante o período da aspiração folicular à indução das ovulações e número de administrações de EPE ou salina (Média ± EPM) em éguas cíclicas.	49

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Protocolo experimental das éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE). EPE-13, EPE-20, EPE-23 e EPE-26, iniciando-se o tratamento quando o maior folículo atingiu diâmetro ≥ 13 , 20, 23 e 26mm, respectivamente. 31
- Figura 2:** Protocolo experimental das éguas tratadas com solução salina 0,9% (Grupo-Controle) Sal-13, iniciando-se o tratamento quando o maior folículo atingiu diâmetro ≥ 13 mm. 31
- Figura 3:** Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg duas vezes ao dia) ou salina, iniciado na presença de folículos ≥ 13 mm e em éguas controle. Média $\pm$ EPM. 43
- Figura 4:** Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg duas vezes ao dia) ou salina, iniciado na presença de folículos ≥ 20 mm e em éguas controle. Média $\pm$ EPM. 44
- Figura 5:** Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg duas vezes ao dia) ou salina, iniciado na presença de folículos ≥ 23 mm e em éguas controle. Média $\pm$ EPM. 45
- Figura 6:** Concentrações plasmáticas de FSH e perfis de desenvolvimento folicular em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE iniciado na presença de folículos ≥ 26 mm e em éguas controle. 46

ORLANDI, C. M.B. **Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas cíclicas, submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE)**. Botucatu, 2008 Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Campus de Botucatu.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo determinar as concentrações plasmáticas de FSH e caracterizar o desenvolvimento folicular e recuperação embrionária em éguas superovuladas com EPE, iniciando-se o tratamento antes do desvio, no momento esperado do desvio e após o estabelecimento da dominância em onda folicular induzida por aspiração folicular. No décimo dia após a ovulação, as éguas foram submetidas à aspiração de todos os folículos $\geq 8\text{mm}$ por meio de ultra-sonografia transvaginal e foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos tratados e um controle. Cinquenta e oito ciclos de trinta éguas foram tratados sucessivamente com intervalo de um ciclo não tratado, iniciando-se as administrações de EPE (12,5mg i.m a cada 12 horas) de acordo com o diâmetro atingido pelo maior folículo da onda induzida: $\geq 13\text{mm}$ (EPE-13, n=12), $\geq 20\text{mm}$ (EPE-20, n=11), $\geq 23\text{mm}$ (EPE-23, n=12) e $\geq 26\text{mm}$ (EPE-26, n=10). No grupo controle (Sal-13, n=13) iniciou-se tratamento com salina na presença do maior folículo medindo $\geq 13\text{mm}$ de diâmetro. Após 12 horas do início dos tratamentos com EPE ou salina, todas as éguas receberam dose única de 7,5mg de PGF₂ α Dinoprost-tromethamine (Lutalyse®Pfizer). Quando a maioria dos folículos atingiu 32mm de diâmetro, os tratamentos foram interrompidos e ao atingirem 35mm de diâmetro as ovulações foram induzidas com 2.500 UI de hCG i.v. (Vetecort® Calier). As éguas foram inseminadas dentro de 12 horas, repetindo-se a cada 24 horas até a detecção das ovulações, sendo submetidas à colheita de embriões oito dias pós ovulação. Os dados referentes à resposta ovariana e o FSH foram analisados pelo Proc mixed do SAS, e características do perfil desta gonadotrofina submetidas ao teste t não pareado. As concentrações médias de FSH foram superiores no EPE-13 e EPE-20 com relação ao controle, considerando todo período experimental. A partir da aspiração até o início dos tratamentos, as concentrações de FSH foram

caracterizadas por valores máximo, mínimo e médio basal, similares aos do controle, com exceção dos valores máximo e mínimo do EPE-13 e EPE-26, os quais foram superiores aos do controle. Após o início do tratamento até a ovulação, estes valores foram superiores para os animais tratados com relação aos do controle. A administração de EPE iniciada antes, durante ou após o desvio folicular esperado em onda induzida pela aspiração foi capaz de elevar e manter a concentração de FSH durante o tratamento; aumentar o número de folículos $\geq 30\text{mm}$ e ovulações quando iniciado na presença de folículos com diâmetro médio entre 20 e 23mm em relação ao controle. Embora não tenha influenciado significativamente na taxa de recuperação embrionária, o início do tratamento a partir da detecção de folículos de 20mm resultou no dobro de embriões por colheita quando comparado ao controle, demonstrando numericamente o benefício deste tratamento. Quando se inicia a superovulação com folículos de 20 a 23 mm de diâmetro em onda induzida reduz-se o tempo de tratamento e conseqüentemente o número de administrações do hormônio com resposta ovariana satisfatória.

Palavras chave: égua, dinâmica folicular, superovulação, FSH, extrato de pituitária eqüina

ORLANDI, C.M.B. **Ovarian response and FSH plasma concentrations in cyclic mares submitted to follicle ablation preceding equine pituitary extract (EPE) administration.** Botucatu, 2008 Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

The present study aimed to determine FSH plasma concentrations and characterize follicle development and embryo recovery in cyclic mares superovulated with EPE starting treatment preceding deviation, at deviation and after follicle dominance; during a previously induced follicular wave by trans-vaginal follicle ablation. All follicles $\geq 8\text{mm}$ were ablated ten days (D10) post-ovulation in fifty eight cycles from thirty mares, which were randomly assigned to four treated and one control group. Treatment with EPE (12.5mg IM, every 12 hours) was started when the largest follicle from an induced follicular wave reached $\geq 13\text{mm}$ (EPE-13, $n=12$), $\geq 20\text{mm}$ (EPE-20, $n=11$), $\geq 23\text{mm}$ (EPE-23, $n=12$) and $\geq 26\text{mm}$ (EPE-26, $n=10$). Mares from control group received saline solution when the largest follicle reached $\geq 13\text{mm}$. After 12 hours from beginning of treatment (EPE or saline) all mares received a single dose of $\text{PGF}_2\alpha$;7.5mg Dinoprost- trometamine (Lutalyse[®] Pfizer). Treatments were discontinued when the majority of follicles reached 32mm and ovulations induced upon detection of follicles measuring $\geq 35\text{mm}$ with 2.500 UI of hCG (Vetecort[®] Calier). The mares were inseminated within 12 hours, and every 24 hours until ovulations had been detected and they were submitted to embryo recovery eight days after first ovulation. Ovarian response data and FSH concentrations were analyzed by Proc mixed do SAS, and variables characterizing FSH pattern were submitted to non- paired t test. Overall mean FSH concentrations during all experimental period were significantly higher for mares in EPE-13 and EPE-20 groups when compared to control. Maximum, minimum and medium basal values from FSH concentrations were similar between EPE- treated mares and control from ablation to start of treatment, except for maximum and minimum values from EPE-13 and EPE-26 respectively, when compared to control. Those FSH values were significantly increased from start of treatment to ovulation in treated

mares compared to control. Treatment with EPE starting before, at and immediately after follicle deviation from an induced follicular wave by ablation was able to increase and maintain FSH concentrations during treatment, resulting in higher numbers of follicles ≥ 30 mm and ovulations when started upon detection of follicles between 20 and 23mm compared to control. Although treatment did not result in significantly higher embryo recovery rates, starting treatment upon detection of 20mm follicles doubled the number of embryos per flushing when compared to control. When treatment began in the presence of follicles measuring between 20 and 23mm, number of EPE administrations and time of treatment were reduced resulting in satisfactory ovarian response.

Key words: mare, superovulation, FSH, follicle - dynamics, equine pituitary extract.

1. INTRODUÇÃO

Na maioria dos programas de transferência de embriões em eqüino, o índice de recuperação embrionária está em torno de 65%, obtendo-se, portanto menos que um embrião por doadora por colheita. Este fato contribui para o aproveitamento inadequado das éguas receptoras, elevando-se os custos relacionados à manutenção e sincronização de ovulação entre receptoras e doadoras (Meira & Henry, 1991; Squires et al., 1999; Peres et al., 2004; Carmo et al., 2002). No entanto, tal custo pode ser minimizado pela obtenção de maior número de embriões por colheita.

Os tratamentos superovulatórios têm por objetivo aumentar o número de folículos destinados à ovulação e a recuperação embrionária por doadora. Maior número de folículos pré-ovulatórios podem ser puncionados visando ampliar a porcentagem de obtenção de oócitos por doadora para serem utilizados nas técnicas de reprodução assistida. Tanto embriões quanto oócitos são imprescindíveis nos estudos envolvendo técnicas de congelamento ou vitrificação, permitindo assim a preservação do material genético para uso posterior (Maclellan et al., 2002). Os agentes indutores da superovulação podem ser utilizados durante os períodos transicionais para estimular e antecipar a atividade ovariana, o que contribui para o melhor aproveitamento dos ciclos estrais, especialmente no início da estação reprodutiva (Coy et al., 1999; Niswender et al., 2004).

A fase de desenvolvimento em que se encontram os folículos ao início do tratamento e sua influência na resposta ovulatória foi até o momento abordada de maneira retrospectiva (Dippert et al., 1992; Squires et al., 2006). Apesar disso, os autores valorizam sua importância sobre a resposta ovariana nos processos superovulatórios (Pierson & Ginther., 1990, Logan et al., 2007; McCue et al, 2006).

Os estudos envolvendo a dinâmica do desenvolvimento folicular e o perfil endócrino, levam ao conhecimento de alguns fatores que podem influenciar na resposta ovariana, favorecendo o estabelecimento de tratamentos que permitam resultados consistentes, atendendo assim, as necessidades dos programas de transferência de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Dinâmica Folicular*

A égua se caracteriza por ser monovulatória, sofrendo influência da estação do ano, com ciclos estrais regulares no período de dias longos. No início do ciclo estral ocorre recrutamento de um grupo de folículos antrais pelo estímulo do FSH, sendo definido como emergência de uma onda folicular, inicialmente os folículos apresentam crescimento simultâneo seguido de um intenso processo de atresia (Fortune, 1994). Tal característica permite a ocorrência de apenas uma ovulação, eventualmente duas ou mais são observadas.

A ocorrência de uma (70%) ou duas (30%) ondas foliculares é observada na égua dentro de um intervalo interovulatório e são classificadas como ondas maiores ou menores, as ondas maiores se caracterizam por apresentarem folículos dominantes e são divididas em primárias e secundárias, nas ondas menores não se observa dominância folicular. A onda maior secundária emerge no final do cio ou início do diestro, caracterizando-se pela regressão do folículo dominante durante o diestro. A onda maior primária emerge ao redor da metade do diestro, o folículo dominante se desenvolve rapidamente culminando em ovulação durante o cio (Ginther, 1990, 1993; Buratini et al., 1997).

A emergência da onda folicular se caracteriza pelo surgimento de um grupo de folículos com diâmetros entre 6 e 10 mm em concomitância ao aumento das concentrações de FSH (Bergfelt & Ginther, 1993).

No momento em que o maior folículo da onda atinge diâmetro ≥ 13 mm, as concentrações de FSH iniciam sua diminuição (Gastal et al., 1997). Este processo parece ser dinâmico não ocorrendo sincronicamente, como observado por Gastal et al (2004), que acompanharam a emergência dos quatro maiores folículos da onda induzida por ablação no dia 10 (D10) pós-ovulação, seguindo-os até o momento esperado do desvio (maior folículo ≥ 20 mm). A emergência de folículos de 6 à 7 mm ocorreu em média entre os dias 1,3 e 3,1 pós ablação, com o quarto folículo de 6 mm surgindo no momento em que o primeiro apresentava 11 mm de diâmetro.

A diminuição de FSH observada com a presença do pool de folículos medindo aproximadamente 13mm durante a fase de crescimento simultâneo, se deve à produção de inibina por tais folículos. O FSH permanece baixo até a ovulação, sendo esta contínua diminuição atribuída especialmente ao folículo dominante (Ginther et al., 2002; Donadeu & Ginther, 2003).

Com o final da fase de crescimento simultâneo ocorre a divergência folicular no momento em que o maior folículo da onda apresenta 22 a 23 mm de diâmetro, desenvolve crescimento rápido e contínuo e exerce dominância com relação ao segundo maior e demais folículos, os quais entram em atresia tornando-se subordinados (Gastal et al., 1997, 1999a). Tais folículos destinados à regressão após a divergência são capazes de retomar seu desenvolvimento chegando à ovulação uma vez removido o folículo dominante (Gastal et al, 1999b; Ginther et al 2002, Gastal et al, 2004)

2.1.1. Divergência e Dominância Folicular

Buscando estudar alguns aspectos fundamentais da dinâmica folicular, Gastal et al (1997) desenvolveram um modelo experimental simplificado (denominado “modelo de dois folículos”) utilizando a ablação folicular, de maneira que apenas os dois maiores folículos da onda fossem mantidos em desenvolvimento mediante sucessivas aspirações dos demais. A técnica mostrou-se eficiente quanto à precisão na detecção da emergência da nova onda folicular, uma vez que os folículos em regressão da onda anterior dificultariam a identificação dos folículos em emergência.

No estudo citado acima, a remoção dos folículos ≥ 8 mm reduziu em aproximadamente 50% a população folicular da nova onda entre os dias 11 e 16 em comparação ao controle, sendo a taxa de crescimento folicular da emergência até o desvio, similar entre os dois maiores folículos.

Os autores detectaram a emergência do folículo dominante aproximadamente um dia antes da emergência do maior folículo subordinado, sendo o diâmetro médio do maior e segundo maior folículos no momento esperado do desvio, 23 e 20mm, respectivamente. A partir de então, maior diferença na taxa de crescimento de ambos os folículos foi detectada.

As relações temporais entre FSH, LH e desenvolvimento folicular foram representadas no estudo citado, pelo aumento do FSH com a detecção da emergência do futuro folículo dominante, atingindo concentrações máximas três dias mais tarde quando o maior folículo atingiu 13 mm de diâmetro, diminuindo a partir de então até atingir valores basais (0 a 2 ng/mL) próximo ao momento esperado do desvio. Nesta fase, 79% das éguas apresentaram aparente aumento transitório nas concentrações de LH ou se mantiveram estáveis para em seguida aumentar anteriormente a ovulação, as demais (21%) apresentaram aumento progressivo durante 6 a 8 dias antes da ovulação sem a detecção de elevação transitória.

Da emergência da onda até a elevação máxima de FSH, as concentrações de progesterona encontraram-se em diminuição, observando-se neste período associação entre as flutuações de FSH e LH, as quais tornaram-se dissociadas após a detecção do valor máximo de FSH, mantendo-se até a ovulação. Perfis semelhantes foram detectados em estudos anteriores e caracterizados por maior sincronia entre as flutuações de FSH e LH durante a fase luteal, seguida pela dissociação durante a fase folicular (Irvine et al., 1998; Thompson et al., 1987; Bergfelt & Ginther, 1993).

O mecanismo através do qual o desvio se estabelece, bem como os aspectos hormonais envolvendo FSH, LH e estradiol foram estudados por Gastal et al (1999b) que utilizaram o modelo de dois folículos com a ablação do maior ou do menor. Removendo-se o maior folículo, o menor se desenvolveu chegando à ovulação ou entrou em atresia. No dia da aspiração do maior folículo (momento esperado do desvio) a diferença entre ambos foi maior ($5,9 \pm 1,2$ mm) nas éguas onde o menor folículo entrou em atresia do que nas éguas onde este se desenvolveu normalmente chegando à ovulação ($2,2 \pm 0,6$ mm). Estes achados indicam que a diferença em diâmetro, entre os dois folículos no momento da ablação influenciou na retomada do crescimento pelo segundo maior folículo, o qual chegou à ovulação em 67% das éguas. O desenvolvimento do menor folículo retido chegando à ovulação foi acompanhado pela diminuição nas concentrações de FSH, enquanto a atresia destes foi caracterizada por aumento nas concentrações de FSH, demonstrando a ineficiência dos folículos em regressão na supressão desta gonadotrofina. Em ambas as situações resultantes da remoção do maior

folículo, as concentrações de LH aumentaram confirmando o papel desta gonadotrofina na fase pós-desvio, embora nem todos os folículos menores retidos mostraram-se responsivos e ovularam, provavelmente por apresentarem maior diferença de diâmetro com relação ao maior folículo no momento da aspiração, o qual já se mostrava compatível ao estabelecimento da divergência.

A diferença de diâmetro entre os dois maiores folículos é fundamental para o destino do menor folículo retido como demonstrado através do acompanhamento dos quatro maiores folículos de uma onda induzida por ablação no D10 pós-ovulação. Com a remoção do maior folículo no momento esperado do desvio, o segundo maior mostrou-se capaz de retomar o crescimento e tornar-se dominante, sendo desta forma até o quarto maior folículo capaz de ser selecionado após sucessivas ablações do maior folículo (Ginther et al, 2004b), indicando a supressão do dominante sobre o subordinado e a retomada de crescimento pelo subordinado com remoção do futuro folículo dominante.

Na fase pós-desvio, o futuro folículo dominante passa a não mais depender do FSH e sim do LH para seu desenvolvimento, maturação e ovulação (Ginther et al, 1996). O LH parece estar mais envolvido no desenvolvimento do folículo dominante pós-desvio do que diretamente na iniciação do desvio, como demonstrado por Gastal et al (2000) que utilizaram a ablação de todos os folículos $\geq 5\text{mm}$ no D10, associada à redução ou prolongamento da fase progesterônica. Os autores demonstram que a manipulação da fase progesterônica não alterou inicialmente as concentrações sistêmicas de FSH, caracterizadas pelo primeiro aumento pós-ablação ao redor do D13. Embora apenas no grupo tratado com progesterona exógena, observou-se um segundo aumento no FSH ao redor do D22 em concomitância à emergência de uma nova onda folicular em 64% das éguas, indicando que o folículo dominante em desenvolvimento presente nos demais grupos (controle não tratado e $\text{PGF}_{2\alpha}$ pós-ablação) foi capaz de suprimir o FSH e o possível desenvolvimento de uma nova onda. Os autores sugerem que a baixa exposição ao LH no grupo tratado com progesterona não só influenciou o diâmetro médio atingido pelo maior folículo ($32,3 \pm 1,7$) como também afetou a sua eficiência em prevenir o desenvolvimento de uma nova onda e o aumento

no FSH. Quanto às concentrações de LH, o estudo detectou aumento precoce desta gonadotrofina com redução da fase progesterônica e diminuição com o prolongamento desta fase, embora tais mudanças não tenham influenciado o perfil de crescimento do segundo maior folículo, indicando que o LH não estaria envolvido definitivamente com o início do desvio, mas sim com o desenvolvimento do folículo dominante. No entanto, o aumento de LH precedendo o desvio exerce efeito positivo na produção de inibina e estrógeno pelo maior folículo no momento do desvio (Bergfelt et al., 2001).

No estudo de Bergfelt et al (2001), a progesterona exógena foi administrada durante 14 dias após a ablação de todos os folículos ≥ 6 mm no D10 seguida de aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que levou a redução da concentração de LH durante a fase de desvio folicular e atraso no aumento das concentrações de inibina e estradiol. No entanto não afetou as concentrações de FSH ou o momento do desvio. A redução das concentrações de LH no grupo tratado com progesterona ocasionou a regressão do maior folículo em associação à diminuição nas concentrações de inibina e estradiol e aumento nas concentrações de FSH. Estes achados indicam que o aumento do LH é necessário ao desenvolvimento do futuro folículo dominante para que este secrete estradiol, que por sua vez contribui para a supressão de FSH e facilita o crescimento do dominante mediante as mudanças de dependência primariamente pelo FSH para o LH.

O papel do estradiol no mecanismo do desvio foi também estudado através do modelo de “dois-folículos”, detectando-se aumento nas concentrações sistêmicas e intra-foliculares no momento esperado do desvio (Gastal et al, 1999a). Neste estudo, as diferenças quanto ao estradiol intra-folicular, entre o maior e o menor folículo, aumentaram progressivamente ao decorrer das amostragens obtidas quando os maiores folículos atingiram 15 mm, 20 mm e 25 mm, sendo maior a diferença entre os dois folículos, quando da obtenção de fluido no momento esperado do desvio (20 mm) se comparado à amostragem aos 15 mm. Estes achados indicam que as diferenças quanto às concentrações intra-foliculares de estradiol entre o maior e menor folículo, precedem as mudanças com relação aos diâmetros dos dois folículos.

Gastal, et al (1999b) atribuíram o aumento nas concentrações de estradiol unicamente ao maior folículo, uma vez que estas aumentaram

imediatamente após a remoção do menor folículo utilizando-se o mesmo modelo descrito anteriormente, não sofrendo alteração imediata quando da remoção do maior e retenção do menor folículo.

A contínua diminuição de FSH com o início do desvio reflete o efeito sinérgico do aumento nas concentrações de estradiol e das altas concentrações de inibina (Bergfelt et al, 2000). A supressão da inibina sobre as concentrações de FSH foi inicialmente demonstrada pela imunização passiva contra a inibina resultando no aumento das concentrações de FSH, número de folículos pré-ovulatórios e ovulações (McCue et al., 1992; McKinnon et al., 1992; Nambo et al., 1998; Briant et al., 2000).

Indiretamente, esta atividade supressora foi também detectada pelo aumento nas concentrações de FSH pós-ablação (Gastal et al., 1997, Duchamp et al., 1995; Bergfelt & Adams, 2000); sendo ainda maior quando presente no fluido de folículos em desenvolvimento do que nos folículos atresícos (Channing et al., 1981), assim como quando presente nos folículos pré-ovulatórios do que nos folículos da fase final do diestro e início do estro (Bergfelt & Ginther, 1985).

Embora a inibina seja detectada nos folículos menores que 13mm, seu concomitante aumento ao FSH indica que a forma de inibina presente em tais folículos não exerce atividade supressora (Donadeu & Ginther, 2001). A diminuição das concentrações de FSH a partir da presença de folículos com 13 mm de diâmetro é atribuída à produção de inibina-A por tais folículos. A magnitude desta diminuição mostra-se proporcional ao número de folículos ≥ 13 mm, os quais estão presentes a partir do início da queda desta gonadotrofina.

Este perfil é mantido até a fase final do crescimento simultâneo, onde mediante níveis basais de FSH, apenas o maior folículo é capaz de continuar seu desenvolvimento (Donadeu & Ginther, 2001). A partir de então o folículo dominante passa a ser o único responsável pela contínua diminuição deste hormônio através da ação sinérgica da inibina e do estradiol.

O desenvolvimento do folículo dominante é estimulado pelo LH e por fatores de crescimento intrafoliculares presentes desde a seleção do futuro dominante (Gerard & Monget, 1998; Donadeu & Ginther, 2002), bem como pela ação de proteases (Bridges et al., 2002; Gerard et al., 2004; Spicer et al., 2005)

envolvidas com a esteroidogênese intra-folicular responsável pelo processo final de maturação levando à ovulação.

As concentrações de estradiol e inibina foram determinadas em éguas superovuladas utilizando-se eFSH ou EPE, sendo estas concentrações superiores ao controle não estimulado e proporcionais ao número de folículos presentes na resposta ovariana aos tratamentos, demonstrando a competência destes folículos na produção de tais hormônios (Machado et al., 2005).

2.2 Resposta ovariana aos tratamentos superovulatórios em éguas cíclicas

A resposta ovariana aos tratamentos superovulatórios na espécie eqüina sofre influência de diversos fatores, os quais têm sido abordados visando o aumento das taxas ovulatórias sem diminuição da recuperação embrionária por ovulação. Os agentes utilizados na superovulação são foco de inúmeros estudos demonstrando a baixa eficiência de certas gonadotrofinas como a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) utilizada na própria espécie (Allen, 1982), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Squires et al., 1989), FSH suíno (FSHp) (Squires et al., 1986; Fortune & Kimmich, 1993) e FSH recombinante humano (rhFSH) (Tharasanit et al., 2006).

O extrato de pituitária eqüina (EPE) e o FSH purificado eqüino [(eFSH) Bioniche Animal Health, Bogart, GA] tem se mostrado satisfatórios na superovulação em éguas, tendo como base o FSH de origem eqüina, embora com concentrações variadas de LH (Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002; Carmo, 2003; Niswender et al., 2003; Briant et al., 2004). O número médio de ovulação para os tratamentos utilizando EPE ou eFSH foram respectivamente de 3,2 e 3,1 com 1,96 e 1,5 embriões recuperados por colheita (Squires & McCue PM, 2007). Embora uma grande variabilidade tanto em número de ovulações quanto embriões recuperados tem sido observada entre os autores, limitando a consistência dos resultados (Alvarenga et al., 2001; Squires et al., 2005; Raz et al., 2006; McCue et al., 2006).

O momento de início do tratamento relacionado à fase do ciclo estral tem demonstrado que melhores respostas podem ser obtidas quando o tratamento se inicia entre o dia 5 e 7 após ovulação (Woods & Ginther, 1983; Dippert et al., 1992, Scoggin et al., 2002). Tal resposta foi atribuída ao início do tratamento

antes do estabelecimento da divergência folicular, evitando-se a influência do folículo dominante sobre o desenvolvimento daqueles destinados a regressão (Dippert et al., 1992).

Pierson & Ginther (1990) utilizaram estrógeno e progesterona durante 10 dias precedendo o tratamento com EPE, o qual teve início quando o maior folículo observado após o término do regime com esteróides atingiu 15, 20, 25 ou 30mm nos respectivos grupos. Os autores obtiveram maior número de folículos pré-ovulatórios quando o tratamento iniciou-se a partir da presença de folículos medindo 15 ou 20mm. Ao iniciarem o tratamento aos 25mm, o diâmetro do segundo maior folículo e número médio de folículos entre 21 e 25 mm foram similares ao encontrado nos grupos EPE-15mm e 20mm, embora o número médio de folículos na categoria 26 à 30mm não tenha diferido do grupo EPE-30mm, sendo o número de folículos >30mm intermediário entre os resultados observados nos demais grupos tratados.

Os autores concluíram que o processo de seleção foi parcial ou completamente estabelecido em apenas algumas éguas do EPE-25, sugerindo que a seleção fisiológica se estabeleceu imediatamente após o maior folículo atingir 25mm e antes que este atingisse 30mm, ou seja, entre 8 a 11 dias após o término do regime com esteróides, ou entre 4 a 2 dias antes do maior folículo atingir 35mm.

Vale salientar que tais observações foram detectadas antes que o momento esperado do desvio fosse caracterizado na espécie eqüina, embora tenha demonstrado resposta inconsistente ou fraca à estimulação ovariana, quando o tratamento foi iniciado com a presença de folículos de 25 mm ou 30 mm de diâmetro, respectivamente.

A resposta ovariana na espécie bovina é otimizada quando o tratamento superovulatório se inicia concomitantemente ao aumento nas concentrações endógenas de FSH antes ou durante a emergência da onda folicular, precedendo a seleção do folículo dominante (Bo et al., 1995; Mapletoft et al., 2002). Com base nestas observações, McCue et al (2006) iniciaram tratamento com eFSH seguido por $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao redor de $8,9 \pm 2,9$ dias pós ovulação (variação de 5-13 dias) precedendo a seleção do folículo dominante e mantiveram por um período fixo de três dias, sendo então interrompido e a indução das ovulações foi realizada quando da detecção de folículos >35mm.

Menor taxa de ovulação ($3,8 \pm 2,6$) e recuperação embrionária por lavado foi obtida quando comparado ao protocolo padrão (taxa de ovulação: $5,4 \pm 2,2$), embora superior ao controle não tratado. O tempo fixo pré-determinado sem levar em consideração o número e diâmetro dos folículos no momento da parada do tratamento pode ter influenciado negativamente a taxa de ovulação. Embora a importância da divergência e seleção do futuro dominante venha sendo considerada no estabelecimento de protocolos superovulatórios em bovinos e eqüinos, a possibilidade de se resgatar folículos destinados a regressão parece ocorrer eventualmente, mesmo iniciando-se o tratamento na presença de folículos em torno de 25 mm em éguas (Squires et al., 2006). Ao analisar dados retrospectivos quanto à população folicular presente no ovário ao início do tratamento, os autores não encontraram influência da presença de folículo ao redor de 25mm de diâmetro em relação ao número de folículos pré-ovulatórios, ovulações ou embriões obtidos por lavado em éguas tratadas com eFSH.

De maneira geral os tratamentos padrões com FSH de origem eqüina consistem na utilização de 12,5mg a cada 12 horas, iniciando-se o tratamento no dia 5 a 7 pós ovulação, com o uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no mesmo dia ou dois dias após o início do tratamento continuando-se a administração de gonadotrofina até que a maioria dos folículos atinja diâmetro $\geq 35\text{mm}$, seguido por indução da ovulação utilizando-se hCG (Scoggin et al., 2002; Niswender et al., 2003; Squires et al., 2006; Logan et al., 2007).

McCue et al (2006) utilizaram eFSH (12,5mg, uma vez ao dia) em éguas durante três ciclos estrais consecutivos ou alternados e não observaram diferenças entre a taxa de ovulação e recuperação embrionária por colheita, embora o número de administrações necessárias tenha duplicado quando os tratamentos foram consecutivos comparados aos alternados.

O uso de extrato de pituitária em doses mais baixas têm se mostrado uma alternativa para a obtenção de ovulações duplas e eventualmente múltiplas, proporcionando aumento na taxa de recuperação embrionária por lavado (Farinasso et al., 2005). O uso de EPE ou eFSH nas doses de 4 ou 5mg, respectivamente, uma vez ao dia, aumentou o número médio de ovulações com recuperação de um embrião em média por lavado (Rocha Filho

et al., 2005). Embora o percentual de éguas com mais de uma ovulação tenha sido similar entre os tratamentos (36,4% para EPE e 50% para o eFSH), a taxa de recuperação embrionária em função do número de ovulações mostrou-se superior para o tratamento com EPE (87,5%) quando comparado ao eFSH (60,8%), não havendo diferença entre o percentual de embriões recuperados por lavado (127,3% e 100%, para o EPE e eFSH , respectivamente).

Levando se em consideração a diferença de diâmetro entre os folículos ao início dos tratamentos, o uso de progesterona e estradiol 17β precedendo o tratamento superovulatório foi testado com o objetivo de se obter uma população folicular mais homogênea ao início do tratamento e conseqüentemente uma resposta ovariana mais consistente. No entanto, o pré-tratamento com esteróides na metade do diestro ou no início do estro não mostrou aumentar as taxas de ovulações (Logan et al., 2007; Raz et al., 2005).

Visando melhoria da resposta ovariana, evitando a hiperestimulação e buscando redução no tempo de tratamento com eFSH, Welch et al (2006) interromperam a aplicação de eFSH quando a maioria dos folículos atingiu diâmetro ≥ 32 mm, seguido da indução da ovulação no momento que a maioria dos folículos alcançou diâmetro ≥ 35 mm e obtiveram maior número de folículos ≥ 35 mm quando comparado à administração do hCG imediatamente após a parada do tratamento com folículos ≥ 35 mm ($4,1 \pm 0,3$ vs $3,0 \pm 0,3$), porém o número de ovulações foi similar ($4,1 \pm 0,4$ vs $3,5 \pm 0,4$) e taxa de recuperação embrionária numericamente superior ($2,6 \pm 1,9$ vs $1,9 \pm 1,2$), indicando que o intervalo antes da administração do hCG permite maturação adequada dos folículos previamente estimulados, reduzindo potencialmente o custo do tratamento.

O intervalo entre o final do tratamento com FSH exógeno e o momento de indução das ovulações foi definido como período de “coasting”, sendo incorporado nos protocolos de superovulação por outros autores, embora com eventuais modificações quanto ao momento de parada do tratamento e de indução das ovulações, estando este intervalo de maneira geral entre 42 e 54 horas nos diferentes estudos (McCue et al, 2006; Raz et al, 2006; Welch et al, 2006; Logan et al, 2006).

Com relação a recuperação embrionária, as pesquisas tem demonstrado que a estimulação ovariana exacerbada não proporciona um maior número de embriões obtidos por colheita, apresentando em média menor taxa de recuperação de embriões por ovulação em relação as éguas que apresentam menor resposta ovulatória (Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002; Peres et al., 2004; Logan et al., 2006; Squires et al., 2006; Squires & McCue , 2007). Neste contexto Carmo et al (2006) atribui este fato à dificuldade de captação do oócito pelo oviduto devido à presença de coágulos no local da fossa ovulatória, especialmente naqueles animais com mais que três ovulações.

2.3. Aspiração folicular e controle do ciclo estral

A aspiração folicular tem sido utilizada na espécie eqüina como ferramenta para obtenção de oócitos (Maclellan et al., 2002), nos estudos da fisiologia ovariana, sincronização de cio e ovulação (Ginther et al., 2002, 2004a; Bergfelt & Adams, 2000; Bergfelt et al., 2007).

Quanto às conseqüências da utilização da aspiração folicular repetidamente, Bogh et al (2003) demonstraram que múltiplas sessões de aspiração em éguas pôneis não alteram a função ovariana ou interferem negativamente com a foliculogênese sendo representada pela manutenção da capacidade de ovulação dos folículos dominantes e pela formação de corpus lúteo normais.

Na espécie bovina, estudos envolvendo a aspiração folicular foram utilizados para o controle da emergência de nova onda folicular precedendo os tratamentos superovulatórios, com isso objetivou-se iniciar o tratamento na presença de folículos em crescimento sincrônico e responsivo as gonadotrofinas. Entretanto, Bergfelt et al (1997) não encontraram diferenças entre o número de folículos pré-ovulatórios, ovulações, oócitos fertilizados e embriões transferíveis entre o grupo submetido à aspiração em momentos aleatórios do ciclo e superovulados em relação ao controle, com inicio do tratamento na metade do diestro. Baracaldo et al (2000) ao aspirar os dois maiores folículos com diâmetro $\geq 6\text{mm}$ ou todos os folículos $\geq 5\text{mm}$ em momentos aleatórios do ciclo, observaram que a porcentagem de embriões transferíveis foi similar entre os dois grupos, bem como ao grupo convencional

tratado com progesterona e estradiol-17 β para a sincronização da onda folicular precedendo a superovulação. Maior número de embriões transferíveis ($4,6 \pm 0,9$ versus $2,3 \pm 0,8$) foi obtido com a remoção do folículo dominante antes do início do tratamento superovulatório quando comparado ao grupo não aspirado, indicando a possível influência negativa do folículo dominante sobre a resposta superovulatória (Kim et al., 2001).

Bergfelt et al (2007) utilizaram a aspiração folicular para sincronização das ovulações em éguas, comparando este método com a utilização de progesterona e estrógeno, observando resultados similares. A aspiração de todos os folículos ≥ 10 mm em momentos aleatórios do ciclo, induz o aumento nas concentrações plasmáticas de FSH, com desenvolvimento uniforme dos folículos durante a nova onda induzida e sincronização das ovulações após a administração de PGF $_{2\alpha}$ e hCG (Bergfelt & Adams, 2000). Nesse estudo o diâmetro máximo do folículo ovulatório foi significativamente menor no grupo da ablação ($40,2 \pm 1,2$ mm) em relação ao controle ($43 \pm 0,7$ mm) e a taxa de crescimento diário tendeu ser mais rápida durante os últimos 6 dias que antecederam a ovulação nos animais submetidos a aspiração folicular.

Nas espécies bovina e eqüina a aspiração folicular leva a mudanças nas concentrações de esteróides e gonadotrofinas, podendo ser utilizada para o controle da função ovariana como demonstrado nos estudos que descreveram as relações temporais entre FSH, LH, esteróides e desenvolvimento folicular (Hayna et al., 2006; Hinrichs et al., 1991; Duchamp et al., 1995; Watson & Sertich 1990; Alvarenga et al., 1999; Gastal et al., 1997, 1999b).

Neste contexto o presente estudo utilizou a aspiração folicular como ferramenta para a indução de emergência de onda folicular, iniciando-se o tratamento superovulatório com EPE em diferentes momentos do desenvolvimento folicular da nova onda.

3. HIPÓTESE

O tratamento superovulatório iniciado antes ou imediatamente após o desvio folicular em uma onda induzida por aspiração folicular resultaria em resposta ovariana satisfatória quanto ao número de folículos ≥ 30 mm e ovulações. Porém, com o estabelecimento da dominância, os folículos destinados a atresia não responderiam adequadamente ao tratamento.

4. OBJETIVOS

Determinar as concentrações plasmáticas de FSH e caracterizar o desenvolvimento folicular em éguas cíclicas iniciando-se o tratamento com EPE em momentos distintos em onda folicular induzida.

Avaliar a resposta ovariana ao tratamento quanto ao número de folículos ≥ 30 mm, número de ovulações, número de embriões e taxa de recuperação embrionária por ovulação;

Verificar o efeito da dominância sobre a resposta ovariana ao tratamento superovulatório;

Diminuir o número de administrações de EPE mantendo resposta ovariana e recuperação embrionária satisfatória.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 58 ciclos estrais de trinta éguas em bom estado geral com idade entre quatro e 10 anos e ciclando regularmente, com trato reprodutivo sem alteração a partir da avaliação por meio de ultra-sonografia transretal e citologia uterina. As éguas foram mantidas no Posto de Monta da Fazenda Lageado (Latitude 220° S; Longitude 480° W), Unesp - Campus de Botucatu durante o experimento e alimentadas com feno de Cost-cross (*Cynodon dactylon*) sendo suplementadas com ração concentrada, sal mineral e água a vontade.

A atividade ovariana das éguas foi monitorada por meio de palpação retal e ultra-sonografia diária durante o ciclo estral antecedendo os tratamentos para determinar o dia da ovulação.

5.2. Aspiração Folicular

No 10^o dia após a detecção da ovulação, as éguas foram submetidas à aspiração folicular, sendo o dia da aspiração considerado como dia zero (D0). Para isto, foram sedadas com Xilazina a 10%; 0,5 mg/kg, i.v (Sedazine® Fort-Dodge) utilizando-se 0,2 mg/kg, i.v. de hyoscina N-butyl bromide (Butylscopolamina® Sigma Pharma) visando obtenção de relaxamento retal. Todos os folículos ≥ 8 mm foram aspirados utilizando um transdutor convexo de 5 MHz de frequência com guia trans-vaginal contendo agulha descartável 18G (WTA-Ltda) a qual foi conectada a um sistema de vácuo. A aspiração folicular foi realizada a partir da visualização da ponta da agulha no antro folicular, por meio de pressão negativa exercida pela bomba a vácuo (WTA-Ltda). As éguas receberam duas doses de flunexim meglumine 1,1 mg/kg (Banamine® Shering Plough), sendo a primeira, administrada imediatamente antes do procedimento de aspiração e a segunda, 24 horas após, visando ação anti-inflamatória. Nos exames subsequentes, os folículos aspirados que se preencheram de fluido folicular, atingindo diâmetro maior ou igual à 13mm foram identificados por

meio da presença de coágulo em seu interior e submetidos a uma nova aspiração.

5.3. Tratamentos

Após a aspiração, as éguas foram distribuídas aleatoriamente em cinco tratamentos de acordo com o diâmetro do maior folículo: grupo controle (sal-13) e grupos tratados EPE-13, EPE-20, EPE-23 e EPE-26. Nas éguas dos grupos submetidos a superovulação, a estimulação ovariana foi realizada utilizando-se 12,5 mg (2 mL) de extrato de pituitária eqüina (EPE) por via intra muscular a cada 12 horas, iniciando-se no momento em que o maior folículo da onda induzida atingiu os respectivos diâmetros em cada grupo: $\geq 13\text{mm}$ (EPE-13), $\geq 20\text{mm}$ (EPE-20), $\geq 23\text{mm}$ (EPE-23) ou $\geq 26\text{mm}$ (EPE-26) (Fig1).

Os animais do grupo controle (Sal-13) receberam solução salina (0,9%) i.m. no mesmo volume (2 mL) utilizado nos tratamentos com EPE a cada 12 horas, a partir da presença do maior folículo com diâmetro $\geq 13\text{mm}$. Todos os animais receberam 7,5mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$, (Dinoprost-tromethamine, Lutalyse® Pfizer) 12 horas após o início do tratamento (Fig 2).

A administração de EPE foi mantida até que a maioria dos folículos atingisse diâmetro $\geq 32\text{mm}$. No momento que a maioria dos folículos atingiu diâmetro $\geq 35\text{mm}$ nos grupos tratados e pelo menos um folículo com o mesmo diâmetro foi observado no grupo controle, as ovulações foram induzidas utilizando-se 2.500 UI de gonadotrofina coriônica humana i.v. (Vetecor® Calier) (Fig 1 e 2).

Nos casos em que a diferença em diâmetro entre o maior e o segundo ou terceiro maior folículo foi $\leq 5\text{mm}$ e não tendo estes atingido 32mm, o tratamento foi mantido por mais uma ou duas administrações para que este diâmetro fosse atingido, com exceção dos casos onde a estabilização ou regressão do diâmetro deste(s) ocorresse na próxima avaliação, sendo então interrompido o tratamento.

A primeira inseminação artificial foi realizada dentro de 12 horas após a indução das ovulações, sendo repetida a cada 24 horas até a detecção das ovulações. Para a realização das inseminações foi utilizado sêmen fresco

diluído com diluente a base de leite desnatado na dose inseminante de 1×10^9 espermatozóides móveis obtidos de dois garanhões previamente testados quanto à fertilidade.

As éguas foram submetidas à colheita de embriões oito dias após a detecção da primeira ovulação, recebendo em seguida 7,5 mg de Dinoprostrometamina ($\text{PGF}_{2\alpha}$), i.m. (Fig. 1 e 2).

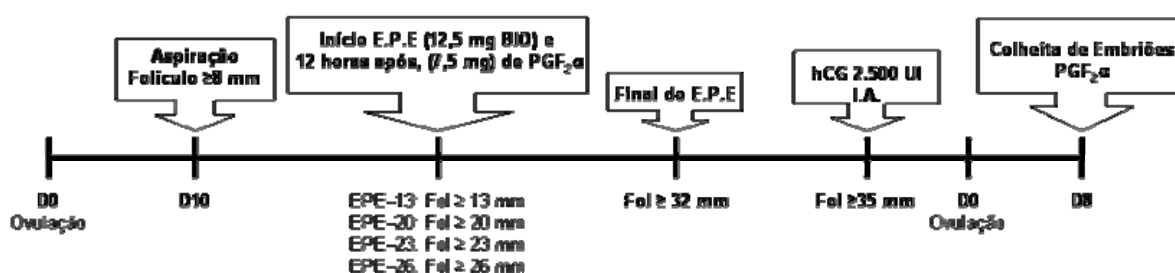


Figura 1: Protocolo experimental das éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE). EPE-13, EPE-20, EPE-23 e EPE-26; iniciando-se o tratamento quando o maior folículo atingiu diâmetro ≥13, 20, 23 e 26mm, respectivamente.

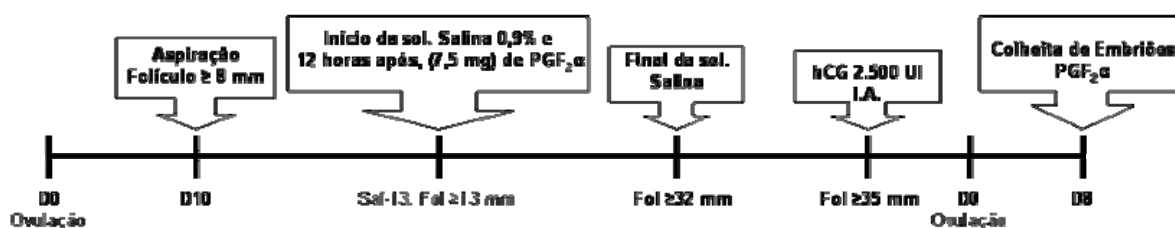


Figura 2: Protocolo experimental das éguas tratadas com solução salina 0,9% (Grupo Controle) Sal-13, iniciando-se o tratamento quando o maior folículo atingiu diâmetro ≥13 mm.

5.4. Colheita de sangue e ensaio hormonal

O sangue foi obtido por meio de punção da veia jugular em tubos heparinizados, centrifugando a 900 xg por 5 minutos e o plasma armazenado a -20°C até a realização dos ensaios hormonais. A colheita de sangue foi realizada a cada 12 horas, iniciando-se imediatamente antes da aspiração folicular, mantendo-se o mesmo intervalo até o início do tratamento, a partir de então as amostras foram obtidas a cada 6 horas até o momento da indução das ovulações, sendo então obtidas a cada 12 horas até ovulação. As colheitas de sangue que coincidiram com o momento de tratamento foram realizadas imediatamente antes da aplicação do EPE ou salina.

As concentrações plasmáticas de FSH foram determinadas pelo método de Radioimunoensaio (RIA) no Laboratório de Endocrinologia Animal da Faculdade de Odontologia – Curso de Medicina Veterinária, Unesp, Araçatuba utilizando-se duplo anticorpo adquirido do (Nogueira, 2004). As amostras foram mensuradas em duplicata e os coeficientes de variação (cv) intra e inter-ensaio foram 6,6% e 17%, respectivamente. A sensibilidade média dos ensaios foi de 0,5 ng/mL.

5.5. Acompanhamento do desenvolvimento folicular

Após o procedimento de aspiração folicular, as éguas foram examinadas com intervalos regulares de 24 horas por meio da ultra-sonografia transretal, utilizando-se um equipamento de ultra-som Pie Medical modelo 240 equipado com transdutor linear de 6 MHz de frequência. A cada avaliação, os folículos com diâmetro <10mm foram contados, sendo seus diâmetros estimados com base na escala métrica no monitor do equipamento. O diâmetro dos folículos ≥10 mm foi mensurado obtendo-se a média dos valores referentes à largura e altura de cada folículo em imagem congelada. As avaliações ultra-sonográficas foram mantidas uma vez ao dia até 24 horas após a detecção das ovulações.

Na avaliação retrospectiva dos dados foliculares foram considerados os cinco maiores folículos de cada avaliação sem levar em consideração a identidade folicular, determinando-se o maior folículo como F1, segundo, terceiro, quarto e quinto maior como F2, F3, F4 e F5, respectivamente.

5.6. Preparação do Extrato de Pituitária (EPE)

Glândulas pituitárias foram obtidas em abatedouro eqüino e acondicionadas a -20°C até que fossem processadas segundo a técnica descrita por Guilou & Combarnous (1983). Após o descongelamento, as pituitárias foram banhadas em água destilada/deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com solução de 40% de ethanol e 6% de acetato de amônia. A utilização da solução de ethanol e acetato de amônia teve como objetivo a extração das gonadotrofinas. A fração obtida pós extração foi precipitada e a concentração de ethanol aumentada para 80%, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20°C.

Para o presente estudo, o conteúdo liofilizado de todas as partidas foi pesado em balança analítica, misturado e diluído com solução fisiológica 0,9% para atingir uma concentração de 6,25 mg/mL. Tal procedimento visou obtenção de uma partida única e homogeneia para todo o experimento.

A concentração de gonadotrofinas contida do extrato de pituitária eqüina foi determinada por meio de RIA no laboratório de endocrinologia do professor O.J. Ginther na Universidade de Wisconsin, USA. As concentrações de FSH e LH foram de: 3,6% (225ng/mL) e 1,0% (62,5 ng/mL); sendo representadas pela proporção de 3:1 de FSH e LH, respectivamente.

5.7. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi desenvolvido em duas estações reprodutivas (de novembro a março). As éguas usadas em cada ano foram distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos, num delineamento inteiramente casualizado em medidas repetidas, com três éguas no tratamento EPE-13 e quatro éguas em cada um dos seguintes tratamentos: EPE-20, EPE-23, EPE-26 e Sal-13 no primeiro ano. No segundo ano o número de animais foi de duas éguas nos tratamentos EPE-13, EPE-23, EPE-26, Sal-13 e três éguas no EPE-20.

No primeiro ano, foram utilizados de um a dois ciclos estrais/égua nos tratamentos EPE-20 e EPE-26; e de um a três ciclos estrais/égua nos tratamentos EPE-13, EPE-23 e Sal-13. No segundo ano, utilizaram-se dois

ciclos estrais/égua em todos os tratamentos. Entre os ciclos estrais tratados estipulou-se a espera de um intervalo inter-ovulatório não tratado visando eliminar o possível efeito residual do tratamento sobre o próximo ciclo tratado. O total de ciclos por tratamento foi: 12 ciclos no EPE-13, 11 no EPE-20, 12 no EPE-23, 10 no EPE-26 e 13 no Sal-13.

A análise do diâmetro do maior folículo (F1), número de folículos <10 mm e de 10 a 19 mm ao início do tratamento, número de folículos ≥ 30 mm, número de ovulações, número de embriões por colheita, porcentagem de recuperação embrionária por ovulação e diâmetro máximo atingido pelas classes foliculares F1, F2, F3, F4 e F5; bem como o intervalo aspiração ao início do tratamento, duração do tratamento, número de administrações de EPE, final do tratamento até a administração do hCG foi efetuada por meio do procedimento MIXED do SAS, conforme um modelo que incluiu os seguintes efeitos fixos: tratamento e ciclo (este em medidas repetidas nas éguas); e os efeitos aleatórios de ano, égua dentro da combinação de ano com tratamento e resíduo. Os dados relativos ao número de ovulações e folículos ≥ 30 mm foram analisados utilizando o modelo acima incluindo-se o número de folículos <10 mm, 10 a 19 mm ao início do tratamento como sendo co-variável. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Tukey Kramer.

A análise da variável classe folicular (F1, F2, F3, F4, e F5) foi efetuada por meio do procedimento MIXED do SAS, conforme um modelo que incluiu os seguintes efeitos fixos: tratamento, ciclo (em medidas repetidas nas éguas), tipo de folículo (em medidas repetidas nas éguas), hora (em medidas repetidas na combinação de égua com ciclo e tipo de folículo), bem como todas as interações entre tratamento, tipo de folículo e hora, com os efeitos aleatórios de ano, égua dentro da combinação de ano com tratamento e resíduo. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Dunnett.

A análise da variável FSH foi efetuada por meio do procedimento MIXED do SAS, conforme um modelo que incluiu os seguintes efeitos fixos: tratamento, ciclo (em medidas repetidas nas éguas), hora (em medidas repetidas na combinação de égua com ciclo), bem como a interação entre tratamento e hora; e os efeitos aleatórios de ano, égua dentro da combinação de ano com tratamento, interação de ciclo com égua dentro de ano e tratamento, bem como o resíduo. As médias de ciclo foram comparadas

mediante o teste de Tukey, as médias dos tratamentos com EPE foram comparadas em relação controle por meio do teste de Dunnett.

Os valores máximos, mínimos e basais (média das concentrações durante um determinado período), bem como o número de picos e suas respectivas magnitudes acima das concentrações basais foram determinados durante dois períodos distintos: a partir da aspiração folicular até o início do tratamento com EPE ou salina e do tratamento até a detecção das ovulações, por meio de identificação de flutuações episódicas nas concentrações de FSH (Clifton & Stainer, 1983). Os dados foram submetidos ao teste t não pareado a 5% de significância, comparando-se os valores médios dos animais tratados com EPE em relação ao seu respectivo controle, o qual teve seu início de tratamento com salina no momento em que o maior folículo atingiu o diâmetro esperado para o respectivo grupo tratado.

6. RESULTADOS

As concentrações de FSH apresentaram efeito de grupo, tempo, ciclo ($P < 0,01$) e interação entre grupo e tempo ($P < 0,01$). Contudo não foi detectada a interação entre ciclo e tempo ($P > 0,05$). As concentrações de FSH variaram ao longo do tempo e sua mudança dependeu do tratamento, sendo as variações independentes do ciclo.

As concentrações de FSH considerando todo período experimental (a partir da aspiração folicular até as ovulações) foram mais baixas nos animais do grupo controle do que as concentrações observadas nos animais dos grupos EPE-13 e EPE-20 ($P < 0,01$), não diferindo ($P > 0,05$) das concentrações observadas nos animais dos grupos EPE-23 e EPE-26 (Fig. 3A, 4A, 5A, 6A).

Após a aspiração folicular, as concentrações de FSH no grupo controle apresentaram aumento gradativo, mantendo este perfil até atingir valores máximos ($46,1 \pm 4,7 \text{ ng/mL}$) 84 horas após a aspiração. A partir de então, houve diminuição gradativa ao longo do tempo mantendo-se baixa entre 18 a 21 ng/mL até o final do período experimental (Figuras 3A, 4A, 5A e 6A).

As concentrações de FSH no tratamento EPE-13 estão representadas pela figura 3A, sendo caracterizadas por aumento gradativo após

aproximadamente 48 horas da aspiração folicular, acompanhando o perfil observado no grupo controle. Entretanto, as concentrações mantiveram-se aumentadas atingindo valores máximos ($61,5 \pm 4,7$ ng/mL) seis horas após o início do tratamento, com pequena diminuição 18 horas após a primeira administração de EPE, mantendo-se estável ($38,9 \pm 4,0$ a $49,6 \pm 4,1$ ng/mL) até o final do tratamento e sendo superior ao controle. Interrompido o tratamento observou-se queda da concentração para atingir valores similares ao controle 30 horas mais tarde.

As concentrações de FSH no tratamento EPE-20 estão representadas na figura 4A, demonstrando-se aumento gradativo até atingirem valores entre 44 e 50 ng/mL a partir de 60 horas após a aspiração folicular até diminuírem entre 120 e 156 horas, momento em que se iniciou o tratamento, retomando e mantendo as concentrações elevadas, ao redor de 40 ng/mL durante o tratamento, diminuindo após o final do mesmo até atingir valores similares ao controle 36 horas após a última aplicação de EPE.

No grupo EPE-23, o perfil de aumento das concentrações de FSH após a aspiração folicular, com posterior diminuição gradativa no período precedendo o início do tratamento com EPE foi paralelo ao perfil observado no controle. Com o início do tratamento, observou-se pequena elevação nas concentrações, que se mantiveram entre 33,3 e 40,7 ng/mL até o final do mesmo, sofrendo uma queda e atingindo concentrações inferiores a 20 ng/mL no final do período experimental (Fig. 5A).

O perfil de FSH no tratamento EPE-26 foi caracterizado por aumento das concentrações até 132 horas após a aspiração folicular, com diminuição até o início do tratamento. Embora aparentemente, as concentrações não apresentem perfil paralelo ao controle, observa-se queda até que atinjam valores abaixo de 30 ng/mL antes do início do tratamento, sobrepondo-se aos valores observados no controle. Após as administrações de EPE as concentrações aumentaram discretamente, permanecendo entre 27,6 a 33,9 ng/mL, não retomando os valores observados na fase pós-ablação e com diminuição após o final do tratamento.

Os valores máximo, mínimo e basais médios das concentrações de FSH, bem como número e amplitude das flutuações deste hormônio durante o período correspondente à aspiração folicular até o início dos tratamentos (EPE

ou salina) foram similares entre os grupos tratados e controle, com exceção do valor máximo para o EPE13 e mínimo para o EPE26, que foram superiores ao controle (Tab. 1).

As concentrações de FSH a partir do início dos tratamentos até a ovulação foram caracterizadas por valores máximo, mínimo e basal superiores nos grupos tratados com EPE em relação ao controle (Tab. 2). Neste período o número de picos foi superior nos grupos EPE-20 e EPE-23 com relação ao controle, sendo a magnitude de tais flutuações similar entre os animais tratados e controle, com exceção da superioridade no primeiro aumento observado no EPE-23 em relação ao controle (Tab. 2).

O desenvolvimento dos folículos F1, F2 e F3 estão representados nas figuras 3B, 4B, 5B e 6B e dos F4 e F5 nas figuras 3C, 4C, 5C e 6C.

O diâmetro médio do folículo F1 variou entre os diferentes tratamentos ($P < 0,01$) ao longo do tempo ($P < 0,0001$), sendo caracterizado por interação entre grupo e tempo ($P < 0,01$), onde a variação do diâmetro ao longo do tempo foi dependente do grupo, não sendo observado efeito de ciclo ($P > 0,05$).

No tratamento EPE-13, o perfil de crescimento do folículo F1 foi similar ($P > 0,05$) ao controle durante o experimento (Fig. 3B). No EPE-20 essa categoria folicular apresentou diâmetro inferior ao controle ($P < 0,01$), porém mantendo o mesmo perfil de desenvolvimento (Fig. 4B).

Os diâmetros médios do folículo F1 para os tratamentos EPE-23 e EPE-26 foram similares ($P > 0,05$) ao controle (Figs. 5B e 6B).

Nas demais categorias (F2, F3, F4 e F5) os diâmetros variaram ao longo do tempo ($P < 0,01$), não apresentando efeito de grupo ($P > 0,05$) ou ciclo ($P > 0,05$).

Observou-se interação grupo e tempo para o folículo F2, sendo que as variações no diâmetro folicular ao longo do tempo dependeram do grupo ($P < 0,01$).

Embora esta classe folicular não tenha apresentado diferença significativa entre os tratamentos e o controle, o perfil do folículo F2 observado no EPE-13, EPE-20 e EPE-23 caracterizaram-se por crescimento contínuo sendo semelhante ao folículo F1, porém com diâmetro inferior (Figs. 3B, 4B, 5B e 6B). Este comportamento diferiu do folículo F2 do controle, o qual se caracterizou pela manutenção, seguido de redução do diâmetro a partir do dia

oito pós-aspiração folicular. No EPE-26, o folículo F2 parece retomar seu crescimento após o início do tratamento, embora o perfil não se aproxime do folículo F1, como observado nos demais tratamentos. (Fig. 6B).

O folículo F3 apresentou forte tendência à interação entre grupo e tempo ($P= 0,074$) apresentando variações dependentes do grupo ao longo do tempo (Figs. 3B, 4B, 5B e 6B).

Os perfis dos folículos F3 nos animais dos tratamentos EPE-13 e EPE-20 foram caracterizados por padrão de crescimento contínuo, embora com mensurações inferiores em relação aos folículos F2 e F3 dos animais do grupo controle até aproximadamente o terço final do período de tratamento, quando demonstram certo crescimento se mantendo ao redor dos 16 a 19 mm (Figs. 3B e 4B).

Nos tratamentos EPE-23mm e EPE-26, os folículos F3 foram caracterizados por discreto desenvolvimento, não ultrapassando 18 mm em média (Figs 5B e 6B).

Os folículos F4 e F5 apresentaram efeito de tempo ($P<0,01$), porém não foi observado efeito de grupo, ciclo ou interações entre grupo e tempo ($P>0,05$), variando ao longo do tempo independentemente do grupo (Figs. 3C, 4C, 5C e 6C). De maneira geral, os perfis de crescimento destes folículos foram caracterizados por variações muito discretas e similares ao controle, porém com diâmetro ligeiramente maior no EPE-20 no final do período experimental.

O diâmetro médio do maior folículo ao início dos tratamentos está representado na tabela 3. O número de folículos nas categorias <10 e 10 - 19mm no início do tratamento para os grupos sal-13, EPE-13, EPE-20, EPE-23 e EPE-26 foram respectivamente $8,2\pm1,1$ e $2,5\pm0,5$; $7,4\pm1,0$ e $2,1\pm0,4$; $3,8\pm1,0$ e $3,4\pm0,8$; $4,4\pm1,0$ e $2,8\pm0,4$; $5,2\pm1,4$ e $2,8\pm0,7$, não havendo diferença significativa entre os grupos. Para a categoria 20 a 25mm o número médio de folículos foi $1,4\pm0,2$ para o EPE-20; $1,6\pm0,2$ para o EPE-23 e $0,4\pm0,2$ para o EPE-26 e finalmente a categoria folicular >25mm, observada somente no grupo EPE-26 foi $1,1\pm0,1$ folículo.

O diâmetro máximo atingido pelo folículo F1 nos diferentes tratamentos não apresentou efeito de grupo ou ciclo. Entretanto observou-se efeito de

grupo, sem efeito de ciclo sobre o diâmetro máximo do folículo F2. Quanto aos folículos F3, F4 e F5, o maior diâmetro foi similar ao controle (Tab. 3).

O número de folículos $\geq 30\text{mm}$, número de ovulações, número de embriões e porcentagem de embriões recuperados por ovulação estão representadas na tabela 4. Observou-se efeito de grupo para o número médio de folículos $\geq 30\text{mm}$ ($P < 0,05$); sendo este número mais alto nos tratamentos EPE-20 e EPE-23 quando comparados ao controle. O número de ovulações variou entre os grupos tratados e controle ($P < 0,05$), sendo superior no EPE-20 e EPE-23 em relação ao controle e similares aos demais. Não houve diferença entre os tratamentos e o controle quanto ao número médio de embriões recuperados por lavado ou a porcentagem de recuperação embrionária por ovulação.

A porcentagem de ovulações simples, duplas, triplas e quádruplas nos grupos tratados com EPE-13 foram respectivamente: 50%, 42%, 8% e 0%; no EPE-20: 36%, 46%, 9% e 9%; EPE-23: 25%, 50%, 25% e 0% e no EPE-26: 60% , 40%, 0% e 0%. No controle observou-se apenas uma ovulação dupla (8%) com 92% de ovulação simples. A porcentagem de folículos que se desenvolveram até diâmetros $\geq 30\text{mm}$, embora não tenham culminado em ovulação, foi de 9% (2/21) para o tratamento EPE-13 e 5% (1/21) para o EPE-20. Nos tratamentos EPE-23, EPE-26 e no controle, todos os folículos que atingiram $\geq 30\text{mm}$ de diâmetro ovularam.

A tabela 5 representa os intervalos entre a aspiração folicular e o início dos tratamentos, duração dos tratamentos, bem como o número de administrações de EPE ou Salina e o intervalo entre o final dos tratamentos e a indução das ovulações. O intervalo médio em dias entre a aspiração folicular e o início do tratamento com EPE ou salina variou nos diferentes grupos ($P < 0,01$) e ciclos ($P < 0,05$), sendo mais longo no EPE-23 e EPE-26 quando comparados ao controle e ao EPE-13 e similar ao EPE-20, o qual apresentou intervalo mais longo que o controle ($P < 0,05$).

A duração do tratamento, bem como o número de administrações de EPE ou salina variaram nos diferentes grupos ($P < 0,01$) sendo mais curta e com menor número de administrações nos grupos EPE-23 e EPE-26 em relação aos demais tratamentos (Tab. 5).

O intervalo entre o final do tratamento com EPE ou Salina até o momento de administração do hCG variou nos diferentes grupos ($P<0,01$), sendo menor no EPE-13 ($P<0,01$) e EPE-26 ($P<0,05$) em relação ao controle e aos demais grupos (Tab. 5).

Tabela 1: Valores máximos, mínimos, médios basais (Média±EPM) e flutuações das concentrações de FSH (ng/mL) a partir da aspiração folicular até o início do tratamento com EPE ou salina em éguas cíclicas.

GRUPO	Valor			Frequência dos aumentos (n)	Amplitude dos aumentos			
	Máximo (n)	Mínimo (n)	Médio Basal (n)		Primeiro (n)	Segundo (n)	Terceiro (n)	Quarto (n)
EPE-13	57,5±3,4 ^a (12)	25,8±3,0 (12)	40,2±2,2 (12)	1,4±0,1 (12)	12,5±2,7 (12)	17,4±2,2 (7)		
Sal-13 (Fol.≥13)	47,2±3,0 ^b (13)	25,5±2,3 (13)	35,7±2,7 (13)	1,4±0,2 (13)	9,9±2,0 (11)	14,0±3,0 (6)		
EPE-20	55,9±1,9 (11)	25,7±2,9 (11)	40,2±2,6 (11)	1,6±0,2 (11)	12,1±2,6 (11)	15,2±2,7 (6)	5,2±1,3 (2)	
Sal-13 (Fol.≥20)	53,6±0,8 (13)	22,1±0,7 (13)	34,9±0,6 (13)	1,8±0,1 (13)	14,9±0,4 (13)	11,8±0,5 (7)	12,9±5,1 (3)	
EPE-23	54,2±2,2 (12)	21,2±1,1 (12)	35,0±1,6 (12)	2,5±0,2 (12)	10,8±1,9 (12)	14,4±2,2 (11)	13,9±2,2 (6)	15,07 (1)
Sal-13 (Fol.≥23)	53,6±3,9 (13)	20,3±1,7 (13)	33,2±2,3 (13)	2,2±0,2 (13)	13,1±1,6 (13)	14,7±2,2 (10)	10,7±3,2 (5)	
EPE-26	56,1±1,7 (10)	21,1±1,4 ^a (10)	36,2±3,0 (10)	2,8±0,2 (10)	14,2±1,5 (10)	11,9±1,3 (10)	15,9±1,2 (5)	9,4±3,4 (2)
Sal-13 (Fol.≥26)	53,6±3,0 (13)	16,5±1,4 ^b (13)	29,9±1,6 (13)	2,8±0,2 (13)	15,6±2,1 (13)	15,5±2,1 (13)	11,9±2,5 (9)	7,047 (1)

Valores na mesma coluna com letras diferentes, diferem do respectivo controle $P<0,05$.

Tabela 2: Valores máximos, mínimos, médios basais (Média±EPM) e flutuações das concentrações de FSH (ng/mL) a partir do tratamento com EPE ou salina até a detecção das ovulações em éguas cíclicas.

GRUPO	Valor			Frequência dos aumentos (n)	Amplitude dos aumentos			
	Máximo (n)	Mínimo (n)	Médio Basal (n)		Primeira (n)	Segunda (n)	Terceira (n)	Quarta (n)
EPE 13	64,6±4,6 ^{a*} (12)	24,8±2,2 ^{a*} (12)	45,5±2,1 ^{a*} (12)	2,2±0,4 (12)	18,3±3,3 (11)	15,8±3,0 (8)	8,3±1,8 (5)	6,5±3,0 (2)
Salina13 (Fol.≥13)	47,1±3,0 ^b (13)	14,5±1,3 ^b (13)	26,3±1,6 ^b (13)	1,6±0,2 (13)	19,6±2,4 (12)	10,8±2,4 (8)	6,6 (1)	
EPE 20	56,2±3,7 ^{a**} (11)	25,2±2,5 ^{a**} (11)	38,3±2,6 ^{a**} (11)	2,09±0,2 ^{a**} (11)	13,7±2,2 (11)	13,2±2,8 (10)	13,1±7,2 (2)	
Salina13 (Fol.≥20)	32,4±2,7 ^b (13)	15,3±1,2 ^b (13)	22,3±1,5 ^b (13)	1,4±0,2 ^b (8)	8,9±3,0 (8)	4,7±1,5 (3)		
EPE 23	44,2±3,2 ^{a**} (12)	20,5±2,1 ^{a*} (12)	32,5±2,5 ^{a**} (12)	1,7±0,1 ^{a**} (12)	10,9±1,6 ^{a*} (12)	7,1±1,8 (9)		
Salina13 (Fol.≥23)	28,8±2,2 ^b (13)	15,1±1,4 ^b (13)	21,4±1,4 ^b (13)	1,1±0,1 ^b (10)	5,8±0,9 ^b (10)	6,8 (1)		
EPE26	37,7±1,3 ^{a**} (10)	19,2±1,9 ^{a**} (10)	26,6±1,3 ^{a**} (10)	1,8±0,1 (10)	7,5 ± 1,1 (9)	7,1 ± 1,3 (8)		
Salina16 (Fol.≥26)	21,2±1,5 ^b (12)	13,8±0,9 ^b (12)	17,8±1,1 ^b (12)	1,5±0,3 (4)	4,4±1,4 (4)	3,2±1,2 (2)		

Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem do respectivo controle

*P<0,05, **P<0,01.

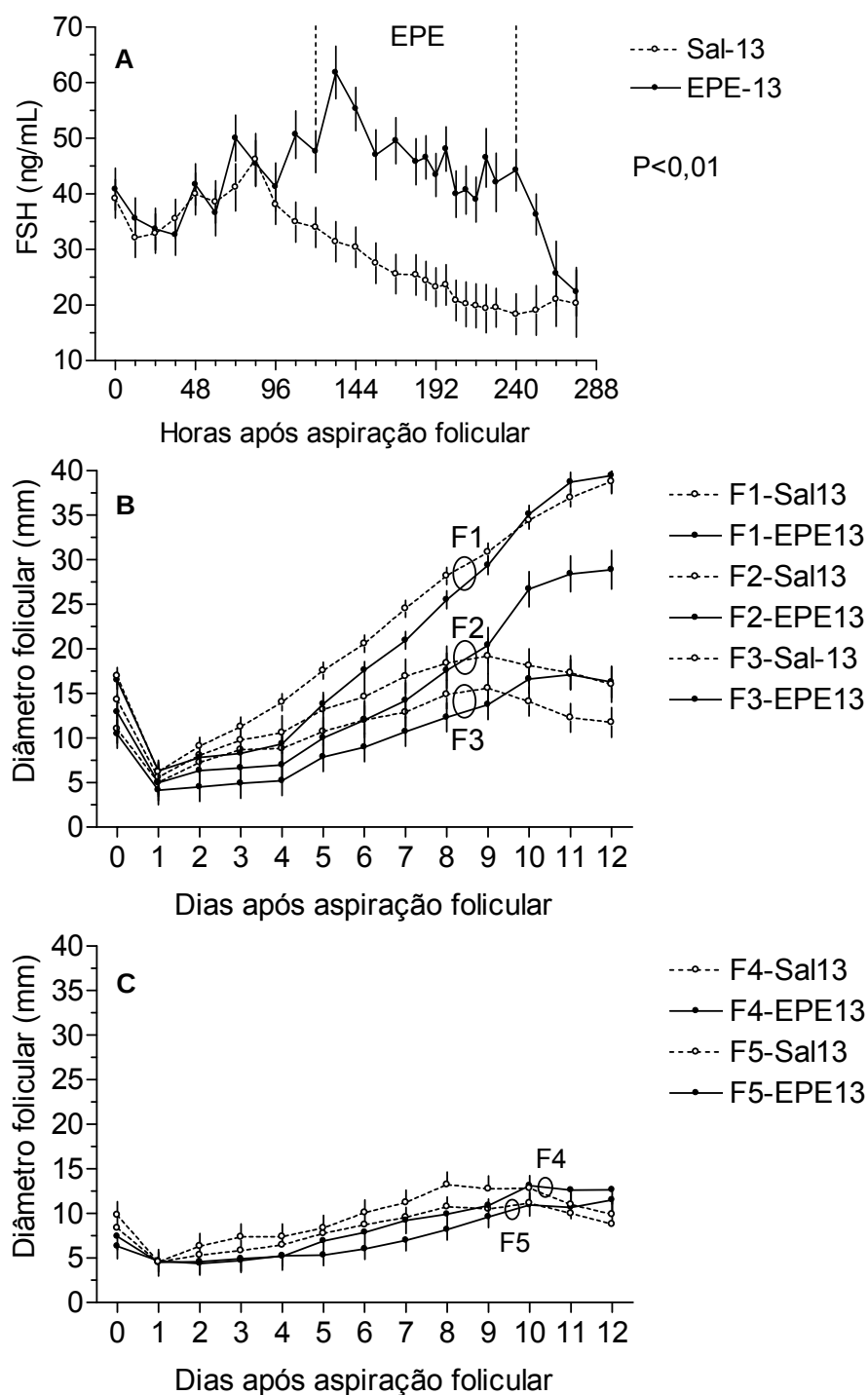


Figura 3: Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg, duas vezes ao dia) ou salina iniciado na presença de folículos ≥ 13 mm e em éguas controle. Média $\pm$ EPM.

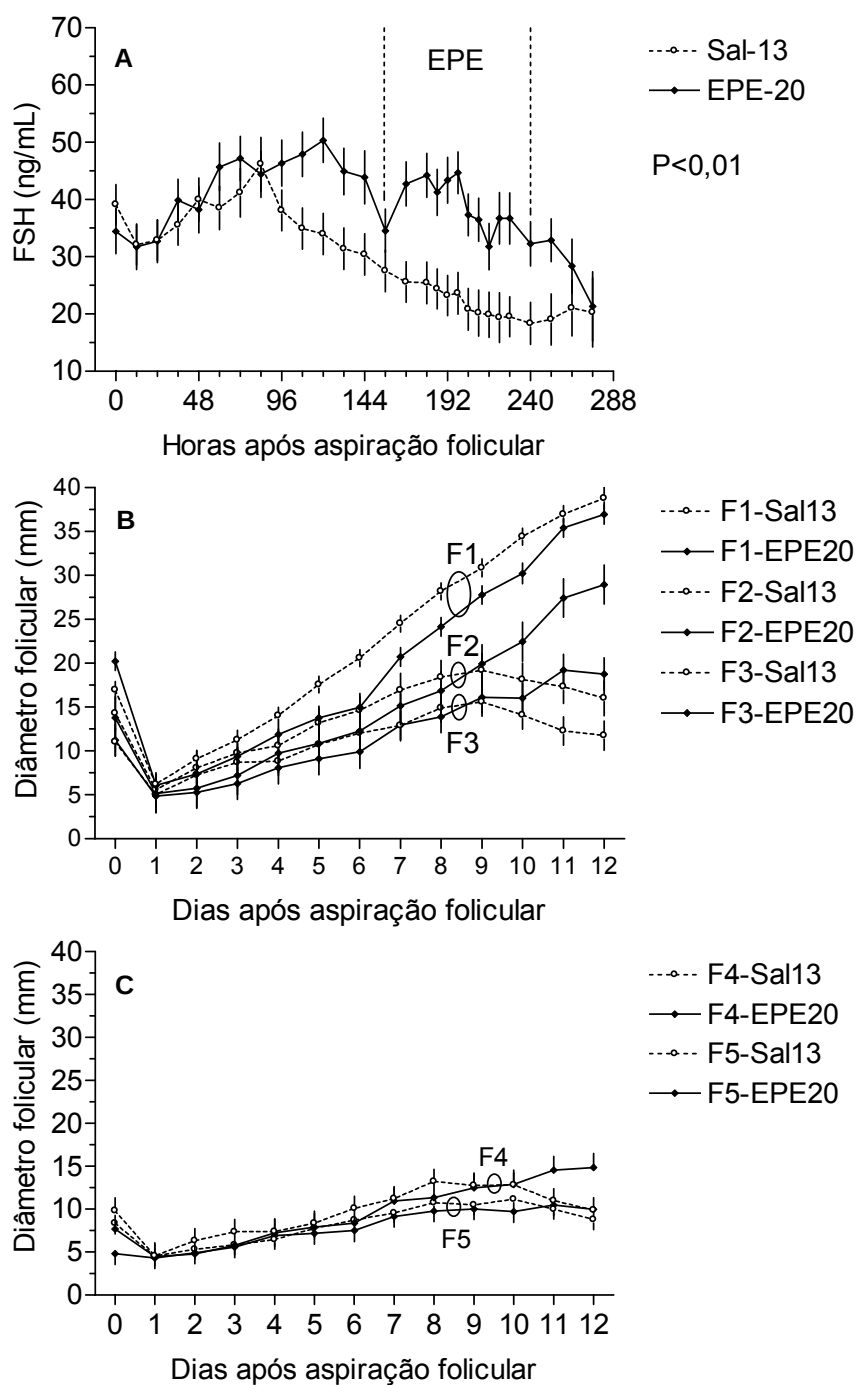


Figura 4: Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg, duas vezes ao dia) ou salina iniciado na presença de folículos ≥ 20 mm e em éguas controle.

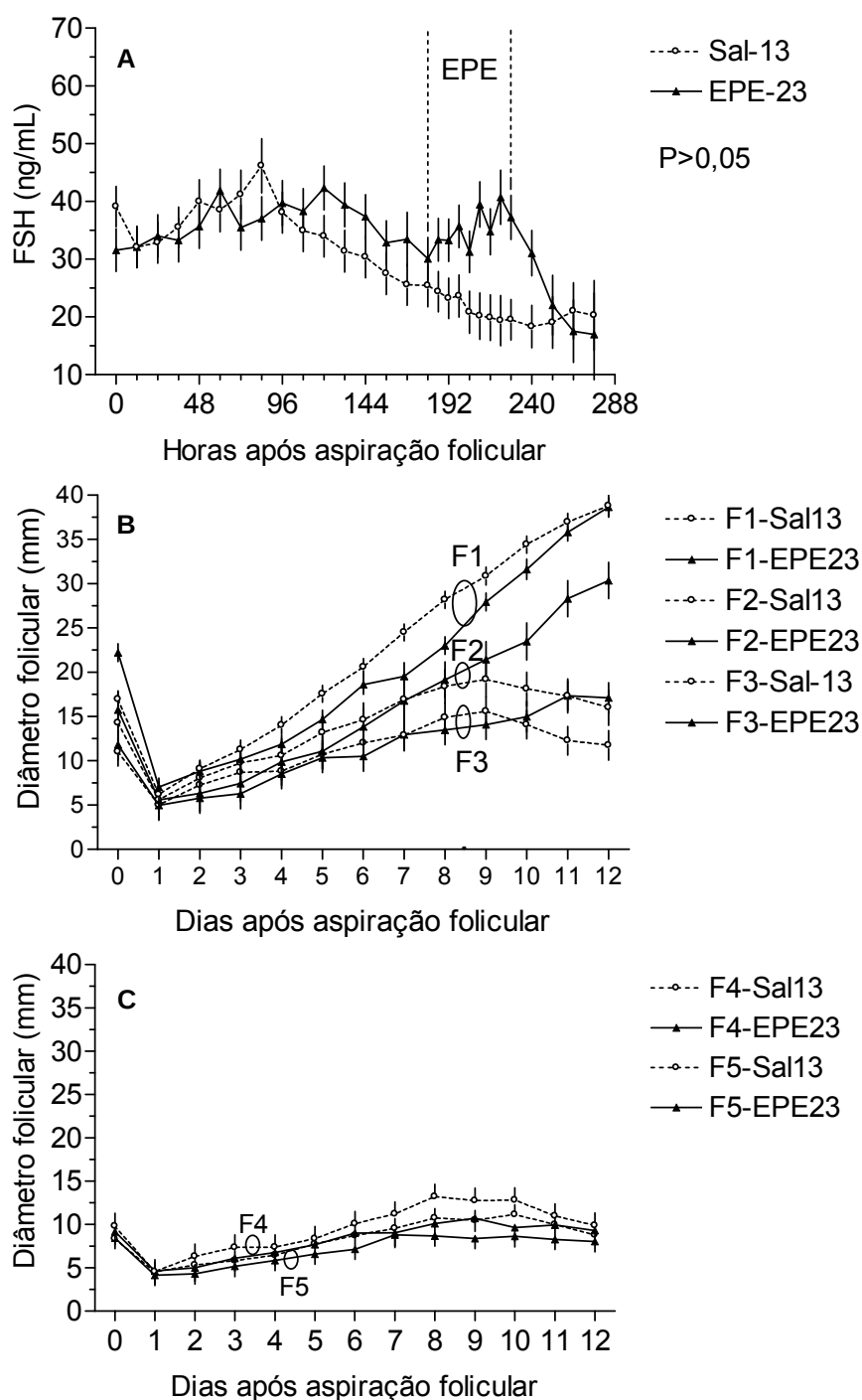


Figura 5: Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg, duas vezes ao dia) ou salina iniciado na presença de folículos ≥ 23 mm e em éguas controle.

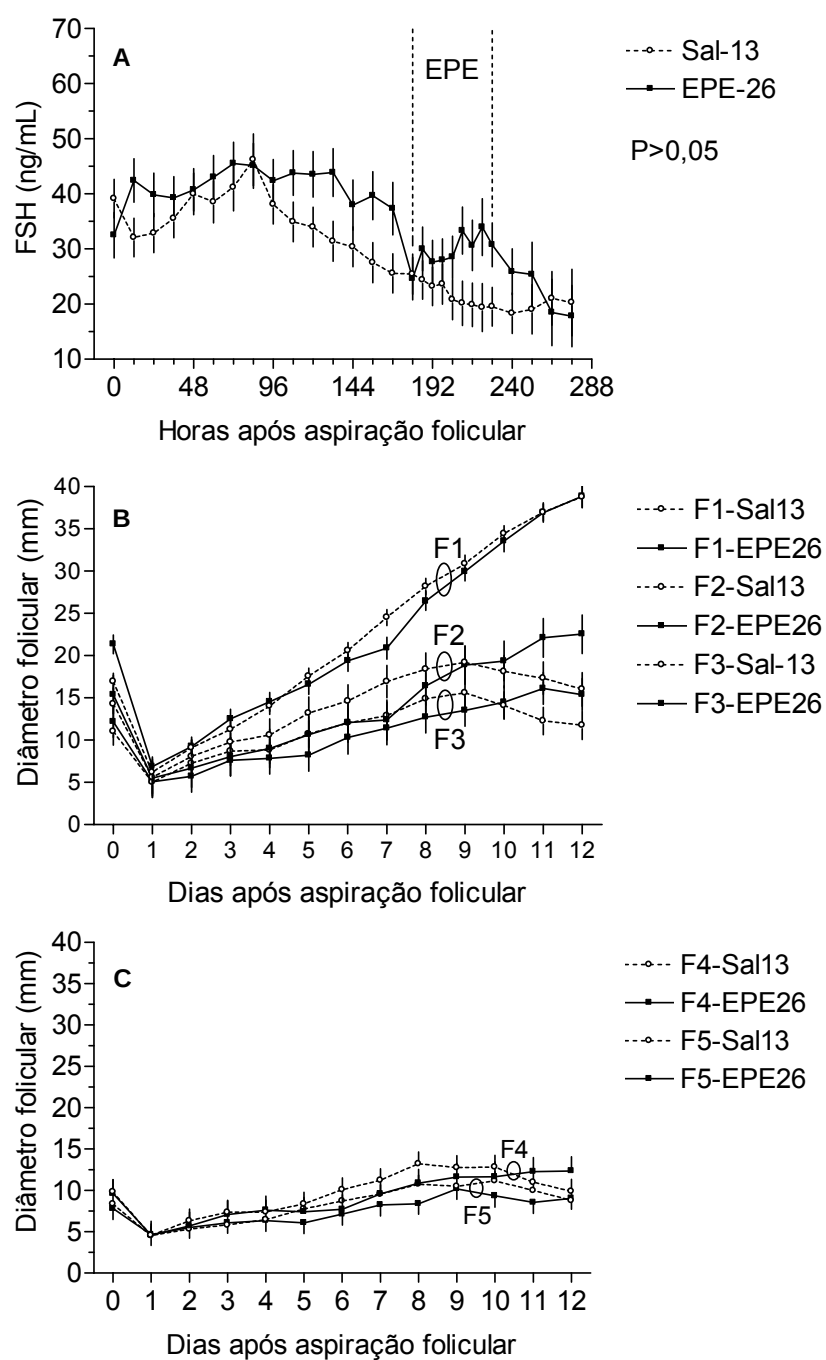


Figura 6: Concentrações plasmáticas de FSH (A) e perfis de desenvolvimento folicular (B e C) em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular precedendo o tratamento com EPE (12,5mg, duas vezes ao dia) ou salina iniciado na presença de folículos ≥ 26 mm e em éguas controle.

Tabela 3: Diâmetro atingido pelo maior folículo (Média $\pm$ EPM) imediatamente antes do início do tratamento com EPE ou salina e diâmetro máximo atingido pelos cinco maiores folículos (F1, F2, F3, F4 e F5) antes da detecção das ovulações.

Grupo	Sal-13	EPE-13	EPE-20	EPE-23	EPE-26
Nº de ciclos estrais	13	12	11	12	10
Diâmetro do maior folículo (mm) (variação)	14,3 $\pm$ 0,4 ^{a*} (13-16)	14,1 $\pm$ 0,4 ^{a*} (14-15)	21,0 $\pm$ 0,4 ^{b*} (20-22)	23,4 $\pm$ 0,4 ^{c*} (21-25)	26,8 $\pm$ 0,4 ^{d*} (26-28)
Diâmetro máximo atingido (mm)	F1	37,7 $\pm$ 0,7	38,2 $\pm$ 0,8	37,9 $\pm$ 0,9	38,5 $\pm$ 0,8
	F2	20,8 $\pm$ 3,0 ^a	29,3 $\pm$ 3,1 ^{ab}	30,4 $\pm$ 3,5 ^b	32,5 $\pm$ 3,3 ^{b*}
	F3	16,5 $\pm$ 2,0	18,7 $\pm$ 2,1	21,3 $\pm$ 2,5	20,2 $\pm$ 2,2
	F4	14,3 $\pm$ 1,8	14,6 $\pm$ 1,8	16,9 $\pm$ 2,1	13,5 $\pm$ 1,9
	F5	12,8 $\pm$ 1,4	11,0 $\pm$ 1,5	12,9 $\pm$ 1,6	11,3 $\pm$ 1,5

Letras diferentes na mesma linha diferem ($P < 0,05$), * $P < 0,01$

Tabela 4: Resposta ovariana e recuperação embrionária em éguas cíclicas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE) ou salina precedida da aspiração folicular (Média $\pm$ EPM).

Grupo	Nº de ciclos estrais	Nº de folículos ≥ 30 mm	Nº de ovulações	Nº de embriões/colheita	(%) embriões/ovulação
Sal-13	13	1,08 $\pm$ 0,20 ^b	1,07 $\pm$ 0,19 ^b	0,72 $\pm$ 0,21 ^a	61,3 ^a
EPE-13	12	1,75 $\pm$ 0,20 ^{ab}	1,57 $\pm$ 0,20 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,22 ^a	60,0 ^a
EPE-20	11	1,91 $\pm$ 0,23 ^a	1,91 $\pm$ 0,23 ^{a*}	1,41 $\pm$ 0,25 ^a	73,0 ^a
EPE-23	12	1,83 $\pm$ 0,21 ^a	1,99 $\pm$ 0,21 ^a	1,04 $\pm$ 0,23 ^a	52,6 ^a
EPE-26	10	1,40 $\pm$ 0,24 ^{ab}	1,39 $\pm$ 0,24 ^{ab}	0,85 $\pm$ 0,26 ^a	54,2 ^a

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem ($P < 0,05$), * ($P < 0,01$).

Tabela 5: Intervalos durante o período da aspiração folicular à indução das ovulações e número de administrações de EPE ou salina (Média $\pm$ EPM) em éguas cíclicas.

Grupo	Nº de ciclos estrais	Aspiração tratamento (Dias)	Duração do tratamento (Dias)	Número de administrações de Sal ou EPE	Final do Tratamento até o hCG (horas)
Sal-13	13	3,64 $\pm$ 0,41 ^b	5,55 $\pm$ 0,34 ^b	11,10 $\pm$ 0,68 ^b	37,08 $\pm$ 3,29 ^b
EPE-13	12	4,94 $\pm$ 0,42 ^b	5,18 $\pm$ 0,35 ^b	10,35 $\pm$ 0,70 ^b	22,42 $\pm$ 3,49 ^a
EPE-20	11	6,25 $\pm$ 0,48 ^{ab}	3,75 $\pm$ 0,39 ^c	7,49 $\pm$ 0,79 ^c	30,08 $\pm$ 3,83 ^b
EPE-23	12	7,55 $\pm$ 0,44 ^a	2,36 $\pm$ 0,36 ^a	4,72 $\pm$ 0,72 ^a	30,19 $\pm$ 3,52 ^b
EPE-26	10	7,02 $\pm$ 0,50 ^a	2,40 $\pm$ 0,41 ^a	4,80 $\pm$ 0,82 ^a	23,23 $\pm$ 4,12 ^a

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem ($P < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram aumento inicial nas concentrações de FSH em média 68 horas (54 a 72 horas) após a aspiração folicular em todas as éguas, sendo acompanhado pela detecção de um grupo de folículos entre 6 e 10mm, os quais caracterizaram a emergência da nova onda folicular induzida (Fig 3A e B, 4A e B, 5A e B, 6A e B).

Concentrações de FSH similares foram observadas por Bergfelt & Adams (2000) quando da indução da onda por aspiração folicular em momentos aleatórios do ciclo estral, indicando que a remoção dos fatores intra-foliculares supressores da secreção desta gonadotrofina, permitem sua liberação com aumento sérico gradativo, estimulando a emergência de nova onda.

Em éguas com onda folicular espontânea o aumento de FSH observado por Bergfelt & Ginther (1993) foi relacionado à emergência de onda detectada no 11º dia após a ovulação, as quais apresentaram perfil similar aos observados em éguas com onda induzida.

A concentração máxima detectada em média, 84 horas (60 a 108 horas) após a aspiração diminuiu gradativamente até a ovulação nas éguas do grupo controle (Figs. 3A, 4A, 5A e 6A), sendo compatível aos dados de Bergflet & Adams, (2000) que observaram valores máximos no 4º dia, seguido pela diminuição oito dias após a aspiração folicular.

Conforme observado por Gastal et al (1997), tal diminuição iniciou-se quando o maior folículo da onda induzida por aspiração atingiu 13mm e permaneceu durante o crescimento do folículo dominante após o desvio, perfil similar foi detectado nos animais controle deste experimento. Tal supressão nas concentrações de FSH foi atribuída à capacidade de produção e secreção de inibina pelos folículos ≥ 13 mm até o momento esperado do desvio e pelo folículo dominante após o desvio (Donadeu & Ginther, 2001).

A similaridade observada com relação as variáveis: valor máximo, mínimo, médio basal e frequência das flutuações entre os animais tratados e controles a partir da aspiração até o início do tratamento era esperada, uma vez que estes animais foram submetidos ao mesmo procedimento no período que antecedeu o início dos tratamentos. No entanto, a exceção marcada pela

superioridade do valor máximo observado nas concentrações médias de FSH no EPE-13 com relação ao controle (Tab 1) deve ter sido influenciada pela variação individual, resultando em concentrações elevadas (84,59 ng/ml e 71,75 ng/ml) em duas éguas deste grupo, 60 horas após a aspiração.

Quanto à superioridade do valor mínimo observado no EPE-26 em relação ao controle na fase mencionada acima, pode ter sido consequência da queda mais acentuada do FSH por influência do folículo dominante nos animais do grupo controle em relação aos animais do EPE-26.

A partir do início dos tratamentos até a ovulação, os valores máximo, mínimo e médio basal de FSH, superiores nos animais tratados com EPE em relação ao controle foram atribuídos ao fornecimento do FSH exógeno. Nos grupos EPE-20 e 23, as diferenças com relação ao controle foram também detectadas quanto ao número de flutuações presentes nestes grupos, enquanto o controle foi caracterizado por diminuição progressiva das concentrações ao longo do tempo, sem flutuações significantes na maioria dos animais. A elevação e manutenção da concentração do FSH superior ao controle após o início dos tratamentos está relacionada ao efeito cumulativo do FSH exógeno, pois segundo Briant et al (2004), o tempo de permanência da molécula de FSH circulante após a injeção de EPE na égua varia de 5,5 a 10,8 horas e é dependente da dose utilizada.

A elevação detectada após o início do tratamento nos animais dos grupos EPE-13 e EPE-20 foi atribuída ao fornecimento de FSH exógeno e a leve diminuição mesmo durante o tratamento; observada nesses grupos (Fig. 3A e 4A). A mensuração do referido hormônio corresponde à somatória da concentração exógena e endógena, a qual segue perfil de queda por influência do folículo dominante como pode ser observado no controle. Este fato pode ter contribuído para a redução observada, porém as concentrações mantiveram-se superiores nestes grupos em relação ao controle.

As causas que levaram a redução progressiva observada pré-tratamento nos grupos EPE-23 e EPE-26 foram similares às mesmas já descritas para o controle. Uma vez iniciado o tratamento, foi observado aumento das concentrações de FSH em ambos os grupos, sem que fosse detectada redução durante o tratamento. A ausência de diminuição no perfil de FSH ao longo do

tratamento nestes grupos (Figs 5A e 6A) pode ser atribuída às baixas concentrações endógenas já presentes no início do tratamento.

Em todos os grupos a concentração de FSH, observada pós-tratamento, levou aproximadamente 36 horas para atingir concentrações basais. A despeito do tempo de permanência da molécula na circulação, conforme citado por Briant et al (2004), foi necessário maior tempo para atingir concentrações endógenas semelhantes ao controle neste estudo.

Independente do perfil endógeno de FSH observado antes do início da administração de EPE, o número de folículos ≥ 30 mm e ovulações não diferiram entre os grupos tratados. No entanto, quando o tratamento iniciou-se no momento ou imediatamente após o desvio esperado, a resposta ovariana foi superior ao controle, demonstrando que o FSH exógeno estimulou o desenvolvimento de folículos destinados à regressão resultando em múltiplas ovulações. A retomada do desenvolvimento por folículos destinados a regressão foi demonstrada experimentalmente através da remoção do maior folículo no momento esperado do desvio, observando-se o crescimento do folículo F2 que assume a dominância chegando à ovulação (Ginther et al., 2002; Gastal et al., 1999b).

Quando se iniciou o tratamento depois de estabelecida dominância, em 40% dos ciclos estrais foi detectada dupla ovulação, refletindo na resposta ovariana menos expressiva que os demais tratamentos, sendo similares ao controle. Dentre as éguas que apresentaram dupla ovulação, dois ciclos foram provenientes da mesma égua e em ambos, os folículos F2 responderam ao hCG com diâmetros de 28 e 29 mm, indicando que a estimulação com EPE pode ter favorecido a resposta, apesar do pequeno diâmetro destes folículos. Outro animal apresentou apenas 3 mm de diferença entre os folículos F1 e F2 no momento em que se iniciou o tratamento resultando em dupla ovulação. O resgate do F2 pelo tratamento foi atribuído à pequena diferença em diâmetro entre F1 e F2.

Estes resultados indicam que o fornecimento de FSH exógeno depois de estabelecida a dominância não foi capaz de estimular satisfatoriamente o desenvolvimento dos subordinados. Fato que deve ser levado em consideração para se iniciar um tratamento superovulatório em éguas.

Avaliando-se a população folicular ao início dos tratamentos no presente estudo, observou-se um coeficiente de regressão negativo para o número de folículos $<10\text{mm}$ com relação ao número médio de folículos $\geq 30\text{mm}$ e ovulações no final do tratamento demonstrando uma relação inversa entre a presença de folículos dentro desta categoria folicular e a resposta ovariana. Tal observação pode ser atribuída à condição de regressão dos folículos menores nos diferentes momentos em que se iniciou o tratamento. Vale salientar que o número de folículos $<10\text{mm}$ foi similar entre os grupos, sugerindo não ser apenas a quantidade de folículos responsável pela resposta, mas também aspectos relacionados à diferença de diâmetro entre folículos desta categoria e o maior folículo presente ao início do tratamento, bem como os efeitos sofridos por estes folículos menores mediante o estabelecimento da dominância. Neste mesmo contexto, a relação entre a população de folículos na categoria 10-19mm e a resposta ovariana, foi representada por uma influência positiva no número de folículos $>30\text{mm}$ ($p<0,05$) e tendência quanto ao número de ovulações observadas ($p=0,07$).

O número de folículos de 10-19mm foi similar entre os grupos, tal população parece apresentar uma diferença menor em diâmetro com relação ao diâmetro do maior folículo no início do tratamento, principalmente quando este iniciou -se ao redor do desvio, sendo esta diferença mais exacerbada com relação ao maior folículo no EPE-26. A homogeneidade quanto ao diâmetro presente entre os folículos submetidos ao estímulo iniciado ao redor do desvio, pode ter favorecido o resultado de 64% e 75% de ciclos com múltiplas ovulações no EPE-20 e EPE-23, respectivamente. Vale salientar que muitos destes folículos ao início dos tratamentos poderiam estar em desenvolvimento, especialmente ao redor ou anterior ao desvio.

A população folicular ao início do tratamento tem sido apontada como fator importante para o critério de seleção das éguas doadoras com maior probabilidade de responderem satisfatoriamente ao tratamento superovulatório. Squires et al (2006) encontram maior número de folículos entre 11-15 e 16-20 ao início do tratamento nas éguas consideradas boas doadoras no que diz respeito ao número médio de embriões coletados quando comparadas às más doadoras. Isto indica que os folículos destas categorias possivelmente responderam ao tratamento, e estando em maior quantidade levaram a

otimização da resposta superovulatória, estes dados corroboram com os resultados deste estudo.

O número de folículos $\geq 30\text{mm}$ ($1,91 \pm 0,23$) e de ovulações ($1,99 \pm 0,21$) encontrados no presente trabalho foram de maneira geral, inferiores aos descritos em estudos que utilizaram a mesma dose de EPE, onde o número médio de ovulação variou de 2,9 a 3,6 (Scoggin et al, 2002; Machado et al 2004; Squires & Mc Cue P, 2007 ; Gomes; 2007).

Utilizando-se a mesma dose de eFSH (12,5mg duas vezes ao dia) com a interrupção do tratamento quando pelo menos a metade dos folículos apresentaram 32mm de diâmetro até a indução das ovulações com hCG, Welch et al (2006) obtiveram número de folículos $\geq 35\text{mm}$ ($4,7 \pm 1,9$) e número de ovulações ($4,6 \pm 2,1$) superiores aos obtidos no presente estudo. Esta baixa resposta ao tratamento com EPE pode estar relacionada ao procedimento de aspiração precedendo o tratamento.

Gastal et al (1997) obtiveram redução da população folicular em 50% ao utilizar a aspiração de todos os folículos $>5\text{mm}$ no D10 pós-ovulação, com relação ao controle não aspirado. A influência deste procedimento na limitação da população de folículos a serem posteriormente estimulados não foi determinada.

Não foi encontrado na literatura relatos de estudos utilizando a aspiração de todos os folículos $\geq 8\text{mm}$, precedendo o uso da superovulação em éguas, não sendo possível contrastar com o presente estudo, no que diz respeito à influência do procedimento na resposta superovulatória.

A supressão da atividade ovariana utilizando-se esteróides (progesterona + estradiol 17β) antes do tratamento com eFSH, não se mostrou efetiva em aumentar as taxas de ovulação nas éguas ($1,6 \pm 0,8$) quando comparadas a éguas sem prévio tratamento com esteróides ($2,5 \pm 1,5$) (Raz et al., 2005).

Recentemente, Logan et al (2007) encontraram menor número de folículos pré-ovulatórios e taxa de ovulação para éguas recebendo o mesmo pré-tratamento durante o estro ($3,4 \pm 0,7$ e $3,3 \pm 0,7$) ou diestro ($2,5 \pm 0,7$ e $2,5 \pm 0,6$) do que em éguas submetidas a um tratamento padrão ($6,1 \pm 0,5$ e $5,5 \pm 0,4$), não levando melhoria da resposta ao eFSH. A utilização da indução

de uma nova onda folicular através de métodos físicos como a aspiração folicular ou pelo uso de terapias hormonais a base de esteróides, não parece aumentar a resposta ovariana a superovulação com base nos resultados descritos na literatura e encontrados no presente estudo.

O número médio de embriões recuperados e a porcentagem de recuperação embrionária por ovulação não diferiram entre os tratamentos e o controle. A taxa de recuperação variou entre 52 e 73% sendo compatível aos 67,6% descrita por estudos utilizando a mesma dosagem de EPE (Scoggin et al., 2002). No tratamento EPE-20, embora o número de embriões recuperados por égua não tenha diferido do controle, obteve-se em média 1,4 embriões por coleta versus 0,7 do controle resultando na obtenção do dobro de embriões, este número foi compatível à média de 1,5 embriões por colheita obtidos por Squires et al, (2006) em éguas consideradas como boas doadoras. Segundo estes autores, a boa doadora é aquela que além de originar a média de embriões citados acima, apresenta maior número de folículos $\geq 35\text{mm}$ e número de ovulações ao final do tratamento quando comparadas àquelas com resposta insatisfatória. Salienta-se que neste estudo as melhores respostas em relação ao número de folículos maiores que 30 mm, ovulações e embriões recuperados, foram nos grupos em que se iniciou o tratamento quando o maior folículo da onda induzida atingiu diâmetro ≥ 20 ou $\geq 23\text{mm}$, indicando boa resposta ao iniciar-se o tratamento antes de estabelecida a dominância folicular, sendo comparáveis aos resultados obtidos em éguas consideradas como boas doadoras.

Em 23% das éguas tratadas não se obteve embriões no momento da coleta, esta proporção apresenta concordância com os dados de Squires et al, (2006) que não obteve embriões em 25% das éguas tratadas com eFSH. O autor atribui a alta porcentagem de coletas negativas, bem como o elevado número de embriões obtidos em determinados animais a grande variabilidade individual.

O intervalo entre a aspiração folicular e o início do tratamento variou nos diferentes grupos de acordo com o tempo necessário para que o maior folículo da onda induzida atingisse o diâmetro correspondente ao início do tratamento. A similaridade deste intervalo observada entre o EPE-23 e o EPE-26 pode ter sido influenciada pela variabilidade individual entre as éguas quanto ao tempo

necessário para a ocorrência da emergência da nova onda, bem como para o maior folículo atingir o diâmetro previamente estipulado para esses grupos.

A duração dos tratamentos convencionais utilizando-se duas doses diárias de 12,5mg de EPE ou eFSH, com início do tratamento no dia 5 ou 7 após ovulação e mantendo até que a maioria dos folículos 35mm, encontra-se ao redor de 8 dias (Scoggin et al., 2002; McCue et al., 2006) maior que o obtido neste trabalho.

A duração média de tratamento e conseqüentemente o número de administrações do extrato para os grupos EPE-23 e EPE-26 foi mais curta que nos demais grupos, não diferindo entre si. As poucas horas mais longas de tratamento e o pequeno número de administrações a mais realizada nas éguas do grupo EPE-26 em relação ao EPE-23, ocorreu possivelmente, devido ao aguardo para que folículos adicionais com diferença menor que 5mm do maior folículo atingisse 32mm (Tab.5). A diminuição do período de tratamento e número de administrações do extrato observado nos grupos EPE-23 e EPE-26 em relação aos demais grupos atende o aspecto prático e econômico da superovulação, especialmente no EPE-23, pois neste grupo observou-se número de ovulações mais expressivo, porém não refletiu na maior taxa de recuperação embrionária (Tab. 4 e 5). Neste contexto, outros fatores de interferência no índice de recuperação embrionária devem ser considerados.

As melhores respostas ovarianas observadas quando o tratamento teve início no momento em que o maior folículo atingiu diâmetro $\geq 20\text{mm}$ ou $\geq 23\text{mm}$, demonstram a capacidade dos folículos destinados a entrar em processo de atresia após a divergência, serem responsivos aos FSH exógeno contido no extrato, quando este foi administrado a partir do momento ou imediatamente após a divergência folicular esperada. Tal estratégia possibilita redução no período de tratamento, mantendo resposta ovulatória satisfatória e conseqüentemente redução de custo.

O intervalo entre o final do tratamento até a administração do hCG variou de 22 a 30 horas nos grupos tratados, sendo menores que os intervalos de 42 a 54 horas encontrados por Welch et al (2006) quando utilizou 12,5 ou 25mg de eFSH interrompendo o tratamento no momento em que a metade dos folículos atingiram diâmetro $\geq 32\text{mm}$ e a indução da ovulação realizada na presença de folículos $\geq 35\text{mm}$. Esta diferença pode estar relacionada à

concentração de LH presente no EPE, pois os folículos em crescimento dependem do LH a partir do desvio para maturação final e ovulação (Gastal et al, 2000). A hipótese sugerida necessita ser confirmada uma vez que o uso de “coasting” ao final do tratamento com EPE não é descrito na literatura.

8. CONCLUSÕES

O tratamento com EPE antes, durante ou após o desvio folicular esperado em onda induzida pela aspiração foi capaz de elevar e manter a concentração de FSH durante o tratamento.

O tratamento aumentou o número médio de folículos $\geq 30\text{mm}$ e de ovulações quando iniciado na presença de folículos com diâmetro médio entre 20 e 23mm em relação ao controle, embora não tenha influenciado na taxa de recuperação embrionária. No entanto, quando iniciado a partir da detecção do maior folículo atingindo 20mm, resultou no dobro de embriões recuperados por colheita com relação ao controle, demonstrando numericamente o benefício deste tratamento.

Quando se inicia a superovulação com folículos atingindo em média entre 20 a 23mm de diâmetro em onda induzida por aspiração folicular reduz-se o tempo de tratamento e conseqüentemente o número de administrações do hormônio mantendo-se resposta ovariana satisfatória.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN WR. Embryo transfer in the horse. In: Adams CE (ed). Mammalian Egg transfer. CRC Press. Boca Raton, FL p.135-154, 1982.

ALVARENGA MA, McCUE PM; FRANZ LC. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. *Theriogenology*, v. 51, n.1, p. 431, 1999.

ALVARENGA MA, McCUE PM, BRUEMMER J, NEVES NETO, SQUIRES EL. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*, v. 56, p. 879 - 887, 2001.

BARACALDO MI, MARTINEZ MF, ADAMS GP, MAPLETOFT RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, v. 53, p.1239-1250, 2000.

BERGFELT DR, GINTHER OJ. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology*. v. 24,p. 99-108., 1985.

BERGFELT DR, GINTHER OJ. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v. 39, p. 781 - 796, 1993.

BERGFELT DR, BO GA, MAPLETOFT RJ, ADAMS GP. Superovulatory response following ablation - induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci*, v. 49, p.1 -12, 1997.

BERGFELT DR, ADAMS GP. Ovulation synchrony after follicle ablation in mares. *J Reprod Fertil, Suppl*, v. 56, p. 257- 269, 2000.

BERGFELT DR, GASTAL EL, GINTHER OJ. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biol Reprod**, v. 65, p. 426-432, 2001.

BERGFELT DR, MEIRA C, FLEURY JJ, FLEURY PDC, DELL'AQUA JA, ADAMS GP. Ovulation synchrony following commercial application of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 68, p.1183 -1191, 2007.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p 31 - 40, 1995.

BOGH, I.B.; BRINK, P, JENSEN HE, LEHN-JENSEN H, GREVE T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Veterinary Journal*, v. 35, n. 6, p. 575-579, 2003.

BRIANT C, BLANC M, DAELS P, GUILLAUME D. Effect of passive and specific immunization against inhibin in pony mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 493 Abst, 2000.

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

BRIDGES TS, DAVIDSON TR, CHAMBERLAIN CS, GEISERT RD, SPICER LJ. Changes in follicular fluid steroids; insulin- like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentrations and proteolytic activity during equine follicular development. **J Anim Sci**, v.80. p-179-190, 2002.

BURATINI J, ROSA E SILVA, AA, BARROS CM, PAPA FO, CALDAS MC, MEIRA C. Follicular dynamics in Mangalarga mares. **Equine Vet J, Suppl** 25, p. 7 -11,1997.

CARMO MT, TRINQUE CLN, LIMA MM, MEDEIROS ASL, ALVARENGA MA. Estudos 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, p. 252 - 254, 2002.

CARMO MT, LOSINO L, AGUILAR JJ, ARAÚJO GHM, ALVARENGA MA. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Anim Reprod Sci**, v. 94, p. 337 - 399, 2006.

CARMO TM. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas. (2003). p.156. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Julio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

CHANNING CP, BATTA SK, CONDON W, GANJAM VK, KENNEY RM. Levels of inhibin activity and na atretogenic factor(s) in follicular fluid harvested from viable and atretic mare follicles . In: Schwartz NB, Hunzicker-Dum M (eds), Dynamics of ovarian function. New York: Raven Press; 1981: 73-78.

CLIFTON DK, STAINER RA. Cycle detection: A technique for estimating the frequency and amplitude of episodic fluctuations in blood hormones and substrate concentrations. **Endocrinol**, v.112, p. 1057-1064, 1983.

COY RE, MC CUE PM, BRUEMMER JE, SQUIRES EL. Follicular response of mares in deep or transitional anestrus to equine pituitary extract. In: *Proccedings of the 16th Equine Nutrition and Physiology Symposium*. p. 200 – 201, 1999.

DIPPERT KD, HOFFERER S, PALMER E, JASCO DJ, SQUIRES EL. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GNRH analogue. **Theriogenology**, v. 3, p. 695 - 710, 1992.

DONADEU FX, GINTHER OJ. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. **Reproduction**, v.121, p.897 - 903, 2001.

DONADEU FX, GINTHER OJ. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol. Reprod.* V66, p. 1111-1118, 2002.

DONADEU FX, GINTHER OJ. Suppression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1423 -1434, 2003.

DUCHAMP G, BEZARD J, PALMER E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biol Reprod**, v.1, p.233-241, 1995.

FARINASSO A, BRANQUINHO, J A, RUMPF, R, ALVARENGA MA. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária eqüina (EPE) para indução de ovulações múltiplas em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Supl. 1, v 33, p. 135-138, 2005.

FORTUNE JE, KIMMICH TL. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. **Equine Vet J**, Suppl 15, p. 95 - 98, 1993.

FORTUNE, JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v. 50, p. 225 - 232, 1994.

GASTAL EL, GASTAL MO, BERGFELT DR, GINTHER OJ. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biol Reprod**, v. 57, p. 1320 -1327, 1997.

GASTAL EL, GASTAL MO, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Follicle deviation and intra-follicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biol Reprod**, v.61, p.31-39, 1999a.

GASTAL EL, GASTAL MO, GINTHER OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biol Reprod**, v. 61, p. 724-730, 1999b.

GASTAL EL, GASTAL MO, NOGUEIRA GP, BERGFELT DR, GINTHER OJ. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 925-940, 2000.

GASTAL EL, GASTAL MO; BEG MA, GINTHER OJ. Interrelationships among follicles during the common growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**, v. 128, p. 417-422, 2004.

GÉRARD N, MONGET P, Intrafollicular insulin- like growth factor binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. **Biol Reprod**, v. 58, p. 1508-1514, 1998.

GÉRARD N, DELPUECHI T, OXVIG C, OVERGAARD, MONGET P. Proteolytic degradation of IGF- binding protein (IGFBP-2) in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy associated plasma protein- A (Papp-A) and association with dominant but not subordinated follicles. **J. Endocrinol**, v.182, p. 457- 466, 2004.

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

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

GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v.55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER OJ, MEIRA C, BEG MA, AND BERGFELT DR. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biol Reprod**, v.67, p. 862 - 867, 2002.

GINTHER OJ, BERGFELT DR, BEG MA, MEIRA C AND KOT K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biol Reprod**, v. 70, p. 99 -105, 2004a.

GINTHER OJ, BEG MA, GASTAL MO, GASTAL EL. Follicle dynamics and selection in mares. **Anim Reprod**. v1, n1, p. 45-63, 2004b.

GOMES M G. Efeito da somatotrofina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatória e recuperação embrionária em éguas tratadas com extrato de pituitária equine (EPE). (2007) p. 42 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Julio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

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

HAYNA JT, MADILL S, ROSER JF, TROEDSSON, MHT. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. **Anim Reprod Sci**, v.94, p.355 - 356, 2006.

HINRICHS K, RAND WM, PALMER E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentration in the mare. **Biol Reprod**, v.44, p. 292 - 298, 1991.

IRVINE CHG, TURNER JE, ALEXANDER SL, SHAND N , van NOORDTS. Gonadotropin profiles and dioestrous pulsatile release patterns in mares as

determined by collection of jugular blood at 4h intervals throughout an oestrous cycle. **J Reprod Fertil**, V 113, p. 315- 322, 1998.

Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT. Effects of dominant follicle removal before superestimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. **Theriogenology** v 55 p. 937 – 945, 2001.

LOGAN NL, MC CUE PM, ALONSO MA, SQUIRES EL. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. **Anim Reprod Sci**, v.102, p. 48 - 55, 2007.

MACHADO MS, ARAUJO GHM, ROSER JF, ALVARENGA MA. Perfil hormonal de éguas superovuladas com FSH equino purificado. **Acta Scientiae Veterinariae** Supl 1, v. 33; p. 194, 2005.

MACHADO MS, CARMO MT, SQUIRES EL, ROSER JF, ALVARENGA MA. Follicular dynamic, superovulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract and equine FSH. (2004) In: *Proceedings of 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Rio de Janeiro, Havemeyer Found. Monogr. Ser. No14, p. 75 -76.

MACLELLAN LJ, CARNEVALE EM, COUTINHO DA SILVA MA, SCOGGIN CF, BRUEMMER JE, SQUIRES EL. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super- stimulated and non- stimulated mares. **Theriogenology**, v.58, p.911 - 919, 2002.

MCKINNON AO, BROWN RW, PASHEN RL, GREENWOOD PE, VASEY JR. Increased ovulation rates in mares after immunization against recombinant bovine inhibin α - subunit. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p.144-146, 1992.

McCUE PM, CARNEY NJ, HUGHES JP, RIVIER J, VALE W, LASLEY BL. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against and inhibin alpha- subunit fragment. **Theriogenology**, v.38, p. 823-831, 1992.

McCUE PM, LOGAN NL, ALONSO MA, SQUIRES EL. Superovulation of mares: Effects of eFSH treatment during consecutive or alternate cycles and as short-term therapy before follicle divergency. ***Anim Reprod Sci***, v. 94, p. 404 - 407, 2006.

MAPLETOFT RJ, STEWARD KB, ADAMS GP. Recent advances in the superovulation in cattle. ***Reprod Nutr Dev***, v. 42, p.601 - 611, 2002.

MEIRA C, HENRY M. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. ***J Reprod Fert, Suppl***, p.712 -713, 1991.

NAMBO Y, KANEKO H, NAGATA S, OIKAWA M, YOSHIHARA T, NAGAMINE N, WATANABE G, TAYA K. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. ***Theriogenology***, v. 50, p. 545 – 557, 1998.

NISWENDER KR, ALVARENGA MA, MC CUE PM, HARDY QP, SQUIRES EL. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). ***J Equine Vet Sci***, v.23, p.497 - 500, 2003.

NISWENDER KD, MC CUE PM, SQUIRES EL. Effects of purified equine follicle stimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mares. ***J Equine Vet Sci***, v. 24 p. 337 - 339, 2004.

NOGUEIRA GP. Follicle profile and plasma gonadotropin concentration in pubertal female ponies. ***Braz J Med Biol Res***, v. 37, p.1 - 9, 2004.

PERES KR,TRINQUE CLN, LIMA MM, DUARTE MP, DUARTE MCG, MEIRA C. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. ***Theriogenology*** v.57, n.1, p.558, 2002.

PERES KR, FERNANDES CB, SIQUEIRA-PYLES ESC, LEÃO KM, LANDIM-ALVARENGA FC, ALVARENGA MA, SQUIRES EL. Ovarian response of mares in transitional phase treated with equine FSH. (2004) In: *Proccedings of 6th*

International Symposium on Equine Embryo Transfer, Rio de Janeiro, Havemeyer Found. Monogr. Series, N° 14, p. 77-79.

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

RAZ T, SILVIA C, GREEN J, CORRIGAN M, CARD C. The effect of prostaglandin in early diestrus or progesterone and estradiol administration, on equine FSH treated donor mare embryo recovery and recipient pregnancy rate. (2005) In: *Proceedings of the 51 st Conference on Am. Assoc. Equine Pract*, p. 204 - 208.

RAZ T, GRAY A, HUNTER B, CARD C. Effect of equine follicle stimulating hormone (eFSH) on pregnancy rate and embryo development in mares. ***Anim Reprod Sci***, v. 94, p. 400 - 403, 2006.

ROCHA FILHO, AN; LOPES EP, ARAUJO GHM, ALVARENGA MA. Efeito de baixas doses de extrato de pituitária equina e FSH purificado equino nas taxas de ovulação e recuperação embrionária em éguas. ***Acta Scientiae Veterinariae***, Supl. 1, v. 33, p.196, 2005.

SCOGGIN CF, MEIRA C, MC CUE PM, CARNEVALE EM, NETT TM, SQUIRES EL. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cycle mares. ***Theriogenology***, v. 58, p. 151 - 164, 2002.

SQUIRES EL, GARCIA RH, GINTHER OJ, VOSS JL, SEIDEL GE JR. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. ***Theriogenology***, v. 26 p. 661 - 670, 1986.

SQUIRES EL, ROWLEY HR, NETT TM. Comparison of pulsatile versus constant release of GnRH for superovulation in mares. ***J Anim Sci***, Suppl.65, p. 391-392, 1989.

SQUIRES EL, McCUE PM, VANDERWALL D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.95 - 96, 1999.

SQUIRES EL, WELCH AS, DENNISTON DJ, BRUEMMER JE, McCUE PM. Evaluation of several eFSH treatments for superovulation in mares. *Theriogenology*, v. 64, p. 791 (Abstract), 2005.

SQUIRES EL, LOGAN NL, WELCH S, McCUE PM. Factors affecting the response to administration of equine FSH. *Anim Reprod Sci*, v. 94, p. 408 - 410, 2006.

SQUIRES EL, McCUE PM. Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, v. 99, p. 1 -8, 2007.

SPICER LJ, SANTIAGO CA, DAVIDISON TR, BRIDGES TS, CHAMNERLAIN CS. Follicular fluid concentrations of free insulin- like growth factor (IGF)- I during follicular development in mares. *Domest. Anim. Endocrinol.* V. 29, p. 573-581, 2005.

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

THOMPSON DL, MC NEILL DR, WIEST JJ, GEORGE RL, JONES LS, GARZA F. Secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in intact and ovariectomized mares in summer and winter. *J Anim Sci*, v. 64, p. 247-253, 1987.

WATSON ED, SERTICH PL. Effect of aspiration of follicular fluid on subsequent luteal function in the mare. *Theriogenology*, v.33, p. 1263 -1268, 1990.

WELCH AS, DENNISTON DJ, HUDSON JJ, BRUEMMER JE, McCUE PM, SQUIRES EL. Exogenous eFSH follicle coasting and hCG as a novel superovulation regime in mares. *J Equine Vet Sci*, v. 26, p. 262 - 270, 2006.

WOODS GL, GINTHER OJ. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. ***Theriogenology*** v.20, p. 347 - 355, 1983.