

MÁRCIO TEORO DO CARMO

**ESTUDO DO FLUIDO FOLICULAR, TRANSPORTE,
RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO DE OÓCITOS EM ÉGUAS
SUPEROVULADAS COM O EXTRATO DE PITUITÁRIA
EQÜINA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária área de Reprodução Animal

ORIENTADOR: PROF. DR . MARCO ANTONIO ALVARENGA
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. FERNANDA DA CRUZ LANDIM E ALVARENGA

BOTUCATU - SP

2007

Quem ler esta tese de Doutorado e a minha dissertação de Mestrado vai observar uma real cronologia do tema superovulação em eqüinos. Tema este árduo, porem fascinante a quem gosta e procura desafios. Desafios que nos são necessários, empolgantes e regozijam a nossa simples e humilde passagem por este mundo. Mundo este que é feito de sonhos e realidades, expectativas e perseverança, alegrias e decepções, vitórias e derrotas, mas que procuramos ser um de seus pilares para lhe sustentar. Contudo dizer palavras que não expressem o que eu sinto por tantas pessoas que contribuíram com a minha vida profissional e pessoal, seria algo insensato, entretanto como uma réplica do mestrado agradeço e dedico este momento a todos os pedreiros que me ajudaram a construir mais um degrau desta vida.

DEDICATÓRIA

A vida tem sons, que para a gente ouvir precisa aprender a começar de novo, é como tocar o mesmo violão e nele compor uma nova canção..... Dedico este momento a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, por me conceder a satisfação de transpor mais um obstáculo que nos é imposto durante a jornada da vida.

Dedico a meus pais Esmeraldo do Carmo e Maria Lúcia Teoro do Carmo por ter-me ajudado a caminhar e escrever a minha história. Dedico também a meus irmãos Cássio e Cristiane, a meu avô José Teoro, a meus sobrinhos Thiago e Felipe, e a meus cunhados Ricardo e Ana Rita.

Dedico à saudade da ausência de minha avó Maria Aparecida, que mesmo não estando mais no nosso convívio é e sempre será responsável por fazer parte de um dos mais belos capítulos da minha vida.

Dedico aos meus tios, Laura, Antônio Celso, Maria Zélia, Maria Teoro, aos primos e a todos que fazem parte de nossa família e a meus avós paternos (em memória), que ao simples gesto de carinho nos faz um grande ser humano.

Dedico a meus padrinhos Fernando Junqueira Meireles e Maria Imaculada do Carmo Junqueira Meireles por serem importantes protagonistas da minha personalidade e pelo entusiasmo e incentivo em conviver e trabalhar com a espécie eqüina.

A TODOS MEU MUITO OBRIGADO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Marco Antonio Alvarenga, por ter-me confiado e dado a oportunidade em realizar mais um desafio em que nos é imposto, pela sua amizade, competência e conhecimentos a mim transposto durante todos estes anos que foram de extrema importância no meu desenvolvimento.

A Professora Dra. Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, por sua co-orientação, amizade e conhecimentos transmitidos, sendo peça fundamental no desenrolo desta tese.

Aos Professores Dr. Luis Losinno e Dr. Javier Aguilar, por nos ter aberto diversas portas fundamentais para a execução do presente trabalho, pela convivência e troca de conhecimentos e costumes de um outro país (Argentina), formando uma aliança fundamental para a equideocultura da América do Sul. Aos Amigos Argentinos que foram fundamentais ao desenvolver parte do experimento, Ludunhas, Catalina, Caronila, Orácio, Nicolas, Juam Paplo Salomone, Victor Colombo, Turco, Marcelo e dentre outros.

A Mariana Thaís de Almeida pelo seu entusiasmo, sua alegria, sendo uma pessoa muito especial e competente.

A Fabiana e a Mere pela grande ajuda no procedimento da eletroforese e na dosagem de Óxido nítrico.

Ao Gustavo e a Carla pela grande amizade e companheirismo em ajudar desenvolver esta tese.

Ao José Victor pelo grande parceiro que é, e pelo vínculo que nos é dado com o posto de fomento de equideocultura de Colina-SP, e a todos os funcionários desta fundação.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal, Dr. Papa, Dr. João Carlos, Dr. Nereu, Dr. Sony, Dr. Meira, Dra. Eunice Oba, Dra. Denise Lopes e a todos os seus orientados.

Aos amigos de pós Graduação, Claudia, Antonio Silvio, José Dell'Aqua, Gabriel, Daniel, Heder, Bruna, Ieda, Liane, Viviane, Giovana, Guta, Cássia, Ian, Guta Alonso, Cely, João, Camila, Leandro, Lilian, Alexandre, Mosquito, Renato Vilem, Ana, Duroque, Bruno, Daniela, Fernanda, Gustavo Gomes.

Ao grande amigo Paulo (Panqueca) pela cumplicidade e lealdade, Marcelo Dell'Aqua, Manoela, Bruno, Lucas, Manoela, Chico Pupo, Chico Garcia e aos funcionários do Centro de Reprodução Horses (Gilson, Sergio e Hérique) pelo companheirismo e incentivo.

Aos eternos amigos Rogério Dibe, Digão, Mariani, Bolinha, Guto, Ricardo, Gustavo, Leo Carrara, Leo Baiano, Santista e aos mestres Dr. José Carlos Andrade Moura, Dr. Carlos Antonio C. Fernandes, Dr. Rubens Pais de Arruda.

A Dra. Janeth Roser, da Universidade da Califórnia – USA, pela disponibilidade da dosagem hormonal.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Miguel, Marquinho, Edílson, Márcio, Cristina, Dona Cida e Tico.

Aos Haras e Centro Hípico Agromen, pela oportunidade profissional, e aos médicos veterinários Cássio Luiz Nogueira Trinque, Marcelo Mandrá, Carlos Denipot e Alseu Bueno.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de estudo (processo FAPESP número 03/05045-0) e ao FRIGORÍFICO AIMAR (Argentina) pela disponibilidade no desenvolvimento do projeto.

Aos Residentes da área de Reprodução da FMVZ/UNESP - Botucatu.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	23
2. Objetivos	26
3. Revisão de literatura	28
3.1. Ovulações múltiplas espontâneas em éguas.....	29
3.2. Superovulação na espécie eqüina.....	32
3.3. Superovulação em ruminantes.....	52
3.4. Aspectos fisiológicos do ciclo estral em éguas.....	62
3.5. Controle endócrino do ciclo estral.....	64
3.6. Mecanismo de ovulação.....	66
3.6.1. Maturação folicular.....	66
3.6.1.1. Foliculogênese.....	66
3.6.1.2. Composição do fluido folicular.....	72
3.6.1.2.1. Oxido nítrico	73
3.6.1.2.2. Proteína do líquido folicular.....	76
3.6.1.3. Parâmetros para aferir a viabilidade do folículo ovariano.....	77
3.6.1.4. Processo da ovulação.....	78
3.6.1.5. Aquisição de receptores para LH.....	80
3.6.2. Maturação oocitária.....	82
3.6.2.1. Oogênese.....	86
3.6.2.2. Fatores que influenciam na maturação oocitária.....	88
3.6.2.3. Competência oocitária.....	90
3.7. Aspiração folicular.....	91
4. EXPERIMENTOS	101
4.1 Preparação do extrato de pituitária eqüina.....	101
4.2 EXPERIMENTO I	104
“ESTUDO DO TRANPORTE DO OÓCITO PARA O OVIDUTO DE ÉGUAS SUPEROVULADS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA”	
4.2.1. Material e métodos.....	104
4.2.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas.....	104
4.2.1.2 Animais.....	107
4.2.1.3 Monitorização das éguas.....	107
4.2.1.4 Análise estatística.....	110
4.2.2 Resultado.....	111
4.2.3 Discussão.....	118
4.3 EXPERIMENTO II	123
“EFEITO DA SUPEROVULAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS QUANDO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA- SONOGRAFIA”	
4.3.1 Material e métodos.....	124

4.3.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas.....	124
4.3.1.2 Animais.....	124
4.3.1.3 Obtenção de oócitos.....	124
4.3.1.4 Análise estatística.....	125
4.3.2 Resultados.....	126
4.3.3 Discussão.....	131
4.4 EXPERIMENTO III.....	135
“AVALIAÇÃO DO AMBIENTE FOLICULAR DE ÉGUAS SUPEROVULADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA”	
4.4.1 Material e métodos.....	136
4.4.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas.....	136
4.4.1.2 Animais.....	136
4.4.1.3 Obtenção do fluido folicular.....	136
4.4.1.4 Avaliação do fluido folicular.....	137
4.4.1.4.1 Dosagens hormonais.....	137
4.4.1.4.2 Concentração do óxido nítrico.....	138
4.4.1.4.3 Perfil eletroforético das proteínas do líquido folicular.....	138
4.4.1.5 Análise estatística.....	139
4.4.2 Resultado.....	140
4.4.2.1 Análise hormonal e de óxido nítrico intra-folicular.....	140
4.4.2.2 Perfil eletroforético das proteínas do fluido folicular.....	146
4.4.3 Discussão.....	151
4.5 EXPERIMENTO IV.....	157
“ESTUDO DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA DE ÉGUAS SUPEROVULADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA”	
4.5.1 Material e métodos.....	158
4.5.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas.....	158
4.5.1.2 Avaliação dos oócitos recuperados de folículos aspirados.....	158
4.5.1.2.1 Avaliação da maturação citoplasmática.....	158
4.5.1.2.2 Avaliação da maturação nuclear.....	159
A) Avaliação dos oócitos recuperados do oviduto.....	159
4.5.1.3 Análise estatística.....	160
4.5.2 Resultado.....	161
4.5.2.1 Avaliação ultraestrutural oocitária através da microscopia eletrônica.....	161
4.5.2.2 Avaliação ultra-estrutural oocitária por meio da microscopia confocal.....	170
4.5.3 Discussão.....	173
4.5.3.1 Maturação citoplasmática.....	173
4.5.3.2 Maturação nuclear.....	175
5. Conclusões.....	178
6. Considerações futuras.....	180
7. Referências bibliográficas.....	183
8. Apêndice.....	215

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
- Arom – Aromatase
- ASP – Aspiração
- B – Banda
- CCO – Complexo cumulus oócito
- CL – Corpo lúteo
- CLG – Célula lútea grande
- CLP – Célula lútea pequena
- Cont – Controle
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DPBS – *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*
- E2 – Estrógeno
- eGC – Gonadotrofina corionica eqüina
- EGF – Fator de crescimento epidermal
- Ep – Espaço perivitelíneo
- EPE – Extrato de Pituitária Eqüina
- FIV – Fertilização *in vitro*
- FOL – Folículo
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- FSHe – Hormônio folículo estimulante eqüino
- FSHp - Hormônio folículo estimulante suíno
- G – Complexo Golgi
- GC – Grânulo cortical
- GIFT – Transferência intra-falopiana de gametas
- GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
- hCG – Gonadotrofina corionica humana
- ICS – Injeção intracitoplasmático de espermatozoide
- IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina
- IGFBP – Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina
- IGF-I - Fator de crescimento semelhante a insulina I
- INB – Inibina
- IOD – Densidade óptica integrada

jc – Junção comunicante
L – Gota Lipídica
LH – Hormônio luteinizante
m – Mitocôndria
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MI – Metáfase I
MII – Metáfase II
MPF – Fator promotor de maturação
mv – microvilosidade
ND – Não Definido
NIH-FSH-S1 – *National Institut Health-FSH-S1*
NO – Óxido nítrico
NO₂ – Nitrito
NO₃ – Nitrato
OD – Ovário direito
OE – Ovário esquerdo
OOC - Oócito
OPU – Aspiração folicular orientada por ultra-som
P4 – Progesterona
PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}
PMSG – Gonadotrofina do soro da égua prenhe
REL – Retículo endoplasmático liso
RIA – Radioimunoensaio
RNA – Ácido ribonucléico
SO – Superovulação
Star – *Steroidogenia acure regulatory protein*
T – Testosterona
TO – Transferência de oócito
Ve1 – Vesícula recoberta
Ve2 – Vesícula lisa
VG – Vesícula germinativa
ZP – Zona pelúcida

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Média e desvio padrão das diferentes variáveis estudadas no grupo tratado com extrato de pituitária eqüina e controle.....	112
Tabela 02: Número de ovulações por ovário e de oócitos recuperados do oviduto de éguas do grupo controle.....	113
Tabela 03: Número de ovulações por ovário e de oócitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina.....	113
Tabela 04: Média e desvio padrão das diferentes variáveis avaliadas no experimento II do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina e do controle.....	127
Tabela 05: Número de ovulações e de oócitos aspirados de folículos de éguas do grupo controle.....	128
Tabela 06: Número de ovulações e de oócitos aspirados de folículos de éguas do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.....	129
Tabela 07: Média e erro padrão dos hormônios dosados no fluído folicular dos animais dos grupos controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina....	141
Tabela 08: Média e erro padrão por indivíduo dos hormônios dosados no fluido folicular dos animais do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina....	141
Tabela 09: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas encontradas nos diferentes folículos de éguas do grupo controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina.....	147
Tabela 10: Percentual de bandas protéicas no líquido folicular de éguas do grupo controle e superovulado.....	148
Tabela 11: Número e percentual de oócitos recuperados do oviduto de éguas do grupo controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina.....	170
Tabela 12: Resposta superovulatória e número de oócitos recuperados de folículos aspirados de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina.....	215
Tabela 13: Número de oócitos recuperados de folículos aspirados de éguas do grupo controle.....	216
Tabela 14: Resposta superovulatória e número de oócitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina.....	217
Tabela 15: Número de oócitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com solução fisiológica (controle).....	218
Tabela 16: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas encontradas nos diferentes folículos das éguas do Grupo Superovulado.....	219
Tabela 17: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas encontradas no folículo das éguas do Grupo Controle.....	220

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Procedimento em abatedouro de eqüino para extração da pituitária.	102
Figura 02: Esquema do tratamento superovulatório com extrato de pituitária eqüina.....	106
Figura 03: Animais alojados no frigorífico, os quais foram utilizados no experimento de transporte de oócito para o oviduto de éguas superovuladas.....	107
Figura 04: Éguas contidas para controle folicular nas dependências do Frigorífico AIMAR.....	108
Figura 05: Útero, ovários e oviduto de éguas superovuladas.....	109
Figura 06: Dissecção, lavagem do oviduto e procura do oócito.....	109
Figura 07: Oócitos e células do cumulus recuperados do oviduto de éguas superovuladas e controle.....	110
Figura 08: Número total de ovulações e oócitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina e grupo controle.....	114
Figura 09: Percentual de oócitos recuperados em relação ao número de ovulações.....	114
Figura 10: Resposta superovulatória de uma égua tratada com extrato de pituitária eqüina (4 folículos/4 corpos lúteos).....	115
Figura 11: Dissecção do ovário de uma égua superovulada (4 ovulações) com extrato de pituitária eqüina, demonstrando os corpos hemorrágicos.....	115
Figura 12: Presença de grande coágulo de sangue na fossa de ovulação de uma égua do grupo superovulado a qual apresentou 6 ovulações sendo 3 por ovário.....	116
Figura 13: Presença de pequeno coágulo de sangue na fossa de ovulação de uma égua do grupo superovulado a qual apresentou 2 ovulações sendo uma em cada ovário.....	116
Figura 14: Presença de pequeno coágulo de sangue na fossa de ovulação em duas éguas do grupo controle com diferente número de ovulações.....	117
Figura 15: Transdutor e guia de aspiração utilizado no experimento.....	125
Figura 16: Número total de folículos aspirados e de oócitos recuperados de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina e solução fisiológica.....	130
Figura 17: Valores médios da concentração de oxido nítrico (1), inibina (2), testosterona (3), estrógeno (4) e progesterona (5) do líquido folicular dos grupos controle (CONT) e superovulado (SO).....	142
Figura 18: Concentração de inibina, testosterona, estrógeno e progesterona do líquido folicular por animal do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.....	143
Figura 19: Eletroforese em poliacrilamida de proteínas do líquido folicular de éguas superovuladas. Canaleta 1, Marcador de Peso (10 a 250kda); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 10 são amostras do líquido folicular de éguas superovuladas.....	149

Figura 20: Eletroforese em poliacrilamida de proteínas do líquido folicular de éguas não superovuladas. Canaleta 1, Marcador de Peso Molecular (10 a 250kda); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 13 são amostras do líquido folicular de éguas não superovuladas.....	150
Figura 21: Oócitos recuperados do oviduto de éguas superovuladas com Extrato de Pituitária Eqüina.....	160
Figura 22: Aspecto geral do oócito de eqüino do grupo controle. Notar o grande número das gotas lipídicas (l) e mitocôndrias (m) e a presença de grânulos corticais (gc) distribuídos na região cortical.....	163
Figura 23: Detalhe da região cortical de um oócito do grupo controle, mostrando mitocôndrias (m) associadas a gotas de lipídeo (l) e ao retículo endoplasmático liso (rel).....	164
Figura 24: Detalhe da região cortical de um oócito do grupo controle mostrando a distribuição dos grânulos corticais (gc).....	165
Figura 25: Aspecto geral de um oócito superovulado de eqüino.....	166
Figura 26: Detalhe da região cortical de oócitos de eqüino superovulado, mostrando a presença de Golgi (G) bem desenvolvido e a metabolização de lipídeos (l). Notar a presença de vesículas recobertas (ve1) na face cis e vesículas lisas (ve2) na face trans do Golgi.....	167
Figura 27: Grânulos corticais (gc) associados a mitocôndrias, distribuídos pelo citoplasma de oócitos superovulados de eqüinos.....	168
Figura 28: Aspecto das junções celulares entre o oócito e as células da granulosa presentes nos oócitos superovulados.....	169
Figura 29: Número médio de oócitos recuperados em diferentes estágios de maturação do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.....	171
Figura 30: Percentual de oócitos recuperados em diferentes estágios de maturação grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.....	171
Figura 31: Percentual de oócitos em estágio de metáfase e de não definido em éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina.....	172
Figura 32: Oócitos avaliados através da microscopia confocal, apresentando o corpúsculo polar (1), placa metafásica I (2), placa metafásica II (3).....	172
Figura 33: Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13% de concentração no gel separador, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do líquido folicular de éguas superovulada e controle. Canaleta P, Marcador de Peso Molecular (Full molecular weight range, 10 a 250kDa, Amersham Biosciences).....	221

CARMO, M.T. Study of follicular fluid, transport, recovery and oocyte maturation in mares superovulated with equine pituitary extract. Botucatu, 2007. These (Doctor in Veterinary Medicine) Faculty of Veterinary Science – FMVZ/UNESP, campus of Botucatu - SP.

ABSTRACT

The equine female is considered a seasonal mono-ovulatory specie, which is a restrictive factor in respect to embryo production throughout the year. This limitation could be minimized if an efficient superovulatory response and consequent improvement of embryo production were possible. More recent protocols developed in our lab using EPE (equine pituitary extract) have allowed a good superovulatory response. However, the number of embryos recovered has been inferior to the number of ovulations detected due to unknown factors. The present study has the following objectives: Verify if the EPE treatment administered twice daily would alter the oocyte cytoplasmic and nuclear maturation; and to evaluate the follicular environment by measuring estradiol 17- β , testosterone, progesterone, inhibin and nitric oxide. The electrophoresis pattern of proteins in follicular fluid from superovulated and non- superovulated mares was determined. In addition, the oocyte transport through the oviduct was investigated. The present study was divided into four experiments. Experiment I: Study of oocyte transport to the oviduct in superovulated mares using equine pituitary extract. Experiment II: Effect of superovulation on oocyte recovery using transvaginal ultrasound guided follicular aspiration. Experiment III: Evaluation of follicular environment in superovulated mares. Experiment IV: Oocyte maturation in superovulated in mares using equine pituitary extract. Experiment I was performed at Rio Cuarto University, Argentina. In the related study, 22 mares aging from 3 to 12 years were used (9 control mares, 13 EPE treated mares). These mares were monitored daily by ultrasound until the presence of a follicle \geq 30mm in diameter, being then examined twice daily. The superovulation protocol used consisted in 25mg of EPE twice a day, intramuscularly, starting at day 7 post- ovulation. The treatment was ended when the majority of follicles reached 35mm, administering hCG (2500 UI,iv). The oviduct transport study had mares

submitted to slaughter from 12 to 24 hours after detection of first ovulation. The oviducts were then removed from the ovaries and uterus, being dissected and flushed using PBS. On experiment II, using the same superovulation protocol from experiment I, 24 mares were submitted to transvaginal ultrasound guided follicle aspiration being divided into two groups, superovulated (G1/n=12), and non-superovulated (G2/n=12) at 30h post induction of ovulation, which was performed when the majority of follicles reached 35mm in diameter. At experiment III, the same protocol from experiment II was used, with follicular fluid obtained from superovulated (G1/n=12), and non-superovulated mares (G2/n=12). In this experiment, intra-follicular hormone concentrations of inhibin, estrogen, progesterone and testosterone were determined besides the nitric oxide concentrations and protein electrophoresis pattern. At experiment IV, the cytoplasmic and nuclear oocyte maturation was evaluated by electronic and focal microscopy respectively. The Fisher exact test was used to compare the proportions, with 5% of significance followed by the Student t test. Anova and Student Newman Keuls test were used to compare hormonal concentrations among mares submitted to follicle aspiration considering 5% of significance. The mean number of ovulations/mare ($p < 0.05$) and the percentage of viable oocytes/ovulation recovered from the oviduct ($p = 0.07$) at experiment I was 1.22 and 90% for control group and 4.77 and 64% for superovulated group. The rate of oocyte recovered/ovulation was similar between treated and control groups in mares presenting less than 4 ovulations. A large blood coagulum was observed at the ovulation fossa in superovulated mare, which was not present in control mares. At experiment II, the mean number of follicles aspirated per mare was 1.0 and 4.75, and the percentage of oocyte recovered per aspirated follicle was 66% and 25% respectively in control and superovulated mares ($p > 0.05$). There was no statistical difference on hormonal concentrations and intra-follicular nitric oxide concentrations in experiment III. Although, a difference ($p < 0.05$) in estrogen, testosterone and inhibin concentrations among mares from superovulation group was detected. In the related experiment were also determined 30 protein bands in follicular fluid from superovulated mares and 24 bands from control mares; observing the constant absence of 6 bands in the control group. In experiment IV, from a total of 27 recovered oocytes from superovulate mare's oviducts,

40%(11/27) were in metaphase I, 15% in metaphase II(04/27) and 44% (12/27) were classified as non- defined (chromatin configuration non compatible with meiotic stage or non-visualization of chromatin). Ultra-structural alterations were observed in oocyte cytoplasmic maturation from superovulated mares when compared to control mares. In conclusion, an exacerbated number of ovulations in EPE treated mares alter the mechanism of oocyte transport to the oviduct. In addition, the superovulation treatment leads to modifications in the follicular environment and in the oocyte maturation.

Key words: superovulation in mare, equine pituitary extract, oocyte maturation, follicular aspiration, follicular fluid, oocyte transport.

1. INTRODUÇÃO

A atual conjuntura da criação de cavalos tem nos surpreendido com uma grande amplitude e diversificação das atividades eqüestres que esta espécie é capaz de desenvolver, lapidando assim a indústria eqüina, que hoje possui um importante papel sócio-econômico. A Confederação Nacional da Agricultura estima que a indústria do cavalo nacional empregue diretamente mais de um milhão de pessoas, pontuando o nosso país como o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, contendo mais de 6 milhões de animais. O interesse na aplicação de biotécnicas voltadas à reprodução eqüina vem se fomentando cada vez mais como ferramenta para acelerar o ganho genético e tornando nossos animais mais competitivos. Estas biotécnicas têm-se focado em obter melhores taxas de concepção de indivíduos portadores de subfertilidade de origem ou não hereditária, além de maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial genético.

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

Vários estudos têm relatado que a égua é refratária a todas as drogas rotineiramente utilizadas visando superovulação em outras espécies, como o FSH suíno e o eCG (McCue, 1996). O extrato de pituitária eqüina (EPE) e o FSH equino são os únicos compostos que consistentemente induzem ovulações múltiplas em éguas (Squires et al., 1999); contudo, a resposta superovulatória tem sido baixa (1-3 ovulações/égua) (McCue, 1996; Rosas, et al., 1998).

Estudos têm demonstrado uma melhora no percentual de ovulações múltiplas em éguas superovuladas com a administração do EPE duas vezes ao dia (4-7 ovulações/égua), entretanto com baixa taxa de recuperação embrionária (Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002; Carmo et al., 2002a; Carmo, 2003). Este fato pode estar relacionado a produção de oócitos de baixa qualidade, anormalidade na maturação folicular e oocitária, a falha do folículo em liberar o oócito e a captação do mesmo para o interior do oviduto, assim como alterações no trânsito deste ou do embrião pelo oviduto (Palmer et al., 1993; Dippert et al., 1994).

Em estudo mais recente, foi observado um maior número de recuperação embrionária (2 embriões/égua) com o uso da administração de doses decrescentes

de extrato de pituitária eqüina, quando comparado com a administração em doses constantes (1,2 embriões/égua) (Carmo, 2003). O mesmo foi observado em vacas (Monniaux et al., 1983) e em Hamsters (Carmo et al., 2001, Carmo, 2003), sendo sugerido pelos autores um estudo mais profundo da maturação folicular e oocitária no processo de superovulação.

Contudo, as respostas para as várias questões levantadas a respeito das baixas taxas das recuperações embrionárias em éguas superovuladas ainda continuam obscuras, fazendo-se necessários mais estudos, iniciando-se pelo gameta feminino e o ambiente em que este se desenvolve.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou:

Determinar as razões da baixa taxa de recuperação de embriões em éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina.

Avaliar o transporte dos oócitos para o oviduto correlacionando o número de oócitos presentes no oviduto com o número de folículos ovulados em éguas superovuladas e não superovuladas com extrato de pituitária eqüina.

Avaliar o efeito da superovulação com extrato de pituitária eqüina na recuperação de oócitos quando da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia.

Avaliar os níveis de 17β -estradiol, testosterona, progesterona, inibina e óxido nítrico, bem como o perfil eletroforético de proteínas no fluido folicular entre éguas superovuladas e não superovuladas com extrato de pituitária eqüina.

Verificar se o tratamento superovulatório com o extrato de pituitária eqüina altera a maturação nuclear e citoplasmática do oócito.

Verificar a maturação nuclear e citoplasmática bem como integridade estrutural dos oócitos recuperados de éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Ovulações múltiplas espontâneas em éguas

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

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

Pascoe et al. (1987), avaliaram 1.015 éguas de raças européias e PSI, concluíram que 38,2% das ovulações múltiplas evoluíram para gestações gemelares. Sertich (1989) relatou que a incidência de múltiplas ovulações em éguas de raças européias tem uma maior prevalência (55,9%), quando comparado com raças americanas (8% a 9%). Já na raça crioula, Pimentel et al. (1994), observaram uma incidência de múltiplas ovulações de 7,1%, sendo que, 6,5% de dupla ovulação, 0,5% de tripla ovulação e 0,1% de quádrupla ovulação.

Trinque et al. (1997), relataram na raça Brasileiro de Hipismo, um caso de quádrupla ovulação, havendo a recuperação de dois blastocistos expandidos, um blastocisto inicial e um oócito em uma única colheita de embrião, resultando em três prenhes e três partições. Entretanto, há uma maior incidência de ovulações duplas do que tripla ou quádrupla, segundo relato de Hughes et al. (1972), onde foram observados 99% de ovulações duplas e 1% de ovulações triplas e quádrupla.

Um total de 829 ciclos em éguas da raça Brasileiro de Hipismo (BH) foi avaliado por Carmo et al. (2002a), tendo sido detectados 390 (47%), 360 (43%) e

79 (10%) ciclos com ovulações simples, duplas e triplas, respectivamente, e um total de 617 embriões recuperados, sendo 230, 306 e 81 embriões provenientes de ovulações simples, duplas e triplas respectivamente. Carmo, et al. (2004) relatam uma alta incidência de ovulações múltiplas em éguas da raça BH (53%).

A frequência de ovulações múltiplas unilaterais e bilaterais tem sido motivo de estudo por alguns pesquisadores. Em um levantamento realizado por Ginther & Pierson (1989), não notaram diferença significativa entre as incidências uni ou bilateral, o mesmo sendo relatado por Squires et al., (1987a) com 49,7% e 50,3% respectivamente e por Carmo et al. (2002b) com 53% ovulações unilaterais e 47% ovulações bilaterais. Duarte (2003), relatou uma maior incidência significativa de ovulações múltiplas unilaterais do que bilaterais.

Riera et al. (2006) avaliaram 1.300 ciclos com ovulação duplas de éguas da raça Polo Argentino, e observaram um percentual de ovulações unilaterais e bilaterais de 54% e 66%, respectivamente e um percentual de recuperações de dois embriões de 35% e 48%, respectivamente ($p < 0,001$). Quanto à recuperação de um embrião não houve diferença estatística (35 e 37%, respectivamente). Estes autores relataram não haver diferença no percentual de prenhez de embriões recuperados de ovulações unilaterais (63%) e ovulações bilaterais (64%).

Quanto ao tempo de ocorrência entre as ovulações múltiplas tem-se observado que a maioria dessas ocorre sincronicamente, apresentando 75% das ovulações entre as primeiras 24h; 15% entre 48h e 10% após às 48h (Hughes et al., 1972). Ginther (1987) relatou que 55% das ovulações múltiplas são simultâneas, ou seja ocorrem ao mesmo tempo, 33% em 24h, 9% em 48h e 3% em até 62h, o mesmo sendo observado por Duarte (2003), com 62% das ovulações sincrônica e 53% não sincrônica. Em um estudo com éguas superovuladas, Carmo (2003) observou um sincronismo de 24h entre as ovulações.

Quanto ao sincronismo entre as ovulações duplas unilaterais e bilaterais, Henry et al. (1982) relataram em um estudo envolvendo 209 ovulações duplas, um maior sincronismo entre as ovulações bilaterais do que em unilaterais. Duarte

(2003) observou que nas ovulações duplas bilaterais a porcentagem de gestações gemelares foi superior (61,8%) às unilaterais (28,4%).

A incidência de ovulações múltiplas pode estar relacionada a fatores genéticos (raça), hereditários, nutricional (dieta rica em energia) e relacionado com a idade da égua (18% entre 6 a 10 anos, e 14% entre 2 a 5 anos) (Warszawsky et al., 1972; Henry et al., 1982; Ginther, 1992). Ginther & Douglas (1982) encontraram maior incidência de ovulações múltiplas espontâneas em éguas solteiras do que em éguas paridas com potro, hipotetizando haver um efeito estressante do potro no período da amamentação.

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

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

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

Squires et al. (1987b) relatam um aumento na concentração de progesterona circulante em ovulações duplas naturais ou induzidas, porém os níveis são menores do que o dobro das ovulações simples. Não há alteração

sobre a duração do estro, diestro e do ciclo estral em éguas com ovulações múltiplas (Ginther & Pierson, 1989).

O aumento do número de ovulações é desejável para fins de programa de transferência de embriões, elevando o percentual de embriões recuperados por éguas. Contudo, é preocupante no que diz respeito ao manejo reprodutivo, pois gestações gemelares são indesejáveis na espécie eqüina (Carmo et al., 2002a).

3.2. Superovulação na espécie eqüina

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

A transferência de embriões, visa elevar potencialmente o nível genético da progênie (Meira & Buratini, 1998), porém é uma biotécnica que requer investimentos, principalmente no que diz respeito às éguas receptoras pelo fato destas terem que esperar vários ciclos para receberem o embrião (Squires & Seidel, 1995).

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

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

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

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

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

Para se ter idéia desta baixa resposta ovariana das éguas aos hormônios gonadotróficos, Douglas (1979) induziu a superovulação em éguas com a gonadotrofina eqüina (Pitropin[®]), resultando em uma taxa de 2,3 ovulações, porém em um outro experimento, o mesmo preparado foi capaz de induzir, aproximadamente, 30 ovulações em vacas (apud Andrade, 1986).

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

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

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

de ovulações (750, 1500 e 2250 Fovold unit/2,7 ovulações/éguas) (Woods & Ginther, 1983).

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

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

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

O GnRH também tem sido estudado na tentativa de melhorar a resposta superovulatória em éguas, obtendo um melhor resultado no período de anestro, em decorrência da presença do pico de FSH em resposta a sua administração (McCue, 1996). Johnson & Becker (1988), relataram a indução de ovulações múltiplas com o uso de GnRH em éguas no período de anestro, obtendo uma

média de 1,3; 2,9 e 3,5 ovulações, utilizando uma dosagem farmacológica de 2, 20 e 100µg de GnRH/hora, respectivamente, através de uma “bomba de GnRH”, por um período médio de 11,4 dias. Já em éguas cíclicas, não houve sucesso na indução de ovulações múltiplas, devido ao efeito de feedback negativo para a liberação de FSH, ou seja, a inibina secretada pelos folículos em desenvolvimento impedem a liberação do FSH, que bloqueia o crescimento de pequenos folículos da onda folicular (McCue, 1996).

Algumas tentativas supressoras de inibina têm sido estudadas, com o intuito de impedir o seu efeito (Mckinnon et al., 1992), através da imunoneutralização de inibina, que consiste na utilização de fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade α , o que promove o bloqueio do mecanismo de feedback negativo da liberação de FSH, permitindo a elevação dos níveis de FSH endógeno durante a fase folicular (McCue, 1996).

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

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

Douglas (1979) também relatou um baixo percentual de embriões recuperados por ovulações em éguas tratadas com EPE (35%) quando

comparado com as ovulações simples não tratadas (67%). Squires et al. (1987b) entretanto, não observaram diferença no percentual de embriões recuperados entre éguas superovuladas com EPE (54%) e éguas controle não superovuladas (55%).

Ainda não está claro, se a baixa recuperação de embriões de éguas superovuladas ocorre devido à deficiência no desenvolvimento folicular (Dippert et al., 1994), na falha do folículo em liberar o oócito no momento da ovulação (Palmer et al., 1993), na produção de oócitos de baixa qualidade ou na falha da captação dos oócitos para o interior do oviduto (Palmer et al., 1993; Dippert et al., 1994). Dippert et al. (1994) também sugerem que o tratamento superovulatório pode alterar o tempo normal do trânsito dos embriões através do oviduto.

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

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

Tem sido sugerido, que embriões oriundos de animais submetidos ao tratamento superovulatório são menos competentes ao desenvolvimento, que embriões de animais não superovulados (Elsden et al., 1976; Woods & Ginther, 1984; Hyttel et al., 1991). Woods & Ginther (1984), relataram baixo sucesso na taxa de prenhez, decorrente de embriões transferidos de éguas com ovulações múltiplas (11/21) do que éguas com ovulações simples (7/8). Elsden et al. (1976)

demonstraram que a taxa de prenhez foi ligeiramente superior para embriões de vacas não superovuladas, do que as vacas superovuladas (89% e 70%, respectivamente).

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

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

Hyttel et al. (1991) relataram que 37% dos oócitos recuperados de vacas superovuladas sofrem maturação anormal comparado com apenas 11% em vacas não superovuladas. Trinque et al. (1997) relataram três prenhez oriundas da colheita de três embriões de uma quádrupla ovulação.

Em um outro estudo, foi realizada uma análise ultra-estrutural de embriões de éguas superovuladas e não superovuladas, sendo observado 95% de células viáveis para o grupo superovulado e 90% para o grupo não superovulado (Landim-Alvarenga et al., 2004). Estes autores concluíram que embriões de éguas superovuladas têm a mesma viabilidade de embriões de éguas não superovuladas, já que o teste de fertilidade resultou em 66% de prenhez para embriões transferidos de éguas superovuladas.

Quanto ao período de retorno do cio pós-superovulação (17,99 e 15,04 dias para as éguas superovuladas e não superovuladas) e a duração do estro (5,9 e 7,5 dias para as éguas superovuladas e não superovuladas) não há influência

sobre a variável superovulatória (Douglas, 1979). Rosa et al. (1998) relataram que éguas superovuladas com EPE e com o EPE purificado permaneceram 6,6 e 7,0 dias em estro, respectivamente e éguas do grupo não tratado 7,0 dias do ciclo estral em estro, sendo o mesmo observado por Carmo (2003).

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

Em 1974 foi publicado primeiro relato de uma indução de superovulação com sucesso em éguas, por Douglas et al. (1974). Os autores induziram a superestimulação ovariana com EPE parcialmente purificado em duas administrações ao dia, de doses constantes por 14 dias consecutivos, em 29 éguas pôneis em sazonalidade anovulatória. Os resultados mostraram, que 25 (86%) das éguas tratadas obtiveram resposta a ativação ovariana, ocorrendo uma ou mais ovulações, e quatro (14%) éguas continuaram apresentando inatividade ovariana. Das éguas pôneis que ovularam, 58% apresentaram duas ou mais ovulações.

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

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

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

Douglas (1979) tratou oito éguas cíclicas com EPE, administrando uma dose diária de 750 Fevold-Hisaw rat-units, via subcutânea durante os dias 14 e 20 pós-ovulação. Foram utilizados 4.000UI de hCG via subcutânea no último dia do tratamento superovulatório. A dose administrada e o dia em que se iniciou o tratamento superovulatório, foram baseados em resultados preliminares, entre as doses diárias de 475 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 6-12 pós-ovulação, 750 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 10-16 pós-ovulação, 475 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 12-18 pós-ovulação e 750 Fevold-Hisaw rat-units durante os dias 14-20 pós-ovulação.

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

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

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

Woods & Ginther (1983) relataram que a administração ou não do hCG, não tem influência nas taxas de ovulações, porém o assincronismo entre as ovulações é significativamente reduzido com a administração do hCG ($0,0 \pm 0,0$ e $1,4 \pm 0,4$ dia, respectivamente), ou seja, as ovulações múltiplas ocorreram no mesmo dia em 10/10 éguas tratadas com hCG comparado com 3/12 éguas não tratadas. Dippert et al. (1994), descrevem que em éguas superovuladas, o intervalo entre a 1^o e a última ovulação é menor quando tratadas com hCG antes da 1^o ovulação (0,0 dia) do que éguas tratadas após 1^o ovulação (1,8 dias).

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

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

Squires et al. (1987b) verificaram o efeito do extrato de pituitária na indução das ovulações múltiplas e na recuperação de embriões em 28 éguas cíclicas. Foi administrada uma dose diária de 750 Fevold Rat unit em uma única administração, iniciando o tratamento no 12^o dia do ciclo estral e terminando quando dois ou mais folículos atingiram um diâmetro de 35mm. Após o término do tratamento, foram

administradas 3.300UI de hCG via endovenosa e realizadas as inseminações artificiais diariamente com 250×10^6 de espermatozoides móveis, até o desencadear das ovulações. Os resultados apresentaram uma média de 3,8 ovulações/égua (26/28 éguas) e 2,0 embriões recuperados no grupo superovulado, contra 1,2 ovulações/égua (5/40 éguas) e 0,65 embriões recuperados para o grupo controle (não superovulado). Obteve um sincronismo inter-ovulatório de "0" (zero) dias em 84% das éguas, e 1 a 2 dias em 16% das éguas tratadas. O período médio da administração do EPE foi de 5,5 dias. Neste mesmo experimento, foi relatado que quanto maior o número de corpos lúteos, maior é o nível de progesterona, visto que, durante um período de sete dias pós-ovulação foram coletadas amostras de sangue para a dosagem de P4, obtendo uma média significativa para éguas com ovulações duplas ($55,2 \pm 10,2\text{ng}$) em relação às de ovulações simples ($44,6 \pm 11,4\text{ng}$).

O diâmetro médio dos embriões coletados desse trabalho foi similar entre os grupos superovulados e controle quando as colheitas foram realizadas no 6º dia pós-ovulação (0,177 e 0,213mm, respectivamente), porém quando os embriões foram coletados no 8º dia pós-ovulação os embriões das éguas superovuladas apresentavam-se menores do que os das éguas do grupo controle (0,567 e 0,903, respectivamente). Apesar das variações entre os diâmetros dos embriões coletados em diferentes tratamentos e períodos, foi relatado que todos foram viáveis a serem transferidos (Squires et al., 1987b).

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

A supressão do desenvolvimento folicular antes do tratamento superovulatório tem sido investigada, com o intuito de identificar o dia da seleção do folículo ovulatório (Pierson & Ginther, 1990). Neste experimento, os autores utilizaram 36 éguas em fase cíclica, subdivididas em quatro grupos, em relação ao

diâmetro folicular (15mm; 20mm; 25mm; 30mm). As éguas foram avaliadas pela ultra-sonografia transretal, onde ao ser observado um corpo lúteo, foi administrado 10mg de PGF_{2α} e mantida com a administração diária de estrógeno (10mg) e progesterona (150mg) por um período máximo de 10 dias. O término da administração do estrógeno e da prostaglandina, e o início do tratamento superovulatório com EPE, foram adequados em relação ao diâmetro dos folículos presentes (15mm; 20mm; 25mm; 30mm). A dose diária administrada do EPE foi de 750 Fevolt – Hishow rat units por via subcutânea, sendo previamente filtrada com o auxílio de um microfiltro de 0,22µm. O tratamento superovulatório foi encerrado quando a maioria dos folículos apresentou 35mm de diâmetro ou quando ocorreu uma ovulação.

Os resultados deste experimento demonstraram que o tempo médio entre o final do tratamento com estrógeno mais progesterona e o início da administração do EPE em relação aos grupos (15mm; 20mm; 25mm e 30mm), foi de 1,3; 5,8; 7,7 e 11,0 dias, respectivamente; o período médio de tratamento com EPE foi de 8,7; 6,3; 3,2 e 1,7 dia, respectivamente, e o número médio de folículos >30mm foram de 2,5; 2,2; 1,2 e 0,8 folículos, respectivamente. Os autores observaram em um grupo de éguas com apenas a administração do estrógeno mais progesterona, que o número médio de folículos >30mm, foram iguais aos das éguas superovuladas do grupo 30mm (0,8 folículo). Ocorreram ovulações de folículos apresentando um diâmetro menor que 30mm (uma égua no grupo 20mm; duas éguas no grupo 25mm; e duas éguas no grupo 30mm) (Pierson & Ginther, 1990).

Uma melhor resposta superovulatória foi observada por Carmo (2003) em éguas que apresentaram folículos entre 10 e 20mm no início do tratamento, sendo semelhante ao observado por Pierson & Ginther (1990) que relataram quanto maiores forem as diferenças entre o diâmetro dos dois maiores folículos no início do tratamento superovulatório com EPE, menor vai ser a resposta superovulatória.

Um achado importante discutido por Carmo (2003), é pelo fato do percentual de ovulações entre os folículos de 10 a 20mm ter sido maior para o grupo tratado em dose decrescente (61%) que em dose constante (47%). Este pode ter relação com o desenvolvimento e a maturação folicular, por haver a

necessidade de um maior nível de FSH no início do tratamento superovulatório do que no final do mesmo, como observado por Ginther et al. (1996) em vacas. Monniaux et al. (1983) também relataram uma melhor resposta superovulatória em vacas, quando foram realizadas as administrações em doses decrescentes de um produto com altos níveis de LH em seu composto, atribuindo-se ao propósito da necessidade de um maior nível de FSH no início do tratamento superovulatório de que no final do mesmo.

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

Em um estudo mais recente, foi averiguado qual o melhor momento para se iniciar o tratamento superovulatório com EPE em éguas cíclicas (Orlandi et al., 2006). Estes autores aspiraram todos os folículos ≥ 8 mm ao 10^o dia pós-ovulação e iniciaram o tratamento com EPE (12,5mg, IM a cada 12h) segundo os grupos: 1) folículos 13mm (EPE); 2) folículos 20mm (EPE); 3) folículos 23mm (EPE); 4) folículos 26mm (EPE); 5) folículos 13mm (solução fisiológica). Doze horas após o início do tratamento, foi administrado 7,5mg de PGF_{2 α} , e quando a maioria dos folículos atingiu 32mm o tratamento foi interrompido e ao atingirem 35mm de diâmetro foi induzida a ovulação com 2.500UI hCG. Os resultados obtidos neste experimento para os grupos 1, 2, 3, 4 e 5 foram: número de folículos ≥ 30 mm 1,6; 1,8; 2,1; 1,2; 1,1, respectivamente aos grupos; número de ovulações 1,6; 1,8; 2,1; 1,2; 1,1, respectivamente.

As proporções de éguas com ≥ 2 ovulações desse experimento foram: 50%; 60%; 71%; 16%; 14%, respectivamente; o número de dias de tratamento foi 5,5; 3,8; 2,7; 2,4; 5,5. Foi detectado que o melhor momento para se iniciar o

tratamento superovulatório é quando os folículos estão com o diâmetro entre 20-23mm, ou seja antes ou durante o momento esperado do desvio folicular.

Hofferer et al. (1991) usando um protocolo de superovulação com EPE, associado ou não a somatotrofina suína, concluíram que a adição desta não altera a taxa de ovulações. Bruck & Lehn-Jensen (1997) apresentaram a proposta de utilizar a somatotrofina eqüina com o intuito de aumentar a produção do fator de crescimento Insulina-Like (IGF-1) que tem a finalidade de estimular o desenvolvimento folicular. Os autores observaram que o aumento de IGF-1 não aumentou o diâmetro médio dos folículos, e que não houve alterações nos níveis de estradiol, progesterona e LH durante ou imediatamente após o tratamento.

Dippert et al. (1994) estudaram a taxa de fertilidade em éguas superovuladas e em éguas com ovulações simples e múltiplas espontâneas. Foram utilizadas 28 éguas cíclicas de 3 a 15 anos de idade, subdivididas em dois grupos (superovulados e não superovulados). O tratamento superovulatório iniciou-se no 5º dia pós-ovulação, com a administração de 40mg de EPE via intramuscular uma vez ao dia. A PGF_{2α}, foi aplicada no 1º e 2º dia da administração do EPE. O tratamento com EPE foi interrompido quando a maioria dos folículos apresentou um diâmetro ≥ 35 mm ou uma ovulação, onde então foram administrados 3.300UI hCG. As inseminações artificiais foram realizadas diariamente após a administração do hCG, utilizando 1×10^9 de espermatozóide com motilidade progressiva. Dois dias após a última ovulação, os ovários e os ovidutos foram removidos, das éguas, via laparotomia com acesso ao flanco.

Os resultados destes autores demonstraram uma maior taxa de ovulações para o grupo tratado com EPE (3,6) do que para o grupo controle não superovulado (1,1). O intervalo entre a 1º e a última ovulação foi similar entre os grupo tratado e não tratado (0,3 e 0,0 dias, respectivamente) e o período de tratamento com EPE foi de seis dias. Um maior percentual de éguas teve ovulações múltiplas quando tratadas com EPE do que no grupo controle (92,9% "13/14" éguas e 21,4% 3/14 éguas, respectivamente). O percentual de corpo lúteo (CL) resultante das ovulações foi similar entre os grupos tratados (92,7% "51/55") e não tratado (94,1% 16/17). Cinco CL foram formados pela luteinização

espontânea de folículos sem ovulação (04 CL do grupo tratado e 01 CL do grupo não tratado). Um maior número de embriões foi recuperado de éguas superovuladas do que das éguas controle (2,0 e 0,7, respectivamente). Entretanto, o percentual de ovulações, resultando em embriões foi similar entre os grupos tratados e não tratado (57,1% 28/49 e 62,5% 10/16).

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

Bezard et al. (1995) estudaram o número de oócitos recuperados entre éguas pôneis superovuladas (tratamento longo e curto) e não superovuladas (controle) em fase cíclica, com idade de quatro a 17 anos, e 230 a 370kg de peso vivo. O grupo do tratamento longo iniciou o tratamento superovulatório no 8º dia pós-ovulação e terminar com a presença de dois ou mais folículos ≥ 35 mm de diâmetro; já o grupo do tratamento curto, iniciou-se com a presença de folículos com o diâmetro de no máximo 17mm, e terminou quando dois ou mais folículos apresentaram 25mm de diâmetro. A dose administrada do EPE foi de 0,75mg uma vez ao dia. A PGF_{2 α} foi administrada no 7º e 8º dia pós-ovulação para ambos os grupos, e a indução da ovulação foi de 25mg do EPE via intravenosa. A punção folicular foi realizada entre 34 e 35h pós-indução das ovulações. Os autores obtiveram uma média de 1,09 folículos no grupo controle, 2,29 para o tratamento

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

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

Estes pesquisadores observaram, que o número de embriões recuperados por égua superovulada foi similar entre os grupos eFSH e EPE (2,0 e 2,0, respectivamente), sendo superiores ao grupo não tratado (0,4 embrião). O

diâmetro do maior folículo pré-ovulatório foi de 38,0mm; 38,1mm e 36,4mm para os grupos eFSH; EPE e controle não superovulado, respectivamente. As ovulações ocorreram 48h após a administração de 25 mg de EPE via intravenosa.

Em um recente experimento, foi avaliado o uso do eFSH para induzir o desenvolvimento folicular e a ovulação em éguas durante a fase de transição de primavera. Vinte e oito éguas, de 3 a 15 anos, foram examinadas durante os meses de agosto e setembro de 2003 com ultra-som por duas semanas antes do início do experimento, para determinar se elas estavam em transição (nenhum folículo maior que 25mm e nenhum corpo lúteo presente). Após este período, conforme as éguas apresentam pelo menos um folículo maior ou igual a 25mm, elas foram distribuídas alternadamente em um dos dois grupos: grupo controle (não tratado) e grupo tratado com 12,5mg de eFSH, duas vezes ao dia, até que a maioria dos folículos maiores que 30 mm alcançassem 35mm. A atividade folicular de todas as éguas foi acompanhada (Peres, 2004).

Quando a maior parte dos folículos das éguas tratadas e o folículo das éguas do grupo controle adquiriram um tamanho pré-ovulatório (35mm), foram administradas 2.500UI de hCG, via intravenosa, para induzir a ovulação. A partir deste momento as éguas foram inseminadas com sêmen fresco, em dias alternados, até a ovulação. Os exames ultra-sonográficos continuaram até a detecção das ovulações e a recuperação embrionária foi realizada sete a oito dias após a ovulação. As éguas do grupo tratado apresentaram o primeiro folículo pré-ovulatório e ovularam mais cedo do que as éguas não tratadas (6,57 vs 18 dias). Entretanto, elas levaram mais tempo para a segunda ovulação (22,36 vs 10,92 dias) após a coleta de embrião e administração do luteolítico (Peres, 2004).

O período médio de tratamento foi de $4,79 \pm 1,07$ dias e 85,71% das éguas tiveram múltiplas ovulações. O número de ovulações (5,57 vs 1,0) e de embriões (2,0 vs 0,69) por égua foi superior para as éguas tratadas em comparação as éguas controle. Porém, o número de embriões por ovulação, foi similar entre os grupos (0,44 vs 0,69). O padrão de crescimento folicular também foi diferente entre os dois grupos. Oitenta e nove por cento dos embriões oriundos das éguas superovuladas mostraram-se viáveis após uma análise inicial, considerando-se

que foram recuperados três embriões completamente degenerados. As éguas do grupo tratado com múltiplas ovulações tiveram um aumento expressivo da quantidade de progesterona, em relação às éguas com apenas uma ovulação. Pode-se concluir que o tratamento com eFSH foi eficiente em antecipar a primeira ovulação do ano e em promover múltiplas ovulações, além de permitir a recuperação de embriões viáveis (Peres, 2004).

O perfil hormonal de éguas superovuladas com eFSH foi comparado por Machado et al., (2005) com éguas não superovuladas (controle), sendo observado que a concentração plasmática de estradiol ao longo do tratamento superovulatório apresentou-se semelhante ao grupo controle, porém as concentrações do grupo tratado foram superiores ao controle nos dias -4, 0, 1 e 2 (dia 0 = ovulação). As concentrações plasmáticas de progesterona não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos avaliados durante o período de tratamento e ovulação, permanecendo baixas (menores a 1ng/mL).

A elevação das concentrações de estradiol observadas no grupo superovulado desse trabalho corresponde ao aumento do número de folículos pré-ovulatórios e demonstrando sua competência esteroidogênica. O aumento significativo das concentrações de inibina do grupo tratado em relação ao controle, observado a partir do dia -7 pode estar relacionada com o aumento da população de folículos durante a onda, e o seu pico observado no dia da ovulação está relacionada ao número de ovulações, já que este hormônio aumenta durante a ovulação possivelmente em resposta ao extravasamento do fluido folicular para a cavidade abdominal (Machado et al., 2005).

Baseado em prévios estudos onde o aumento da taxa superovulatória em éguas foi obtido quando houve um aumento na dose diária de EPE (Woods & Ginther, 1982), associado com o melhor resultado obtido em vacas quando foi aumentada a frequência da administração do FSH (Monniaux et al., 1983), Alvarenga et al., (1999) propuseram o tratamento com EPE duas vezes ao dia, relatando uma melhor resposta superovulatória em éguas utilizando o EPE em duas administrações ao dia.

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

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

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

Os mesmos autores também verificaram o efeito da administração do EPE duas vezes ao dia em doses decrescentes. A dose do EPE foi iniciada com 35mg por administração, decrescendo a mesma em 10mg ao dia, mantendo as últimas 10mg de tratamento por um período médio de 6,7 dias. O número de folículos ≥ 35 mm de diâmetro e o número de ovulações por égua foram de 4,0 e 3,3, respectivamente. O percentual de éguas com ≥ 2 ovulações foi de 88,9%; o número de embriões recuperados por égua foi de 2,3; o percentual de embriões recuperados por ovulações e o percentual de éguas com ≥ 2 embriões recuperados foram de 60% e 75%, respectivamente.

No primeiro estudo de Scoggin et al. (2002) o EPE apresentou em seu composto um nível de 1,41mg eFSH/mL e 3,37mg eLH/mL; já no segundo estudo estes níveis foram de 2,01mg eFSH/mL e 5,95mg eLH/mL. Carmo (2003) relata que no EPE há 60% de LH e 40% de FSH.

Na tentativa de induzir ovulação múltiplas em éguas com a administração de baixas doses de EPE, Farinasso et al. (2005), compararam a administração diária de 6mg (EPE), 8mg (EPE), e a administração duas vezes ao dia de 4mg (EPE) iniciando-se o tratamento entre o 6 e 9 dia pós-ovulação, e interrompendo quando a maioria dos folículos atingiram 35mm de diâmetro. O percentual de éguas com ≥ 2 ovulações foi de 54%; 60% e 63%, respectivamente para os grupos tratados com EPE 4mg/IM/2xdia; 6mg/IM/1xdia e 8mg/IM/1xdia; e o número médio de embriões recuperados foi 0,94; 1 e 1, respectivamente aos grupos citados anteriormente.

O mesmo foi encontrado por Rocha Filho et al. (2005), quando avaliaram o efeito da administração de baixas doses de EPE (4mg/IM/1xdia), eFSH (5mg/IM/1xdia) e controle (solução fisiológica) nas taxas de ovulações e recuperação de embriões em éguas. O tratamento foi iniciado no oitavo dia pós-ovulação e interrompido quando a maioria dos folículos atingiu o diâmetro de 35mm, administrando então 2.500UI hCG. O número médio de ovulações foi de 1,36; 1,64 e 1,18, respectivamente, o número médio de embriões foi de 1,0; 1,0 e 0,63 respectivamente. A taxa de recuperação embrionária em função do número

de ovulações entre os grupos EPE e eFSH foi de 87,5% e 60,8%; já o percentual de embriões recuperados por lavado foi de 127,3% e 100%, respectivamente.

Na tentativa de compreender melhor a baixa taxa de recuperação embrionária, Carmo (2003) procurou minimizar o efeito deletério do LH, através da administração do EPE duas vezes ao dia em doses decrescentes, tendo como grupo controle a administração do mesmo em doses constantes, assim como relatado por Alvarenga et al. (1999 e 2001). Neste experimento, foi hipotetizado que poderia haver uma melhor recuperação de embriões em consequência da diminuição dos níveis circulantes de LH no processo final da superovulação, baseado na observação de Monniaux et al. (1993) na espécie bovina, que constataram uma melhora significativa na taxa de ovulações e de embriões recuperados quando administraram um produto com altos níveis de LH em doses decrescente.

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

Os valores encontrados por Carmo (2003) quando comparado os grupos doses constantes e doses decrescentes, foram de 3,5 e 5,0 ovulações e 1,2 e 1,8 embriões recuperados, obtendo um percentual de embriões recuperados de 30,2% e 37,8%, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas. Entretanto, as diferenças numéricas foram evidentes entre os tratamentos superovulatórios; provavelmente o pequeno número de animais tenha interferido nos resultados. Este mesmo autor, utilizando como modelo experimental hamsters, demonstrou que doses constantes de EPE induzem a luteinização dos folículos, inibindo a liberação do oócito.

Carmo (2003) observou uma melhor resposta superovulatória, contudo baixos índices de recuperação embrionária quando as aplicações foram mais freqüentes com o EPE. O mesmo foi observado por outros autores, onde

relataram uma melhora no percentual de ovulações múltiplas em éguas superovuladas com a administração do EPE duas vezes ao dia (4 a 7 ovulações/égua), entretanto com baixa taxa de recuperação embrionária (Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002; Carmo et al., 2002b).

Baseando-se nos estudos com bovinos, foi demonstrado que alto nível de LH presente no preparado superovulatório afeta adversamente a resposta ovariana, a taxa de fertilidade e a qualidade dos embriões, fazendo-se necessária a administração gradativa do FSH e LH em doses decrescentes ao invés de doses constantes, na tentativa de minimizar os danos na maturação folicular e oocitária (Monniaux et al., 1983).

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

Em um estudo mais recente, Carmo et al. (2006) ao coletar oócito do oviduto de éguas superovuladas, encontraram uma grande quantidade de coágulo sanguíneo na fossa de ovulação, e lançaram uma questão se este poderia estar impedindo que o oócito migrasse para o oviduto, já que o mesmo não foi observado em éguas controle com ovulações simples.

A superovulação na espécie eqüina açoitou a entusiasmada cosmovisão científica de alguns pesquisadores. Entretanto, é uma biotécnica que fascina o intelecto de vários estudiosos (Day, 1940; Douglas et al, 1974/1979; Lapin & Ginther, 1977; Woods & Ginther, 1983; Squires et al., 1987a; Palmer et al., 1993; Dippert et al., 1994; McCue, 1996; Rosas et al., 1998; Alvarenga et al. 1999 e 2001; Scoggin et al., 2002; Carmo et al., 2006) que buscam desvendar uma das mais empolgantes charadas da fisiologia da reprodução eqüina.

3.3. Superovulação em ruminantes

A superovulação é um elemento chave na biotecnologia da transferência de embriões, sendo estudada desde 1940 na espécie bovina com o intuito de

estimular, através da administração de hormônios gonadotróficos, o desenvolvimento de um maior número de folículos antrais que normalmente sofreriam atresia (Casida et al., 1940).

Um grande número de pesquisadores tem procurado desde o final da década de 80 um melhor entendimento da dinâmica folicular (Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989) com o propósito de compreender alguns dos eventos que ocorrem durante a superovulação. No entanto, ainda não existe um protocolo satisfatório que permita eliminar, ou mesmo, reduzir de forma significativa as variáveis que afetam a resposta superovulatória em bovinos (Gonsalves et al., 2002).

Moor et al. (1984) relataram que o tratamento superovulatório em vacas pode causar distúrbios que afetam a maturação folicular e oocitária, diminuindo o número de oócitos normais ovulados e conseqüentemente o número de embriões viáveis.

Em um estudo realizado por Adams et al. (1993), foram avaliadas 2.048 colheitas de embriões em diferentes vacas, chegando a uma média de 11,5 oócitos/embriões e 6,2 embriões transferíveis por vaca. Os mesmos autores relataram que em média 24% das colheitas de embriões em vacas não resultam em embriões, 64% das vacas doadoras produzem menos embriões viáveis (transferíveis) que a média (4 – 6 embriões/vaca) e que 30% das colheitas produzem um total de 70% de embriões transferíveis. Nogueira (2001) observou em seu experimento que 43% das vacas Nelore superovuladas apresentaram uma baixa taxa de embriões transferíveis ou nenhum embrião transferível.

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

A baixa resposta superovulatória e a baixa recuperação de embriões viáveis por colheita ainda podem estar relacionados a fatores individuais (raça, causas genéticas ou fisiológicas, estado nutricional, estação do ano e repetições sucessivas de tratamento superovulatório) e a fatores relacionados ao tratamento superovulatório (momento de se iniciar o tratamento com relação ao ciclo estral,

tipo de gonadotrofina utilizada, relação FSH e LH nos preparados, duração do tratamento, dose de gonadotrofina e a via de administração) (Ginther et al., 1989; Totey et al., 1989; Gonzales et al., 1990; Carbodevila & Torquatis, 1991; Adams et al., 1992; Bo et al; 1993; Armstrong, 1993; Pérez, 1996).

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

Os animais que não respondem aos estímulos superovulatórios ou o fazem de forma débil, tendem a não responder aos tratamentos subsequentes. O inverso ocorre em vacas com boa resposta superovulatória apresentando resultados favoráveis aos próximos tratamentos superovulatórios (Kohram et al., 1995). Estes fatores genéticos e fisiológicos também foram relatados por Armstrong (1993) onde este observou uma grande variação entre as vacas e suas linhagens, porém o número de folículos foi similar no início do tratamento para as vacas com alta ou baixa resposta superovulatória.

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

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

O momento do ciclo estral mais propício para se iniciar o tratamento superovulatório, é baseado em dados obtidos de vários experimentos científicos

assim como dados de técnicos a campo, sugerindo ser iniciado entre o 8^o e 12^o dia pós-ovulação (Lindsell et al., 1986).

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

As gonadotrofinas do extrato de pituitária de origem animal, são encontradas em produtos comerciais com diferentes nomes (Folltropin-V[®]; Ovaset[®]; Pluset[®], Ovagem[®], Superov[®]) e apresentando em suas bases, diferentes concentrações de LH em relação às concentrações de FSH ($\pm 15\%LH$, $\pm 5\%LH$, $\pm 50\%LH$, $0\%LH$, $0\%LH$ respectivamente) (Bó et al., 2000).

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

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

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

Quanto à freqüência na administração do FSH, é sugerido ser administrado duas vezes ao dia em oito aplicações, em consequência da vida média circulante

deste hormônio ser curta ($\pm 5h$) para a estimulação ovariana, mas ainda permanecendo na circulação por $\pm 12h$ (Laster, 1972).

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

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

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

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

Para minimizar estes problemas, tem-se associado ao protocolo superovulatório com eCG, um anti-soro anti-eCG/PMSG (Neutra-PMSG[®]) que é um anticorpo monoclonal anti-eCG/PMSG, sendo administrado no momento da primeira inseminação artificial, com o intuito de neutralizar a ação desta

gonadotrofina na estimulação ovariana (Dieleman et al., 1987 e 1993; Alfuraiji et al., 1993; Bó et al., 2000).

A dose recomendada do eCG, varia entre 1.500 a 3.000UI por administração, sendo usualmente utilizado na dosagem de 1.500 a 2.500UI em novilhas e vacas primíparas e 3.000UI para vacas múltiparas via intramuscular (Gonzales et al., 1994; Bó et al., 2000;). Já o Folltropin-V[®] e o Pluset[®] (FSHp) tem sido recomendada a administração de 150-250mg/350-600 UI em vacas de corte européias, 130-200mg/300-450 UI em vacas de corte zebuínas, 200-400mg/400-800 UI em vacas de leite, respectivamente aos seus produtos (Lange & Reichenback, 1997; Barros & Nogueira, 1997; Fernandes & Santos, 2000).

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

Bó et al. (1994) compararam diferentes dosagens de FSH (Folltropin-V[®]), 200mg, 400mg, 600mg e 800mg por via subcutânea em vacas de corte, demonstrando uma maior taxa no número de corpos lúteos, oócitos fertilizados e embriões transferíveis quando utilizaram a dose de 400mg. A administração de 400mg do mesmo produto a base de FSH em dose única via subcutânea ou em duas aplicações diárias por um período de quatro dias via intramuscular, não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao número de corpos lúteos (26,8/20,7), ao número total de oócitos/embriões (9,0/11,3), ao número de oócitos fertilizados (3,6/6,3) e ao número de embriões transferíveis (2,5/4,8), respectivamente (Bó et al., 1994).

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

As diferentes concentrações de FSH e LH presentes nos mais variados produtos superovulatórios têm sido motivo de preocupação e de estudo (Barros et al., 2000), visto que há um efeito negativo no aumento das concentrações de LH

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

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

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

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

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

de diminuir o seu nível exógeno no processo final da superovulação (Donaldson & Ward, 1986).

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

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

O mesmo foi observado por Kelly et al. (1997), onde os tratamentos superovulatórios com o Pluset[®] comparado com o Folltropin resultaram em um maior número de folículos (10mm) e ovulações, porém com maior número de embriões degenerados e não fertilizados em comparação ao Folltropin[®]. Relataram, ainda que as novilhas superovuladas com Pluset[®] em apenas uma administração ao dia por quatro dias apresentaram um maior nível de estrógeno em relação ao mesmo tratamento com o Folltropin[®]. Entretanto, quando as novilhas foram superovuladas com os mesmos produtos comerciais em duas administrações ao dia em dose decrescente por um período de quatro dias, não houve diferença significativa nos níveis de estrógeno.

Uma alternativa promissora para aumentar o recrutamento de folículos antes da superovulação é a utilização da somatotrofina recombinante bovina (rbsT), que é capaz de estimular a síntese de IGF-I em vários tecidos, inclusive no ovário (Gong et al., 1996). Spicer & Geisert (1992) mostraram que folículos pequenos contêm menor quantidade de IGF-I do que folículos médios e grandes. Kuehner et al. (1993) relataram que a rbsT influencia na resposta superovulatória,

visto que, este pode estimular a síntese de IGF-I e esta por sua vez é capaz de estimular as células da granulosa. Contudo, a rbsT ainda é motivo de discussão entre os pesquisadores, sendo que, alguns deles têm relatado o aumento na resposta superovulatória (Niemann, 1991; Herrler et al., 1994; Gong et al., 1996) e outros não têm obtido o mesmo sucesso (Gray et al., 1993)

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

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

Uma outra anormalidade superovulatória pode ser decorrente ao desenvolvimento folicular acelerado culminando com a ovulação, antes que o folículo tenha atingido o crescimento e o desenvolvimento adequado para completar o processo de maturação oocitária e das células da granulosa (Armstrong, 1993).

A redução do número de células da granulosa em vacas superovuladas pode propiciar uma anormalidade oocitária (Armstrong, 1993). Uma vez que essas células tem um papel essencial na nutrição do oócito presente no folículo em desenvolvimento (Anderson & Albertini, 1976; Armstrong, 1993). O sítio de

comunicação entre as células da granulosa, as células do cumulus e o oócito, forma uma rede de comunicação entre estas células intercomunicadas que provém de um sinal regulatório e nutricional do oócito (Anderson & Albertini, 1976).

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

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

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

Pode-se concluir que a superovulação é uma técnica cosmopolita, todavia, complexa e que requer ainda intensos estudos para solucionar as suas incógnitas

que em parte vêm sendo eficientemente solucionados com a interação entre as técnicas de punção folicular transvaginal e as biotécnicas da Fertilização in-vitro (FIV) e Transferência Intrafalópio de Gametas (GIFT).

3.4. Aspectos fisiológicos do ciclo estral em éguas

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

A fase de estro ou fase folicular, em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo dominante de 30 mm de diâmetro (Ginther, 1992) no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa.

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

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

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

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

concentrações plasmáticas de progesterona, ocasionando a luteólise entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo estral (Ginther, 1992).

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

A duração do ciclo estral da égua tem sido considerado variável por alguns autores. Esta variabilidade pode ser de origem racial, individual e principalmente da natureza dos dados computados, como é o caso das aquisições dos dados de diferentes técnicos, em diferentes ambientes e de diferentes métodos de avaliação do estro além da dificuldade de predizer as fases exatas do estro e do diestro (Ginther, 1992; McKinnon & Voss, 1993; Neely et al., 1989, Hafez, 1995).

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

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

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

O estudo comparativo da dinâmica folicular entre raças, tem indicado uma maior predisposição a duas ondas foliculares para as raças PSI, Apallosa e Quarto de Milha (Ginther & Bergfeld, 1993), quando comparadas com as raças Árabe e

Pôneis (Ginther, 1992; Dimmick et al., 1993) na primeira metade da estação reprodutiva.

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

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

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

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

3.5. Controle endócrino do ciclo estral

A glândula hipófise (ou pituitária), está intimamente ligada ao hipotálamo. A neurohipófise (ou hipófise posterior) apresenta ligação neural com o hipotálamo; existem neurônios que possuem o corpo celular no hipotálamo e o final do axônio na neurohipófise. Quando há estímulo no hipotálamo, os hormônios produzidos por estes neurônios são liberados pela neurohipófise. Os hormônios liberados pela neurohipófise são a ocitocina e o hormônio antidiurético (ADH ou vasopressina). A adenohipófise (ou hipófise anterior) possui uma relação hormonal com o

hipotálamica. Para cada hormônio da adenohipófise, existe um hormônio de liberação hipotalâmico, que é secretado no sistema porta-hipotalâmico-hipofisário (Price & Smith, 1997). O GnRH secretado pelo hipotálamo, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, atinge esta glândula e estimula a liberação das gonadotrofinas, FSH e LH.

Existem dois locais de secreção e produção de GnRH no hipotálamo: os centros controladores de secreção tônica, que secretam GnRH de uma forma relativamente contínua e os centros controladores da onda pré-ovulatória que secretam grandes quantidades de GnRH de uma só vez. As gonadotrofinas, além de distribuírem no organismo via circulação sistêmica, atingem o hipotálamo, pelo vaso de fluxo retrógrado, onde causam um bloqueio parcial na liberação de GnRH (mecanismo conhecido como “feedback” negativo) (Fernandes, 2000). Via circulação, as gonadotrofinas chegam aos ovários, especificamente aos folículos, onde o FSH estimula o desenvolvimento dos mesmos. Com isto, os folículos iniciarão a produção de estrógeno, que via circulação sistêmica atingiram o hipotálamo provocando um efeito negativo na secreção tônica e um efeito positivo, estimulando os centros controladores da onda-ovulatória, além de um efeito positivo na secreção de gonadotrofinas na hipófise.

Quando a quantidade de estrógeno na circulação chega em determinado nível (devido a produção crescente pelos folículos em desenvolvimento) este sensibiliza áreas superiores do sistema nervoso central, fazendo com que a fêmea manifesta sinais de estro, ou seja sinais de aceitação do macho, e age também nos centros controladores da onda pré-ovulatória de GnRH, fazendo com que uma grande quantidade deste hormônio seja liberado na circulação (Mies Filho, 1982).

Na etapa final de seu desenvolvimento, os folículos secretam outro hormônio, a inibina, que via sistêmica tem a função de bloquear seletivamente a síntese de FSH na hipófise. Por este motivo, acompanhando o pico de liberação de GnRH (onda pré-ovulatória) tem-se aumento de LH, já que a produção de FSH encontra-se parcialmente bloqueada. Esta elevação de LH é responsável pela ovulação dos folículos presentes nos ovários que tem desenvolvimento compatível. As células remanescentes do folículo que ovulou sofreram uma

transformação chamada luteinização, formando o corpo lúteo, que produz progesterona. Estes eventos também são coordenados pelo LH (Hafez, 1995).

A produção de progesterona alcança seu limite por volta de 5 a 7 dias após a formação do corpo lúteo, e enquanto permanecer em níveis elevados na circulação é responsável por bloquear a liberação de GnRH e das gonadotrofinas hipofisárias, ou seja, a égua não apresenta estro novamente enquanto estiver em concentrações circulantes elevadas (Fernandes, 2000).

Considerando que a fêmea não tenha ficado gestante, por volta de 12 a 15 dias após a formação do corpo lúteo, a ocitocina produzida pelo hipotálamo e armazenada na neurohipófise, é liberada via que no útero promove a contração uterina e a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que será responsável pela regressão do corpo lúteo, processo conhecido como luteólise. Com isso, a concentração plasmática de progesterona diminui, possibilitando o aumento gradativo na secreção de GnRH, FSH e LH, iniciando um novo ciclo. Se a égua ficou prenha, o corpo lúteo não pode sofrer regressão, pois é a principal fonte de progesterona no início da gestação (Mckinnon & Voss, 1993).

3.6. Mecanismos da ovulação

3.6.1. Maturação folicular

3.6.1.1. Foliculogênese

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

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

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

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

Os ovários desempenham duas importantes funções, uma exócrina ou gonadal (produção e liberação de oócito) e outra endócrina (produção e liberação de hormônios) (Hafez, 1995, Youngquist, 1997). Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (Pineda, 1989), portanto a produção do gameta feminino é resultante da interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (Saumande, 1981).

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

O folículo é a unidade funcional do ovário, que tem a finalidade de propiciar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito e a produção de hormônios esteróides (Gordon, 1994). Os mamíferos apresentam milhares de folículos ao nascimento, constituindo uma grande reserva folicular (Downs, 1993; Beckers et al. 1996), dos quais apenas 0,01% resultam em ovulação durante a vida reprodutiva, ocorrendo a atresia dos demais no decorrer das fases de crescimento e maturação (Carrol et al. 1990).

A população folicular presente nos ovários pode variar em relação ao indivíduo, a espécie, a raça e a genética (Peters, 1976; Cahill et al., 1979; Gosden & Telfer, 1987a, 1987b; Roy and Treacy, 1993, Smith et al., 1994). Estima-se que a população folicular ovariana na espécie bovina e humana ao nascimento é de 235.000 e 2.000.000 respectivamente (Erickson, 1986; Betteridge et al., 1989),

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

Até bem pouco tempo acreditava-se que os folículos ovarianos não atrésicos resultantes do estágio fetal, iniciavam o seu desenvolvimento ininterruptamente de uma forma aleatória, independente das fases do ciclo estral ou gestação (Ginther, 1992). Hoje em dia, este conceito se modificou e sabe-se que os grupos de folículos iniciam o seu desenvolvimento sincronicamente em determinados períodos do ciclo estral (Austin & Short, 1982; Ginther, 1992).

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

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

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

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

Em relação à pressão do fluido folicular no processo da ovulação, Janson (1975), demonstrou um aumento no volume folicular relacionado ao aumento no fluxo sanguíneo e diminuição na resistência vascular induzido pelo LH. Entretanto, antes da ruptura folicular, ocorre um aumento acentuado no volume do fluido e um aumento na distensibilidade das células da granulosa na parede

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

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

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

Os folículos pré-antrais, compõem a fase mais longa e são dependentes de fatores ovarianos intrínsecos (regulado pelo próprio ovário, ou seja, substâncias e mecanismos que atuam na própria célula) (Austin & Short, 1982). Já os folículos antrais, são caracterizados pelo desenvolvimento do antro quando os folículos atingem aproximadamente 300µm de diâmetro na espécie eqüina, e são regulados pela hipófise, ou seja, é dependente do FSH e LH, além da ação do estrógeno produzido pelo próprio folículo (Hafez, 1995).

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

Alguns autores têm relatado uma forte evidência em mulheres, ovelhas, vacas e porcas, que o gene que codifica o receptor para FSH, não é expresso antes que o folículo atinja o grau do desenvolvimento da formação do antro folicular (Tisdall et al., 1995; Xu et al., 1995; Yuan et al., 1996). Outros pesquisadores contradizem estas evidências, relatando a presença de um estímulo gonadotrófico para a ativação e para o crescimento dos folículos pré-antrais (Hirshfield, 1991; Van Wezel & Rodgers, 1996).

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

Os folículos primordiais são os primeiros a serem formados e os menores folículos encontrados no ovário, representando um “pool” de folículos do qual alguns serão selecionados até tornarem-se folículos dominantes, sendo então considerados a unidade reprodutiva fundamental do ovário (Eppig & O’Brien, 1996). Esses folículos primordiais são constituídos de um oócito dictiano centralizado e circundado por uma única camada de células da granulosa de forma achatada ou pavimentosa, demarcada por uma membrana basal (Fortune, 1994; Eppig & O’Brien, 1996). Eles compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário dos mamíferos (Erickson, 1986).

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

Van Wezel & Rodgers (1996) sugerem que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais são dependentes de nutrientes ovarianos, fatores de crescimento e pouco dependente da ação do hormônio gonadotrófico, o que contradiz com Hafez (1987) que relata a total ausência da ação das gonadotrofinas hipofisárias nesta fase. Alguns folículos primordiais iniciam seu crescimento tão logo sejam formados, enquanto outros permanecem quiescentes por vários meses ou anos (Hirshfield, 1992; Van Wezel & Rodgers, 1996).

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

gestação, lactação, bem como após a hipofisectomia (Hirshfield, 1991). O crescimento do folículo primário é pouco dependente das gonadotrofinas hipofisárias, fazendo-se necessário à ação dos fatores de crescimento (Hirshfield, 1985).

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

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

Estudos *in vitro* em folículos pré-antrais, têm demonstrado que os fatores de crescimento como Epidermal Growth Factor (EGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Jewgenow, 1996), e o insulín-like Growth Factor (IGF-1 e IGF-2), bem como o FSH (Nuttinck et al., 1996), estão envolvidos na proliferação e diferenciação das células da granulosa e na esteroidogênese, que é de extrema importância na estimulação de receptores para LH nas células da granulosa, tal qual para o comportamento sexual do estro.

Os folículos terciários são caracterizados em sua fase inicial como folículos antrais, constituídos por um oócito circundado por várias camadas de células da granulosa que se organizam para a formação do cumulus oóphorus (Hyttel et al., 1997). Nessa fase, surge o aparecimento de uma pequena cavidade contendo líquido folicular denominada de antro, apresenta também uma membrana basal e duas camadas de células tecais que são divididas em interna e externa (Figueiredo, 1995).

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

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

3.6.1.2. Composição do fluido folicular

A viabilidade e o grau de capacitação atingidos por um folículo são, em grande parte, refletidos pela composição bioquímica do fluido presente em sua cavidade antral. Os produtos resultantes do metabolismo das células do cumulus oophorus, da granulosa mural, e mesmo da teca, são difundidos pelo fluido folicular, fornecendo um panorama da atividade esteroidogênica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento (como o fator semelhante a insulina do tipo I, IGF-I; e a proteína ligadora do IGF-I como IGFBP-4 e IGFBP-3).

Estudos em folículos bovinos demonstraram que existe uma alta correlação entre as concentrações de IGF-I livre, de IGFBP-4, de estradiol e de progesterona, presentes no fluido e a capacidade desses folículos atingirem a dominância e a capacitação final pré-ovulação (Beg et al., 2001; Crowe et al., 2001; Ginther et al., 2001). Desse modo, uma alta concentração de 17β -estradiol aliado a baixos níveis de progesterona (uma alta relação estradiol:progesterona) e uma baixa concentração de IGFBP-4 (o que disponibilizaria grande quantidade de IGF-I para ser utilizado como promotor de crescimento pelo folículo) seriam marcadores bioquímicos fidedignos da viabilidade de um determinado folículo.

Melo et al. (2005) avaliaram a concentração de IGF-I em folículos aspirados de vacas nelore com diâmetro $\geq 6,5\text{mm}$ (dominantes) e $<6,5\text{mm}$ (subordinados), e observaram uma maior concentração em folículos dominantes ($184,61 \pm 19,31\text{ng/mL}$ $P=0,009$) do que os folículos subordinados ($113,79 \pm 17,23\text{ng/mL}$). Estes resultados indicam que depois do desvio folicular, o

folículo dominante pode estar influenciando nos níveis de IGF-I dos demais folículos. As menores concentrações de IGF-I e demais fatores de crescimento, além de outras variações hormonais na fase de dominância, podem induzir a atresia e alterações na competência oocitária, consequentemente na quantidade e qualidade de embriões produzidos in-vitro.

Outros estudos têm demonstrado que em cavalos o crescimento folicular está associado com a diminuição nas concentrações de IGFBP-3 e aumento das concentrações de IGF-I, e que as mudanças nas concentrações de IGFBP-3 pode alterar os níveis de IGF-I que estimula a mitose e a esteroidogênese no desenvolvimento folicular e éguas (Carneiro et al., 2002).

Os níveis hormonais presentes no fluido folicular são de grande importância na maturação folicular e consequentemente na maturação oocitária. Assey et al. (2005) relataram que o maior intrave na indústria da transferência de embriões em vacas é a grande variação na produção de embriões viáveis oriundos de animais superovulados. Deste modo, investigaram os níveis da esteroidogênese no fluido folicular e a sua influência no desenvolvimento folicular e oocitário. Assim observaram uma menor concentração de estrógeno e progesterona no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de novilhas superovuladas que em novilhas não superovuladas (83,7ng/mL – 208,1ng/mL, $p>0,05$ e 31,1ng/mL – 150,3ng/mL, respectivamente; $p<0,05$), além dos folículos apresentarem um menor diâmetro. A diminuição destes valores hormonais tem fortes indícios de estarem interferindo no processo de maturação folicular e oocitária.

Os níveis de progesterona e andrógenos foram superiores em ratas superovuladas com PMSG em relação ao grupo controle, entretanto os valores de estrógeno não apresentaram variação entre os dois grupos (Yun et al., 2005).

3.6.1.2.1. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás formado, em meio aquoso, através da conversão da arginina, na presença de oxigênio e diversos co-fatores, em citrulina e NO pela ação do óxido nítrico-sintetase (ONS) (Knowles et al., 1989). Sua molécula é lábil e de grande difusibilidade, sintetizada de forma regulada. O NO,

um radical livre gasoso altamente reativo, tem sido identificado como um importante mensageiro intra e intercelular que controla vários processos, como o tônus vascular, a neurotransmissão, produção de hormônios, diferenciação celular, expressão gênica, a ativação de células do sistema imune e na fisiologia ovariana (Moira et al 1998). Estas ações dependem da produção local e da disponibilidade da ONS, já que o NO é rapidamente consumido (Murad, 1999). A enzima que controla a produção do NO foi encontrada sob três formas homólogas: iONS (indutora), eONS (endotelial) e nONS (neuronal) (Nathan, 1992). A forma nONS está contida em neurônios que são encontrados em várias localizações no hipotálamo e, em particular, nos núcleos paraventricular e supra-óptico, cujos axônios se projetam para a eminência mediana e se estendem até o lobo neural da hipófise (McCann et al 1999). NO é sintetizado por uma reação oxidativa da L-arginina catalisada pelas iso-enzimas óxido nítrico sintase. Diversos trabalhos demonstraram a ação do NO na ovulação, atresia folicular e esteroidogênese das células da granulosa. NO inibe a atividade aromatase e diminui a síntese do RNAm desta enzima em mulheres e ratas (Rosselli et al., 1998).

Pinto et al. (2002) administraram em éguas um inibidor da síntese de óxido nítrico (N[®]-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), e observaram uma diminuição acentuada no edema uterino 12h após a sua administração, o que não foi observado em éguas controle e um atraso significativo na ovulação (84h) após a administração do hCG, quando comparado com o grupo controle (42h) que também recebeu hCG. Os autores atribuem esta diminuição do edema, ao fato de que o óxido nítrico é um importante mediador do mecanismo celular e vascular que ocorrem no útero e no ovário de éguas em estro e sugerem que óxido nítrico tem um importante papel na fisiologia ovariana (crescimento folicular e ovulação) em éguas. Avaliaram, ainda, os níveis de óxido nítrico, progesterona e estrogênio no fluido folicular antes da administração do hCG (0h) e 36h após a administração do hCG para indução de ovulação. Os resultados demonstraram que o nível de óxido nítrico e de progesterona foram menores no momento "0h" em relação ao momento "36h" ($p < 0,05$), e os níveis de estrogênio foram maiores no momento "0h" do que no momento de "36h".

Caldas et al. (1999) verificaram a presença do NO no fluido folicular ovariano de éguas e sua correlação com as concentrações de 17β -estradiol (E2) e com o tamanho folicular. Neste experimento os folículos foram selecionados levando-se em consideração a coloração, intensidade de vascularização das células da teca após a dissecação dos mesmos e concentração de E2. Os folículos foram divididos em três grupos de acordo com o volume do fluido folicular: G1 (10 a 20mL); G2 (>20 a 30mL) e G3 (> 30mL). As concentrações de E2 foram estimadas por radioimunoensaio e as concentrações de NO com a utilização da reação colorimétrica de Griess após a redução do nitrato a nitrito. As concentrações de nitrato no fluido folicular apresentaram uma correlação negativa com o tamanho do folículo e com as concentrações de E2. Os autores concluíram que o NO está presente no líquido folicular ovariano de equinos e sugerem que o mesmo também pode estar envolvido no desenvolvimento folicular e/ou esteroidogênese ovariana de éguas.

Flores et al. (2001) descrevem que quando a produção de NO no ovário é inibida *in vivo* ou *in vitro*, retarda o processo da ovulação por impedir as trocas vasculares. Este efeito pode ser revertido se for administrado simultaneamente um promotor de NO como o nitroprusiato, sustentando desta forma a importância do sistema NO/NOS na ruptura folicular.

As funções do NO no ovário são muito variadas, e vão desde controlar a relação dos vasos a o volume sangüíneo circulante, até a exsudação do plasma que acompanha na ruptura do folículo. O mecanismo pelo qual o NO exerce sua função na vasodilatação é o seguinte: o NO uni-se ao ferro pelo grupo heme, pelo sítio ativo da guanil ciclase, ativando-a e resultando em GMPc. Este estimula as proteínas quinases dependentes dele, resultando no relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Além disso, o NO também contribui na liberação de PGE_2 e de prostaciclina ao ativar a ciclooxigenase que regula sua via de síntese pelo mecanismo similar ao descrito para a guanil ciclase, já que o sítio ativo das ciclooxigenases também contém um grupo hemo (Salvemini, 1997).

3.6.1.2.2. Proteína do líquido folicular

O fator de crescimento ligado a insulina (IGF) tem um importante papel na função ovariana. Os perfis da proteína ligadora de insulina (IGFBPs) no fluido folicular têm sido caracterizados em um grande número de mamíferos (ratos, porcas, vacas, ovelhas, eqüinos e humanos) e são bons indicadores do estado folicular. Estudos *in vitro* da célula da granulosa de várias espécies, têm demonstrado que IGF-I estimula a diferenciação e a proliferação das células da granulosa (Adashi et al., 1985). Mais recentemente, alguns estudos demonstraram o efeito do IGF-I na maturação oocitária (Lorenzo et al., 1995).

Em eqüinos, Gérard & Monget (1998), estudaram os perfis de IGFBP do soro e do fluido folicular. O fluido folicular foi recuperado através da aspiração folicular guiada por ultrassom. No primeiro experimento, os folículos que estavam se destacando como dominantes com diâmetro entre 22 a 25mm de 10 éguas foram parcialmente aspirados (0,5 a 2,2mL). Quando os folículos atingiram um diâmetro de 35mm a ovulação foi induzida com 2500UI de hCG, e 34h após foram aspirados totalmente. Dentre os 10 folículos pré-ovulatórios aspirados das 10 éguas, cinco (5) foram classificados como normais, ou seja, bons, e os outros cinco (5) foram considerados como hemorrágicos.

Em um segundo experimento, os folículos foram inicialmente aspirados ao atingirem o diâmetro entre 33 a 35mm sendo posteriormente induzida a ovulação com 2.500UI de hCG e aspirados 34h após. Em cada seção de aspiração foi retirado o sangue para obtenção do soro. O fluido folicular e o soro sangüíneo demonstraram que o IGFBP de 42 a 44Kda (IGFBP-3), 28 a 32Kda (IGFBP-5) e 35Kda identificado como IGFBP-2 por immunoblotting. O IGFBP-2 apresentou um maior nível no soro do que nos folículos dominantes aspirados. No fluido folicular, IGFBP-3 foi o maior arranjo de proteína, sendo quase sempre constante nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular estudado (Gérard & Monget, 1998).

O desenvolvimento do folículo dominante foi caracterizado pela diminuição da concentração intra-folicular de IGFBP-3 e de IGFBP-5 antes da indução da ovulação, e por um aumento de IGFBP-2 após a indução da ovulação. A

regressão de grandes folículos, assim como dos subordinados, foi caracterizada pelo baixo nível intra-folicular de 17β -estradiol associado ao aumento de IGFBP-2, IGFBP-4 e da IGFBP-5. Estes resultados demonstraram uma alta correlação entre os níveis de 17β -estradiol, IGFBP-2 e da IGFBP-5 intra-folicular. Portanto, o crescimento e a regressão folicular em éguas pode estar associado a mudanças específicas nos níveis de IGFBP, o qual pode ser de importância crucial no desenvolvimento folicular, na ovulação e na atresia folicular (Gérard & Monget; 1998).

3.6.1.3. Parâmetros para aferir a viabilidade do folículo ovariano

O processo de desenvolvimento folicular ovariano e de maturação nuclear do oócito é aferido sob o controle endócrino das gonadotrofinas hipofisária e dos esteróides ovarianos, entretanto, recentes observações sugerem que as gonadotrofinas são apenas parte de um complexo sistema de agentes autócrinos e paracrinos, incluindo os fatores de crescimento (Tonetta & Dizerega, 1989).

A pituitária anterior é composta por uma população de células secretoras em conjunto com células não secretoras. Nas espécies eqüina e ovina estas células são observadas tanto na fase de desenvolvimento fetal quanto no crescimento pós-natal enquanto em aves são observadas apenas após a eclosão do ovo. As células secretoras são divididas de acordo com a sua produção hormonal, sendo os corticotrofos [produtores o hormônio adenocorticotropico (ACTH)], os gonadotrofos (produtores de LH e FSH), os lactotrofos (produtores de prolactina), os somatotrofos [produtores do hormônio de crescimento (GH)] e os tireotrofos [produtores de tireotrofina (TSH)]. Além de produzir, a pituitária é responsável pelo armazenamento da ocitocina (OT) produzida pelo hipotálamo e, transportada do corpo celular, no núcleo do hipotálamo, para os terminais nervosos da pituitária posterior carregada por uma proteína (neurofisina II) atingindo o peso molecular de 20.000, o dobro de seu peso inicial (Gaine et al., 1985).

O LH e o FSH são hormônios glicoprotéicos que consistem de duas subunidades, α e β . A subunidade α é espécie específica e essencialmente idêntica nestes hormônios, a β parece conferir a cada hormônio sua função

biológica (Pierce & Parsons, 1981). Essas gonadotrofinas podem ser isoladas, purificadas e seqüenciadas, possuindo cerca de 34.000 de peso molecular, como demonstrado em trabalhos iniciais com sua extração da glândula pituitária de eqüinos (Braselton & Mcshan, 1970).

3.6.1.4. Processo da ovulação

O processo da ovulação consiste na liberação do oócito do folículo dominante selecionado a partir da emergência de uma onda folicular, na qual os folículos pertencentes a mesma onda folicular que não sofreram a ovulação, entram em atresia (Hafez, 1995).

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

Quando a onda ovulatória de gonadotrofina estimula um folículo pré-ovulatório, a principal resposta celular é a luteinização das células da teca interna e das células da granulosa que constituem a parede folicular pela ação do LH, (Price & Smith, 1997). Embora o processo de luteinização não requeira a ovulação, parece que o processo ovulatório é parte integral dos estágios iniciais da luteinização. A ovulação e a luteinização, são dependentes de eventos da célula da teca interna e da célula da granulosa, e a ruptura final do folículo ovulatório pode ser dependente da ativação dos fibroblastos do tecido conectiva tecal folicular (Price & Smith, 1997).

Pouco antes da ruptura folicular, as células do cumulus sofrem uma dissociação parcial e acumulam em torno do oócito, formando a corona radiata, devido a um aumento dos níveis de progesterona que estimula a síntese de enzimas collagenases que dissociam a ligação entre as células da granulosa, tornando a camada de células da granulosa menos espessa (Parr, 1975; Espey, 1978).

Por ação do hormônio luteinizante, ocorre a síntese de prostaglandina pelas células da granulosa, que contribui para a ruptura dos lisossomos das células

epiteliais no ápice folicular e provoca também a contração de fibras musculares do estroma ovariano, aumentando a pressão no interior do folículo e favorecendo a ruptura do mesmo após o adelgaçamento do ápice folicular (Brannstrom & Hellberg, 1989). A inibição da síntese da prostaglandina pode impedir o processo de ovulação (Hafez, 1995).

Dentre as prostaglandinas, as que atuam no processo da ovulação são, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ que participa da ruptura folicular através da ativação dos lisossomos, e a PGE_2 que estimula a produção de plasminogênio ativador, aumentando a atividade da plasmina que geralmente fica envolvido na migração celular dos tecidos e provavelmente tem a função na remodelação das camadas de células tecais e das células da granulosa durante a formação do corpo lúteo (Hafez, 1995).

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

- O aumento do LH plasmático estimula o aumento do AMPc intracelular.
- O AMPc é o mediador da luteinização e da retomada da meiose, superando a ação local do inibidor da luteinização e da maturação do oócito.
- A síntese de progesterona aumenta e a parede folicular tem aumentada sua distensibilidade.
- Aumentam os níveis de prostaglandina que junto com a plasmina e a colagenase, digerem a parede do folículo ovariano.
- O aumento dos níveis de LH completa a divisão reducional e formação do primeiro corpo polar.
- O pico do FSH estimula a expansão do cumulus e a produção do ativador do plasminogênio.
- A continuidade da digestão enzimática resulta na ruptura da parede folicular.
- Ocorre a expulsão do oócito.
- Vasos sangüíneos invadem a granulosa luteinizada.

3.6.1.5. Aquisição de receptores para o LH

Em bovinos, está bem caracterizada a importância da expressão de receptores de LH nas células da granulosa, como ponto chave para a transição da dependência de FSH para LH (Xu et al., 1995; Beg et al., 2001). A aquisição de receptores de LH, pelas células da granulosa, ocorre logo após o desvio na onda de crescimento folicular, propiciando ao folículo manter a dominância adquirida durante o nadir do pico presente de FSH e continuar o desenvolvimento a despeito dos níveis basais de FSH presentes nesse momento. Além disso, a aquisição de receptores de LH é fundamental para o papel desse hormônio na maturação final do oócito (Hyttel et al., 1986 e 1997) e na própria ovulação do folículo.

O LH atua nas células-alvo foliculares ligando-se a receptores específicos, que gera a ativação da proteína de membrana adenil ciclase, que aumenta a produção intracelular de AMPc. É possível também ser translocado estimulando a produção de glicose-6-fosfato, o que vai prover NADPH para a hidroxilação de esteróides e outros propósitos biosintéticos, ainda é possível a atuação do LH ativando diretamente a RNA polimerase (Alexander & Irvine, 1992).

Os receptores de LH estão presentes nas células da teca de folículos pré-antrais e nos folículos com antro formado está presente nas células da teca bem como nas células da granulosa, a expressão desses receptores é induzida pela presença de FSH e estradiol (Ginther, 1992). A fase final da maturação folicular e a ovulação necessitam do LH para ocorrerem, e, por esse motivo, a aplicação de substâncias semelhantes ao LH, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), em folículos com mais de 30 a 35mm de diâmetro antecipa a ovulação por acelerar a maturação folicular. Mas, a ausência do pico de LH fisiológico não impede totalmente a ocorrência de ovulações, evento considerado normal no diestro da égua, quando as concentrações plasmáticas de LH estão baixas (Evans et al., 1982; Montovan et al., 1990).

Ainda não é bem conhecido o papel do LH durante todo o processo de desenvolvimento folicular, mas pontualmente se evidenciou seu envolvimento na maturação folicular, ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo e, mais recentemente, no da luteólise.

Em éguas, o aumento nas concentrações de LH e a diminuição das concentrações plasmáticas de FSH durante a divergência folicular, foram estudados para determinar o papel do LH na produção de estradiol e inibina (Bergfelt et al., 2001). A redução das concentrações de LH a partir do dia -4 (dia 0 = divergência), no grupo tratado com progesterona exógena, retardou e limitou a elevação das concentrações de inibina e estradiol a partir dos dias -3 e -1, respectivamente. Concluiu-se que o aumento nas concentrações de LH que precede a divergência exerce um papel funcional no maior folículo, no que diz respeito à produção de estradiol e inibina.

O processo ovulatório é ativado pelo aumento nas concentrações plasmáticas de LH que inicia dramáticas mudanças bioquímicas, físicas e de expressão gênica no folículo, que culmina na ruptura folicular e liberação do oócito (Ko et al., 2006). Com o LH sendo considerado um remodelador do folículo ovariano em preparação para o processo ovulatório. Mudanças foliculares que incluem a reprogramação das células da granulosa diferenciando-as para células luteínicas grandes (CLG) e das células da teca em células luteínicas pequenas (CLP), alteração das propriedades secretórias das células do cumulus e maturação oocitária. Conti et al. (2006) em revisão, incluindo estudos em outras espécies como a humana, aponta que a estimulação do folículo pré-ovulatório com o LH envolve a ativação de uma rede de fatores de crescimento epidermal (EGF). Essa ativação se dá via estimulação das células murais da granulosa via sinalização com AMPc, isso gera a expressão de fatores semelhantes ao EGF. Esses fatores de crescimento por sua vez ativam os receptores de EGF com atuação autócrina/justácrina na camada mural ou difundida para atuar nas células do cumulus. A ativação deste último receptor sinaliza para as células do cumulus, em conjunto com o AMPc, provocando o início da maturação nuclear do oócito e a aquisição de competência para desenvolver-se, bem como estimula a expansão do cumulus.

3.6.2. Maturação oocitária

O processo de maturação que resulta na aquisição da capacidade do oócito ser fertilizado ocorre em duas fases. A primeira é conhecida como fase de crescimento e confere ao oócito a capacidade de reiniciar a meiose (Cran & Moor, 1990). A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose é normalmente denominada de maturação final e ocorre após a puberdade no folículo pré-ovulatório. Esta fase envolve modificações nucleares e citoplasmáticas que irão resultar na formação de um gameta com capacidade de ser fertilizado (Cran et al., 1980; Moor et al., 1981; Sathananthan, 1994).

A meiose, no oócito, tem início durante a vida pré-natal ou logo após o nascimento, sendo interrompida no estágio de diplóteno da prófase I. O oócito entra no estágio de núcleo dictioto quando se apresenta em vesícula germinativa, permanecendo neste estágio até a puberdade quando a cada ciclo sexual, a meiose é retomada culminando em ovulação ou atresia folicular (Ayalon et al., 1972).

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

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

Na espécie eqüina, as relações entre as mudanças morfológicas e endocrinológicas do fluido folicular do oócito em maturação são pobremente descritas. Na maioria das espécies de mamíferos, a maturação nuclear *in vivo* ocorre após o pico pré-ovulatório de LH (Dekel et al., 1988; Sirard & First, 1988; Hyttel et al., 1989; Sun & Moor, 1991). Na égua não existe um pico pré-ovulatório

de LH precedendo a ovulação; em lugar disso, as concentrações de LH aumentam gradativamente durante o estro (Geschwind et al., 1975; Miller et al., 1980).

Em folículos imaturos e pré-ovulatórios de éguas menores que 37mm (provavelmente antes da elevação de LH) o núcleo do oócito é esférico e localizado central ou periférico ao ooplasma. O espaço perivitelino está ausente e há uma forte união entre oócito e células do cumulus, através de numerosas junções comunicantes com o oolema (Moor et al., 1981; Kruip et al., 1983; Hyttel et al., 1987). As mitocôndrias estão concentradas na região cortical, e em íntimo contato com o retículo endoplasmático formando pequenas unidades metabólicas (Cran et al., 1980; Kruip et al., 1983; Vogelsang et al., 1987; Zamboni & Mastroianni, 1996).

Grondahl et al. (1995) e Landim-Alvarenga (1999) descreveram os eventos da maturação nuclear, onde se observa um achatamento do núcleo esférico do oócito equino, seguido de um aumento da ondulação do envelope nuclear, formação da placa metafásica da primeira divisão meiótica, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e subsequentemente a formação da placa metafásica da segunda divisão meiótica. O processo da maturação nuclear, termina uma hora antes da ovulação (Hafez, 1995).

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

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

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

Em conjunto a maturação nuclear deve estar ocorrendo a maturação citoplasmática que é caracterizada por diversas mudanças no formato e localização das organelas celulares (Landim-Alvarenga, 1999), nas fases de metáfase I e II existem grandes mudanças nucleares e citoplasmáticas. Uma migração maciça de mitocôndrias, vesículas e gotas lipídicas pra a região central, resultam no aparecimento de um grande número de grânulos corticais e complexos de Golgi livres na região periférica. Os grânulos corticais são observados abaixo do oolema na metáfase II. Estas modificações morfológicas são bastante similares às observadas por Enders et al. (1987), em oócitos em metáfase II recém-ovulados, indicando que o oócito eqüino completa todo o processo de maturação antes da ovulação.

Willis et al. (1994) trabalhando com oócito imaturos e maduros in vitro de eqüinos por 15 horas, descreveram que, enquanto o oócito imaturo apresenta poucos grânulos corticais e poucas microvilosidades, no oócito maturo os grânulos corticais apresentam-se esféricos, com forma e tamanho homogêneos, densos e migram até a membrana citoplasmática.

Os oócitos oriundos de novilhas superovuladas com FSHp apresentaram as seguintes alterações, formação prematura do espaço perivitelineco, ausência de vacuolização nucleolar, redução da quantidade de gotas de lipídio e ausência de associação de lipídio-mitocondria, aumento do compartimento do retículo endoplasmático rugoso, aumento da condensação da cromatina e expansão de algumas células do cúmulus. Assey et al. (2005) relataram também a presença de oócitos degenerados em novilhas superovuladas, além da redução intrafolicular das concentrações de estrógeno e progesterona. Estas alterações podem contribuir para a redução do desenvolvimento e maturação dos oócitos de animais superovulados.

Yun et al. (1987) avaliaram a maturação oocitária de ratas superovuladas com PMSG e relataram uma marcante alteração na resposta ovariana e esteroidogênica sérica o que pode conduzir a uma grande quantidade de oócitos degenerados. Em um subsequente estudo, Yun et al. (2005) demonstraram haver oócitos de ovulações de ratas superovuladas (PMSG) com prematuridade ou asincronia na maturação nuclear, sendo observado uma grande variação de oócitos entre Prófase I e Metáfase II, ao contrário de animais não superovulados onde a maioria dos oócitos apresentam em Metáfase II. Assim como relatado por Assey et al (2005), estes autores observaram uma diminuição nos níveis de progesterona no fluido folicular e também uma diminuição nos níveis de andrógenos. Os níveis de Estrógeno não variaram entre ratas superovuladas e não superovuladas.

Segundo Carneiro et al. (2002), o estudo da migração dos grânulos corticais em oócitos mamíferos é um importante critério para avaliar a maturação citoplasmática. Os oócitos eqüinos em estágio de VG (imaturos) apresentam grânulos corticais (GC) dispersos no citoplasma, com o decorrer da maturação (30 a 36 horas) ocorre uma progressiva migração centrípeta dos GC em direção ao córtex oocitário, formando uma monolinha adjacente a membrana plasmática (Landim-Alvarenga, 2004). Sendo que a migração cortical tem uma correlação positiva com a maturação nuclear (Franz et al., 2002).

A principal característica dos oócitos eqüinos, independente do seu estado de maturação nuclear, é a presença de uma grande quantidade de gotas de lipídios em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, apresentando conteúdo amorfo de densidade eletrônica média, sugerindo a formação de unidades metabólicas (Kruip et al., 1983; Landim-Alvarenga, 2002). De fato a observação de algumas gotas sem o conteúdo amorfo e apresentando restos de membrana indica a metabolização do material neles contido, provavelmente colesterol. A aparência diferente do conteúdo presente nos oócitos maduros, nos quais as gotas aparecem vazias e a associação menos consistente com as mitocôndrias, pode indicar que o processo de maturação demanda a metabolização do conteúdo destas gotas (Landim-Alvarenga, 2002).

É conhecido que o retículo endoplasmático liso está envolvido no metabolismo lipídico (Ginther, 1992). Esta observação morfológica pode indicar que oócitos e/ou embriões de equinos tem a capacidade de sintetizar colesterol. De fato embriões de equinos são capazes de produzir estrógeno durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento (Ginther, 1992).

Tanto nos oócitos maduros quanto imaturos foi observado a presença de complexos de Golgi localizado na periferia próximo ao ovolema. Entretanto, nos oócitos imaturos, fixados logo após a colheita, o complexo de Golgi apresentou-se mais desenvolvido, constituído por inúmeras lamelas dilatadas associadas a vesículas membranosas de eletro-densidade variável, tanto na face de cis como trans. As da face de cis são vesículas recobertas e podem ser as vesículas picnóticas vistas na superfície do oócito as quais estariam migrando em direção ao Golgi. Neste caso as vesículas da face trans poderiam conter o material absorvido já elaborado pelo Golgi. Como grânulos semelhantes aos grânulos corticais são observados na proximidade desta organela é possível que esta tenha um papel na sua produção. Nos oócitos maduros, o complexo de Golgi também está presente na periferia do oócito, mas com tamanho reduzido indicando menos atividade, o que poderia ser explicado por já ter concluído a produção de grânulos corticais (Landim-Alvarenga, 2002).

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

3.6.2.1. Oogênese

A oogênese é considerada como o processo de formação, crescimento e maturação do gameta feminino (Austin & Short, 1982; Ginther, 1992), iniciando-se na fase embrionária, através da formação das células germinativas primordiais originárias das células tronco embrionária, e termina na fase de puberdade por ocasião da fecundação (Austin & Short, 1982).

As células germinativas primordiais são oriundas do saco vitelíneo. Elas inicialmente migram para o epitélio embrionário e posteriormente para o mesênquima da crista genital, colonizando a gônada indiferenciada ainda na vida fetal (Wassarman, 1988). Nesta fase as células germinativas primordiais sofrem o processo de mitose, recebendo a denominação de oogônias ao redor dos 50 dias de gestação na espécie eqüina (Deansly, 1978). O processo de mitose da célula, é constituído de quatro fases: diplóteno-2n, síntese de DNA, 4n e a divisão mitótica que é subdividida em prófase, pró-metáfase, metáfase e telófase (Gordon, 1994).

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

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

O processo da meiose ocorre aproximadamente entre 75 e 160 dias de gestação na égua (Ginther, 1992). É caracterizado pela presença do gameta 2n cromossomo, que sofre a primeira divisão meiótica, passando pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno da prófase I, dando origem a uma célula haplóide (1n cromossomo) (Picton, 2001). Nesta fase de prófase I da meiose, forma-se o oócito primário, que se apresenta recoberto por uma fina camada de células da granulosa no folículo primordial, permanecendo quiescente no estágio de diplóteno, conhecido como estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa até a puberdade, quando os folículos selecionados estarão aptos a ovularem (Picton, 2001).

Todos os oócitos que não forem incorporados aos folículos primordiais serão degenerados, porém os folículos primordiais estabelecidos serão recrutados

pelas ondas foliculares, pelo resto da vida dos animais, ou até o final da atividade ovariana (Gosden & Telfer, 1987). Na fase pré-puberal, imediatamente antes da ovulação, reinicia-se a divisão meiótica e a vesícula germinativa passa para o estágio de diacinese, quando em seguida ocorre o rompimento da vesícula germinativa, a condensação cromossômica e a organização dos cromossomos no plano equatorial, correspondendo ao estágio da metáfase I (Gordon, 1994). Em seguida, ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar e o oócito passa a ser denominado de secundário, correspondendo às fases de anáfase I e prófase I (Vanderwall, 1996). A partir desse momento, inicia a segunda divisão meiótica em estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (Gordon, 1994).

Nesta fase, o oócito já possui maturação nuclear completa e está preparado para a fecundação do espermatozóide, o qual se houver a fertilização do oócito, inicia a segunda divisão da meiose, passando pelos estágios de anáfase II (cromatides separadas), telófase II e zigoto ou oócito terciário, ocorrendo a expulsão do segundo corpúsculo polar e originando o pró-núcleo feminino, dentro do espaço perivitelíneo (Goudet et al., 1998). Em alguns casos, o oócito equino imaturo em metáfase I da meiose pode ser encontrado no oviduto, onde será maturado e concluído a metáfase II da meiose (Vanderwall, 1996).

3.6.2.2. Fatores que influenciam a maturação oocitária

Os fatores que influenciam a maturação oocitária incluem as condições físicas como osmolaridade e composição iônica (Yamauchi et al., 1999), temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂ assim como o volume de cultura, presença de células do cumulus, adição de gonadotrofinas ao meio de maturação e o tempo de cultivo dos oócitos. Foi comprovado em diversas espécies que a presença das células da granulosa durante a maturação é benéfica (em humanos, Kennedy & Donahue, 1969; coelhos e vacas, Robertson & Baker, 1969). Associação entre as células germinativas e somáticas regula os níveis de síntese e o padrão de fosforilação de proteínas específicas no oócito em crescimento, regulando, portanto o metabolismo do mesmo.

Fatores de crescimento, gonadotrofinas, soro específicos e diferentes condições de cultivo revelaram influência nas taxas de produção e qualidade embrionária, porém, ainda não se tem relato sobre uma resposta total dos oócitos cultivados nestas condições (Sirard et al., 1998). Apesar de sabermos da influência dos meios e condições de cultivo, são os próprios constituintes originais do oócito que são os responsáveis por controlar a habilidade de responder as condições mais adequadas de cultivo (Sirard, 2001).

Desse modo a maioria dos laboratórios ainda utiliza as condições inicialmente propostas por Moor et al. (1984), onde o meio de cultivo celular TCM-199 é suplementado com soro fetal bovino, estradiol e gonadotrofinas.

A maturação meiótica *in vivo* de oócitos mamíferos é conhecida por ser regulada através de gonadotrofinas. Brackett et al. (1989) demonstraram que a utilização de hormônio luteinizante (LH) bovino no meio de maturação *in vitro* aumentou significativamente a qualidade embrionária. Sugere-se que FSH tenha um efeito benéfico e que a presença de gonadotrofinas melhore a expansão das células do cumulus e conseqüentemente leva a melhoras na capacitação espermática e na fertilização (Eyestone & Boer, 1993).

Um outro componente importante é a atividade do fator promotor de maturação (MPF), o qual acredita-se ser um regulador universal do ciclo celular, tanto na mitose como meiose (Nurse, 1990). O MPF é uma proteína composta por uma subunidade catalítica, a cinase 1 ciclina dependente (cdk1) e uma subunidade reguladora, a ciclina B (Downs, 1993; Taieb et al., 1997). O MPF ativo induz a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do envelope nuclear e reorganização do citoplasma para a entrada na fase M (divisão) tanto do ciclo mitótico como meiótico (Murray & Kirschner, 1989).

Existem fatores de crescimento produzidos nos ovários que estão envolvidos na regulação da maturação nuclear e na expansão do cumulus. Os fatores de crescimento relacionados com a maturação oocitária são o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento semelhante à Insulina I e II (IGF-I e IGF-II) (Tsafari & Adashi, 1994).

Em bovinos, Lorenzo et al. (1995) observaram que o EGF atua estimulando a maturação do Complexo Cumulus Oócito (CCO), mas não atua, em oócitos desnudados (sem células do cumulus).

Quanto ao IGF-I, receptores foram detectados tanto no oócito quanto nas células do cumulus, e já foi demonstrado previamente que o IGF-I modula uma variedade de funções das células foliculares somáticas como a proliferação, diferenciação e esteroidogênese (Xia et al., 1994). Pesquisas mostraram que a expansão das células do cumulus ocorre por influência deste fator de crescimento, e que o IGF-I possa ser produzido endogenamente pelos CCOs (Singh & Armstrong, 1997).

As razões para a falha dos oócitos eqüinos em completar a meiose durante a maturação *in vitro* são desconhecidas, mas podem estar ligadas a uma alteração da cascata bioquímica envolvida na meiose (Goudet et al., 1998).

3.6.2.3. Competência oocitária

A maturação de um folículo está diretamente relacionada à capacidade de seu oócito suportar a fertilização e o posterior desenvolvimento embrionário. Estudos têm demonstrado que o crescimento máximo do oócito no momento que antecede a ovulação está relacionado diretamente com a sua competência (Hyttel et al., 1997). Assim, em vacas superovuladas, devido à população heterogênea de folículos, podem ocorrer ovulações de oócitos ainda não completamente capacitados para a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Callesen et al., 1987; Hyttel et al., 1991), sendo uma característica da espécie eqüina a retenção destes no oviduto, impedindo-os de migrarem até o útero.

Muitos estudos correlacionados a morfologia oocitária à qualidade embrionária e as taxas de fertilização, clivagem e gestação. A morfologia do oócito inclui a avaliação da forma, tamanho do espaço perivitelínico, presença de vacuolização, granulação ou inclusão citoplasmática e anormalidades da zona pelúcida e do corpúsculo polar (De Sutter et al., 1996).

Xia (1997) sugere que a taxa de fertilização e a qualidade dos embriões provenientes de oócitos com corpúsculos polares intáctos, espaço perivitelínico

normal e sem inclusões citoplasmáticas são significativamente melhores em comparação à taxa de fertilização e a qualidade embrionária obtidas com oócitos morfologicamente alterados. Loutradis et al. (1999) relataram a formação de embriões de pobre morfologia a partir de oócitos morfologicamente anormais e baixas taxas de gestação. Avaliaram também o valor prognóstico da morfologia do primeiro corpúsculo polar e observaram taxa de fertilização, qualidade embrionária e taxa de implantação melhores quando o corpúsculo polar apresentava-se intacto.

3.7. Aspiração Folicular

Nos últimos anos, tem-se havido um crescente interesse nas biotecnologias assistidas em reprodução eqüina em consequência do avanço socio/economico apresentado na cosmovisão do criatório de cavalo. A biotécnica aspirativa folicular em éguas apresenta-se como uma alternativa para suprir a necessidade reprodutiva de éguas subférteis, que por qualquer problema reprodutivo, ou seja, por patologias reprodutivas venha a ter dificuldades em gerar a prole ou serem doadoras de embriões (Bogh, 2003).

Esta técnica tem como propósito a recuperação de oócitos com fins de ser transferido para uma égua receptora. Este oócito pode ser fertilizado *in vivo* através da técnica de transferência de oócito (TO), onde o oócito (maturado *in-vivo* ou *in-vitro*) é transferido cirurgicamente para o oviduto de uma égua receptora pelo acesso do flanco e procedendo a inseminação artificial via vagina/uterina (Carnevale et al., 2001). Uma outra técnica é a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) que segue o mesmo protocolo da TO porém a inseminação artificial é realizada no oviduto juntamente com o oócito (Carnevale, 2004). Entre estas duas técnicas de inseminação, Carnevale et al. (2001) não observaram diferença significativa (12/22 55% e 14,26 55% respectivamente para as inseminações intra uterino e intra oviduto).

Quanto a fertilização do oócito em laboratório, há limitados sucessos no desenvolvimento da técnica de fertilização *in-vitro* (FIV) em equinos, devido a dois

principais fatores, a maturação do oócito e a capacitação espermática (Squires et al., 2003). Os únicos potros produzidos in-vitro foi relatado através da técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICS), onde se injeta um espermatozoide no interior do oócito, sendo este clivado e desenvolvido até a fase de blastocisto, onde será transferido para o útero da égua receptora (Carnevale & Ginther, 1993).

Palmer et al. (1987) foram os primeiros a descreverem a técnica de OPU com a égua em estação, cujo operador fixava o ovário com a mão pelo reto guiando-o até a agulha de punção através do flanco até atingir o folículo. McKinnon et al. (1987) relataram índices de recuperação de 71,4% utilizando um trocáter e uma agulha de 9,8mm para aspirar folículos pré-ovulatórios de éguas através do flanco.

Procedimento semelhante foi descrito por Hinrichs et al. (1990), com índices de recuperação de 73,0%. Neste caso, foi adicionado à técnica de aspiração pelo flanco, uma incisão na parede cranial da vagina, a qual permitia ao operador introduzir sua mão na cavidade peritoneal e fixar o ovário diretamente contra o trocáter.

Vogelsang et al. (1988) comparou a coleta de oócitos via punção transcutânea pelo flanco com a coleta via laparotomia e exposição do ovário. O primeiro experimento, usando uma agulha de 13G e 15cm de comprimento conectada a um tubo de látex e uma seringa estéril, obteve uma taxa recuperação de 10%. Com a laparotomia, usando a mesma agulha, esta taxa subiu para 14% e quando associada a um sistema de irrigação contínua a vácuo subiu para 60%. Este mesmo sistema de irrigação proporcionou uma taxa de 38% quando usado para punção transcutânea, indicando que a coleta de oócitos com o animal em estação era possível, com sucesso moderado, sem danos ao oócito.

O primeiro relato de OPU transvaginal em éguas foi o relatado em 1992 por Bruck et al. utilizando-se um transdutor setorial acoplado a uma guia transvaginal, e conectado a um aparelho de ultra-som, direcionando-se a agulha de aspiração por uma linha de biópcia presente na tela deste aparelho.

Há uma dificuldade na recuperação de oócitos em éguas através da técnica de aspiração folicular, em consequência da sua anatomia a parede do folículo. Na égua. O folículo apresenta uma camada de células da teca, logo abaixo da junção das células do cumulus oophorus com a parede folicular. Uma das características anatômicas desta estrutura é a presença de processos celulares emitidos pelas células da granulosa para o interior da camada de células tecais. Desta forma, os processos das células da granulosa, bem como a posição da camada de células tecais e a estrutura do componente polissacarídeo, funcionam como uma âncora do complexo Cumulus-Oócito (CCO) à parede folicular (Hawley, 1995).

A técnica de aspiração folicular em éguas também têm sido utilizado com o propósito de acelerar a formação do corpo lúteo, ou seja, no aumento dos níveis de progesterona circulante. Alvarenga et al. (1999) observaram a formação de corpo lúteo em 38% das éguas aspiradas em fase de transição com folículo acima de 30mm, dando continuidade ao estro após ser administrado PGF_{2α} sete dias após este procedimento.

Uma tentativa foi realizada para aumentar o número de folículos pequenos e médios, para a recuperação de oócitos através da aspiração do folículo dominante antes do estabelecimento da dominância. Éguas cíclicas foram aleatoriamente divididas em quatro grupos no dia da ovulação. Cada égua foi avaliada diariamente pela ultra-sonografia transretal oito dias após a ovulação para determinar o crescimento e a regressão de folículos maiores que 15mm de diâmetro. Uma vez detectado o folículo dominante, as éguas do G1 foram submetidas a aspiração deste folículo e três dias após todos os demais que apresentaram diâmetro maiores que 15mm. No G2 foi identificado o folículo dominante, porém não aspirando, sendo todos os folículos maiores que 15mm aspirados três dias após a identificação do dominante. No G3 foi aspirado o folículo dominante e seis dias após todos os demais que apresentaram o diâmetro maior que 15mm. No G4 teve o mesmo procedimento do G2, porém a aspiração foi realizada seis dias após a identificação do folículo dominante. O folículo maior que 25mm de diâmetro por dois dias consecutivos após o oitavo dia da ovulação foi considerado como dominante, sendo este identificado em média 15,1 dias após

a ovulação. A média do número de folículos pequenos (3 a 17mm) e médios (18 a 27mm) não diferiu estatisticamente nos dias três e seis após a identificação/aspiração do folículo dominante em todos os grupos tratados. As éguas do grupo 2 tiveram um número significativamente maior ($p < 0,05$) de folículos grandes ($\geq 28\text{mm}$) três dias após a identificação do folículo dominante em relação ao G1 (1,3 – 0,5 folículos, respectivamente), e as médias para os grupos 3 e 4 foram similares. No G4 a taxa de atresia foi maior para os folículos subordinados em relação aos grupos aspirados no momento da identificação. Houve um percentual maior de folículos que cresceram após a aspiração do folículo dominante (47/137 ou 34,3%) quando comparado os não aspirados (15/133 ou 11,3%). Estes autores concluíram, que a aspiração do folículo dominante não aumenta o número de folículos pequenos ou médios três ou seis dias após a ovulação, entretanto, uma pequena proporção de folículos entrou em atresia após a aspiração do folículo dominante quando comparado com os que manteve o domínio intacta. Contudo, minimizando o número de folículos subordinados em processo de atresia pode-se ter um benefício na recuperação de oócitos viáveis destes folículos (Dippert et al., 1995).

Para avaliar o efeito da aspiração *in vivo* do líquido folicular de folículos pré-ovulatórios em éguas, Hinrichs et al. (1991) aspiraram folículos entre 30 e 34mm (G1) e entre 35 e 49mm (G2) de diâmetro, e observaram que a ocorrência de ovulações secundárias foi maior (54%) no G1 do que no grupo G2 (18,2%). Foi observado 11 ovulações de 32 ciclos entre o terceiro e o oitavo dia pós-aspiração, sugerindo que o líquido folicular pode conter fatores que inibem o crescimento de folículos secundários. Os autores também compararam os efeitos da aspiração e da ovulação através dos níveis de progesterona, e observaram que a remoção do líquido folicular não mimetiza completamente a ovulação, apesar da formação do corpo lúteo.

Franco (2005) estudou o efeito da aspiração folicular na fertilidade do subsequente ciclo estral de éguas. Foi observado que 73,3% das ovulações ocorreram no mesmo ovário do ciclo anterior aspirado, e o número médio de dias da aspiração a ovulação foi de 20 dias. A média de dias da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$

(administrada 8 dias após a aspiração) até a ovulação foi de 15,5 (folículos aspirados entre 25 a 20mm), 13,0 (folículos aspirados 30 a 34mm) e 8,0 (folículos aspirados acima de 35mm). Neste trabalho, nenhuma ovulação secundária foi observada, ao contrário do trabalho descrito anteriormente por Hinrichs et al. (1991). Nenhuma diferença foi encontrada na duração da liberação, no pico de progesterona e no percentual de prenhes entre éguas aspiradas e não aspiradas. Entretanto, pode-se concluir que a aspiração transvaginal de folículos de diferentes tamanhos não interfere nos índices de prenhez do ciclo subsequente à aspiração, sendo uma biotécnica segura em eqüinos.

Em um estudo mais recente, Scott et al. (2006) avaliaram a taxa de recuperação de oócito de éguas em fase de transição, cíclica e prenha, através da aspiração de folículo, guiado por ultra-som via transvaginal. A aspiração dos folículos foi dividida em dois grupos em relação ao seu tamanho, grandes (>20mm) e pequenos (10 a 20mm). As éguas em transição foram divididas em dois grupos, o primeiro recebeu 12,5mg eFSH uma vez ao dia por quatro dias, e o segundo não recebeu nada, ou seja o grupo controle. Para as éguas ciclantes, estas também foram divididas em dois grupos, o primeiro recebeu 12,5mg eFSH duas vezes ao dia por um período de três dias, e o segundo grupo como controle. As éguas prenhas foram aspiradas com 25, 40 e 55 dias de gestação e não foram tratadas com eFSH. O número de folículos pequenos e grandes por égua, o número de oócitos recuperados de folículos pequenos e grandes por égua e o percentual e o percentual de recuperação de oócito por folículos pequenos e grandes em éguas controle em fase de transição foi de 5,61; 1,64; 1,21; 0,11; 23,6; 10,0, respectivamente. Para as éguas tratadas com eFSH em fase de transição foi de 6,14; 1,18; 0,96; 0,21; 19,0; 11,0, respectivamente. Nas éguas em fase cíclica controle foi de 5,86; 2,25; 1,07; 0,14; 22,6; 5,8. Para as éguas em fase cíclica tratada com eFSH foi de 6,25; 2,64; 1,39; 0,46; 21,2; 20,1, respectivamente. Já para as éguas prenhas aos 25 dias de gestação foi de 9,27; 2,36; 2,91; 0,73; 27,7; 30,5, respectivamente. Aos 40 dias de gestação foi de 9,18; 0,82; 2,73; 0,45; 38,1; 23,0, respectivamente, e para o grupo das éguas aos 55 dias de gestação foi de 6,73; 0,79; 1,47; 0,04; 27,0; 10,2, respectivamente.

Carnevale (2005) obteve uma taxa de recuperação de oócitos em folículos pré-ovulatórios de 77%, preconizando a aspiração desta categoria de folículos como sendo o melhor momento para coleta em programas comerciais de transferência de oócitos. Estes autores relatam também que a taxa de recuperação de oócitos é maior quando se faz a indução da ovulação com a associação do hCG com a deslorelina.

A influência da pressão de vácuo nas taxas de recuperação de oócitos foi estudada por Kanitz & Berger (1995). Quatorze ovários de matadouro forneceram 37 complexos cumulus oócito (COC) de 134 folículos entre 5 e 46mm quando uma pressão de 0,2 ou 0,4 bar ($1\text{mmHg} = 1,333 \times 10^{-3}$ bars) era usada. Não houve diferença na taxa de recuperação (28,8% x 26,4%) quando comparadas as duas pressões de vácuo. Bruck & Greeve (1997) investigaram os efeitos da aspiração e lavagem do folículo usando uma agulha de 18G e uma seringa de 60mL, comparado à sucção e lavagem do folículo com bomba de elétrica. O uso da bomba elétrica não aumentou as taxas de recuperação, e as aspirações efetuadas a um intervalo de 6 dias resultaram em menores taxas de recuperação (18,5%) que as efetuadas em intervalo de 23 dias (35,8%).

Cook et al. (1992), usando um transdutor curvilíneo de 5mHz e uma bomba de vácuo a 300mmHg de pressão ligada a uma agulha de 12G e lúmen simples, determinaram que a lavagem do folículo aspirado é um fator essencial para a coleta de oócitos, já que nenhum foi encontrado no fluido folicular enquanto repetidas lavagens do mesmo folículo resultaram em taxas de recuperação de 52% para folículos pré-ovulatórios previamente tratados com hCG. Em 1993 este mesmo grupo, trabalhando novamente com folículos pré-ovulatórios, comparou as agulhas de lúmen simples e duplo, obtendo uma taxa de recuperação de 84% com a agulha de lúmen duplo, pois esta permitia que o fluido penetrasse continuamente no folículo enquanto a sucção estava sendo aplicada. A agulha de 12G com lúmen simples foi considerada de eficiência intermediária, com 52% de recuperação de oócitos.

Há dúvidas se as agulhas com lúmen simples ou duplo devem ser usadas em folículos em diestro. Cook et al. (1993) não encontraram diferenças nas taxas

de recuperação (22%), mas Bracher et al. (1993) relataram 12,3% de recuperação de oócitos com agulhas de lúmen simples e 24% com agulhas de lúmen duplo para esta categoria de folículos.

A turbulência criada pela lavagem do folículo após a aspiração facilita o destacamento do oócito em folículos pré-ovulatórios, onde a conexão entre o oócito e as células da parede folicular é mais fraca devida expansão do cumulus pela deposição de hialuronidase mediada por gonadotrofinas (Hafez & Hafez, 2000; Brück et al., 1996). Entretanto, em folículos de diestro, só a lavagem do folículo não é suficiente para a retirada do oócito, sugerindo-se a escarificação da parede folicular com agulha para que seja liberado o oócito imaturo (Mari et al., 2004). A curetagem da parede folicular é mais fácil de ser realizada quando o folículo apresenta diâmetro pequeno, no entanto os oócitos oriundos de folículos com menos de 10 mm de diâmetro apresentam baixa capacidade de sofrer maturação *in vitro* (Goudet et al., 1997).

Cook et al. (1993) sugeriram que a recuperação de oócitos poderia aumentar se múltiplos folículos grandes estivessem presentes no momento da coleta o que poderia ser conseguido com o uso de protocolos de superovulação para estimular o crescimento de muitos folículos de uma onda folicular, embora esta manipulação ocasione algumas restrições na qualidade do oócito, particularmente se estes estivessem designados para a atresia. Além disso, ovários superestimulados possuem um tamanho exacerbado que dificulta a manipulação manual para o posicionamento e aspiração dos folículos (Squires, 1996).

O trabalho em aspiração folicular descrito por Vogelsang et al. (1988) incluiu EPE para estimular o desenvolvimento folicular. Uma taxa de recuperação maior foi observada em éguas tratadas em comparação às não tratadas (45% x 16%). Ao contrário, Bruck & Greeve (1997) relataram que o tratamento, de quatro dias, com FSH suíno (100 mg/dia) não melhorou a taxa de recuperação comparando-se com as éguas não tratadas. Cook et al. (1993) relataram uma baixa taxa de recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios de éguas tratadas com EPE: uma média de três folículos pré-ovulatórios se desenvolveu por

égua em cada ciclo estral, com taxas de recuperação de 61% contra 84% em folículos de ciclos normais das éguas não tratadas.

Uma das principais perguntas quanto à técnica de aspiração folicular é se esta impõe alguma seqüela a fertilidade da égua em repetidas aspirações. Para responder esta pergunta, Bruck et al. (1997) aspiraram folículos por cinco ciclos consecutivos em dois diferentes intervalos, o primeiro a cada seis dias (A1, B1 e C1) e o segundo com intervalo ≥ 23 dias (A2, B2 e C2). Neste estudo foram aspirados todos os folículos ≥ 5 mm em três grupos: A) aspiração e lavagem do folículo usando uma seringa 60mL, B) aspiração e lavagem do folículo usando uma bomba de vácuo, C) aspiração e lavagem do folículo usando uma bomba de vácuo após quatro dias de tratamento com 100mg de FSHp, administrado uma vez ao dia via intramuscular. Para o lavado dos folículos, foi utilizado DPBS com 100UI/ML de heparina. Os resultados estão ilustrados nas tabelas a baixo:

Intervalo das aspirações	Técnica	Nº de aspirações	Diâmetro dos folículos aspirados (mm)				
			5-10	11-20	21-30	31-40	Total
6 dias	A1	3	11	14	-	1	26
	B1	5	10	18	3	-	31
	C1	5	17	24	5	-	46
≥ 23 dias	A2	4	6	13	4	1	24
	B2	5	23	21	2	1	47
	C3	2	18	17	3	-	38
Total		24	85	107	17	3	212

Grupo	Estágio de desenvolvimento nuclear do oócito					Total
	VG	VGBD	MI	MII	Degenerado	
B1	8	2	1	2	-	13
B2	-	3	-	-	2	5
C1	8	3	-	-	-	11
C2	2	3	-	-	2	7
Total	18	11	1	2	4	36

Os resultados, das tabelas acima, mostraram que as aspirações repetidas a cada seis dias teve uma menor taxa de recuperação dos oócitos em relação as

aspirações a cada ≥ 23 dias, entretanto as duas técnicas de aspiração folicular (seringa e bomba de vácuo) não houveram diferença.

Em um outro trabalho mais recente, Mari et al. (2005) realizaram três a quatro aspirações consecutivas de 20 éguas em fase de estro (folículo ≥ 35 mm de diâmetro) e diestro (folículo ≥ 20 mm de diâmetro), perfazendo um total 76 ciclos aspirados, 153 folículos aspirados e 31 oócitos recuperados. Foi comparado também a taxa de recuperação de oócitos de folículos apenas aspirados e de folículos aspirados/lavados, o que resultou em 46,4% e 12,5% de oócitos recuperados respectivamente aos grupos anteriores em éguas em fase de estro, para as éguas em fase de diestro a taxa de recuperação foi de 30,0% e 26,7%, respectivamente. Das 20 éguas aspiradas, 10 foram inseminadas e sete (7) ficaram prenhas. Contudo, aspirações foliculares não interferem na taxa de prenhes, e que há uma melhor recuperação de oócitos em éguas com folículos pré-ovulatórios através da aspiração/lavagem folicular.

A recuperação de oócitos de éguas prenhas parece ser mais alta comparada a éguas controle. Goudet et al. (1998) relatam índices de recuperação de oócitos de 54% em éguas prenhas vs 47% em éguas cíclicas. Meintjes et al. (1995) obtiveram 75% de recuperação de oócitos em éguas prenhas contra 42,9% no grupo controle de éguas com folículos pré-ovulatório. Onze aspirações foram realizadas por éguas num período de 44 dias (entre os dias 22 a 66 de gestação) com um máximo de sete (7) oócitos sendo recuperados por seção. Em um segundo estudo, (Meintjes et al., 1997) as aspirações foliculares foram realizadas até os 150 dias de gestação. O número médio de aspirações por égua foi de 7,6 e o número médio de oócitos obtidos 18,9 por égua. Os autores concluíram que cerca de 2,5 oócitos podem ser coletados a cada sete a 10 dias em éguas prenhas. Foi estimado que 19 oócitos poderiam ser coletados de uma mesma égua durante os dias 21 a 150 de gestação, comparado com 12 coletados durante 130 dias em éguas ciclando, sem estímulo hormonal. Cochran et al. (1998) aspirou em média 13 folículos por seção com índices de recuperação de 66% em 20 aspirações realizadas entre os dias 14 e 70 de gestação.

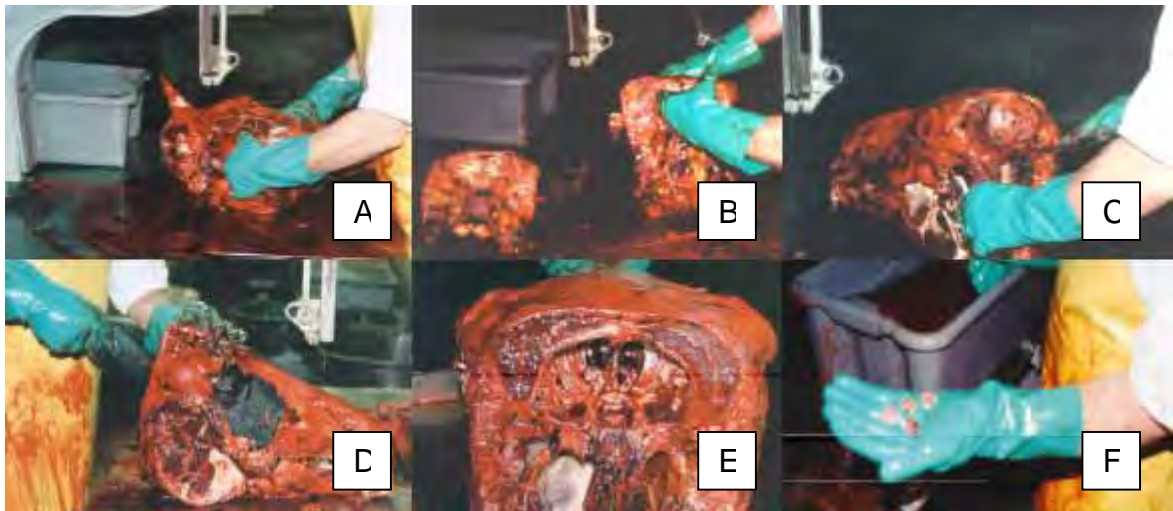
4. EXPERIMENTOS

4.1 Preparação do extrato de pituitária eqüina

O extrato de pituitária eqüina foi preparado segundo o método proposto por Guillon & Combarous (1983) no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ/UNESP), Campus de Botucatu - SP. As pituitárias foram adquiridas em frigorífico de eqüino, localizado na cidade de Pelotas-RS, sendo congeladas (-20°C) e conduzidas ao laboratório do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (FMVZ/UNESP). Para a extração das pituitárias, foi realizado um corte oblíquo caudo/cranial na região caudal ao pavilhão auricular e mandibular; após a remoção do encéfalo a pituitária pode ser visualizada na célula túrsica, sendo removida com o auxílio de uma espátula (figura 01). Ao serem processadas, estas foram descongeladas e banhadas em água destilada/deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com solução de 40% de etanol, álcool etílico P.A. (Laboratório Dinâmica[®], São Paulo), e 6% de acetato de amônia (Laboratório Synth[®], São Paulo-SP). A fração ativa foi então precipitada aumentando-se a concentração de etanol em 80%, tendo sido em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20°C.

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

Os níveis de FSH e LH presente no EPE, foram avaliados na Universidade da Califórnia, Davis – EUA através da técnica de radioimunoensaio (R.I.A), onde foram detectados níveis de 480µg e 340µg para LH e FSH, respectivamente.



- A: Corte cranial ao pavilhão auricular
- B: Remoção de todo o cérebro
- C/D: Extração da pituitária
- E: Fossa da célula tursica
- E: Demonstração de quatro pituitárias

Figura 01: Procedimento em abatedouro de eqüino para extração da pituitária.

4.2 EXPERIMENTO I

“ESTUDO DO TRANSPORTE DOS OÓCITOS PARA O OVIDUTO DE ÉGUAS SUPEROVULADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA”

4.2.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas

Foram monitorizados dois ciclos estrais de cada égua sendo o primeiro ciclo usado para detecção do dia da ovulação (D0) e o segundo ciclo a ser superovulado.

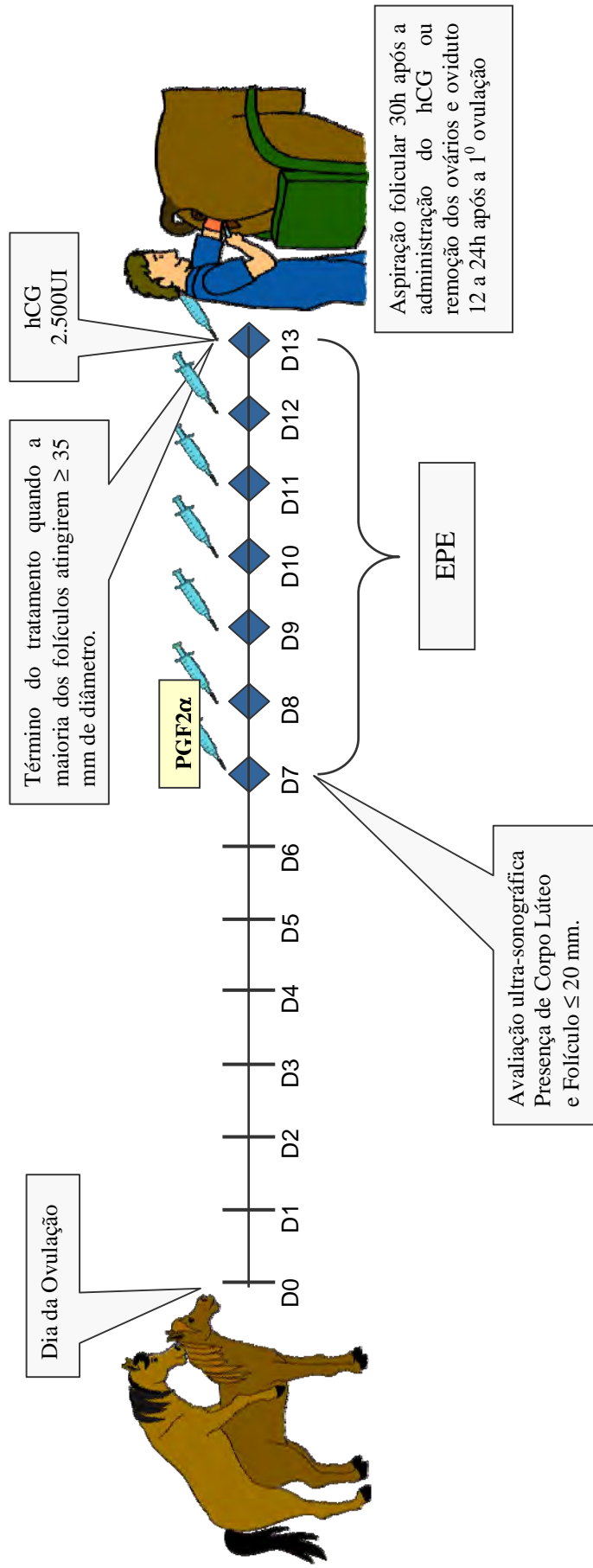
A detecção do cio das éguas foi realizada diariamente e individualmente em troncos de contenção, com o auxílio de um rufião. O tratamento superovulatório (Extrato de Pituitária Equina) foi iniciado no 7º dia pós-ovulação, sendo estipulado para ser iniciado o tratamento a presença de corpo lúteo e folículos não maiores que 20mm. A dose administrada do EPE foi de 25mg por via intramuscular em intervalos regulares de 12h. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ (250µg/dia de cloprostenol) foi administrada no primeiro e segundo dia do início do tratamento superovulatório. O tratamento foi interrompido quando a maioria dos folículos atingiu 35mm de diâmetro; sendo neste momento administrado 2500UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana - Vetecor® Laboratório Calier, São Paulo, SP) por via intravenosa, visando acelerar o processo da maturação folicular e oocitária.

O esquema detalhado do tratamento superovulatório está descrito a seguir:

- Primeiro dia do tratamento (7º dia pós-ovulação): iniciou-se no período da manhã (7:00 h) administrando-se 25mg/IM do EPE e após uma hora a $\text{PGF}_{2\alpha}$ 250µg/IM. No período da tarde (18:00 h), aplicou-se 25mg/IM do EPE.
- Segundo dia do tratamento: pela manhã (7:00 h), administrou-se 25mg/IM do EPE e uma hora mais tarde a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (250µg). No período da tarde (18:00 h) aplicou-se 25mg/IM do EPE.

- Do terceiro dia a no máximo dez dias de tratamento: aplicou-se o EPE pela manhã (7:00 h) e à tarde (18:00 h) sempre utilizando 25mg/IM.
- Quando a maioria dos folículos atingiu 35mm de diâmetro foi suspenso o tratamento com EPE e administrado 2.500UI hCG (Vetecor) intravenosa.

A monitorização das éguas controle foi realizada assim como as superovuladas, tendo sido utilizada solução fisiológica seguindo o mesmo protocolo do grupo superovulado.



◆ EPE 25mg 7:00h / 25mg 19:00h

Figura 02: Esquema do tratamento superovulatório com extrato de pituitária eqüina.

4.2.1.2 Animais

O experimento foi desenvolvido na Universidade de Rio Cuarto (Argentina) utilizando-se 22 éguas mestiças divididas aleatoriamente em dois grupos: 1) Grupo superovulatório (13 éguas) submetidas ao tratamento superovulatório com EPE utilizando-se do mesmo protocolo descrito anteriormente; 2) Grupo controle (09 éguas), tratamento com solução fisiológica seguindo o mesmo protocolo superovulatório. Os animais estavam em bom estado geral de saúde, com idade variando entre quatro a 14 anos, massa corpórea de 400 a 600Kg e com histórico reprodutivo normal. As éguas ficaram alojadas em um piquete do frigorífico de equinos, localizado em Rio Cuarto, Argentina, próximo da Universidade de Rio Cuarto (5Km), com livre acesso a água e feno de alfafa. Estes animais receberam previamente ao experimento um manejo sanitário adequado (vermifugação, banho com carrapaticida) Figura 03.



Figura 03: Animais alojados no frigorífico, os quais foram utilizados no experimento de transporte de oócito para o oviduto de éguas superovuladas.

4.2.1.3 Monitorização das éguas

Foram utilizados dois ciclos estrais de cada égua sendo o primeiro para monitorização da ovulação e o segundo a ser tratado (EPE ou solução fisiológica).

Após início do tratamento, os ovários e útero destas éguas foram monitorados duas vezes ao dia através da palpação retal e da ultra-sonografia (ALOKA – 500), Figura 04. Os tratamentos foram interrompidos quando a maioria dos folículos

atingiu um diâmetro médio de 35mm e então administrado o hCG. Os animais foram abatidos entre 12 e 24h após a detecção da primeira ovulação, sendo removido todo o aparelho reprodutivo interno (útero e ovários) e armazenados em uma caixa térmica com uma solução de DPBS pré-aquecida (37⁰C), onde então foi conduzido ao laboratório da universidade (tempo decorrente do abate a extração dos ovários e ovidutos de 30min).



Figura 04: Éguas contidas para controle folicular nas dependências do Frigorífico AIMAR.

Ao chegar no laboratório os ovários e ovidutos foram separados. Os ovários foram avaliados macroscopicamente e os ovidutos dissecados e lavados com 20mL de DPBS + 10% Soro Fetal (37⁰C) para recuperação dos oócitos (Figuras 05 e 06). As características morfológicas dos oócitos (degenerado, compacto, desnudado e expandindo – Losinno, 2006) foram realizadas imediatamente após a sua localização, utilizando um estereomicroscópio (Figura 07). Após esta classificação, os oócitos foram corados com o fluorocromo MITO TRACKER DEEP RED 633 (M22462), para serem avaliados quanto ao grau de maturação nuclear (Losinno, 2006).



Figura 05: Útero, ovários e oviduto de éguas superovuladas.

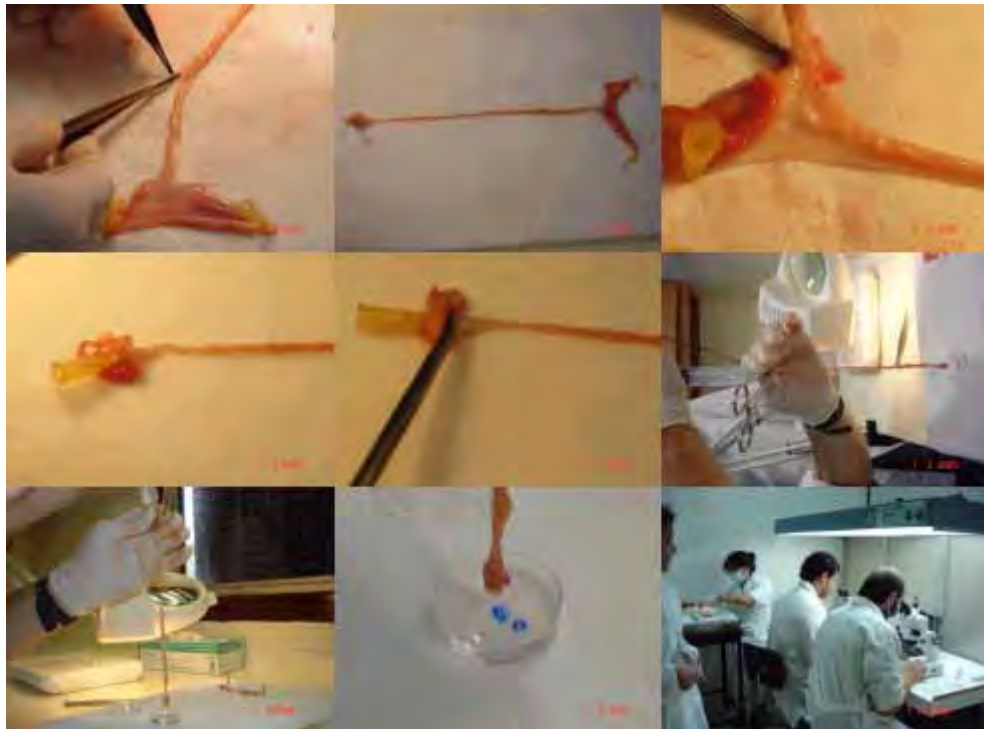


Figura 06: Dissecação, lavagem do oviduto e procura do oócito.

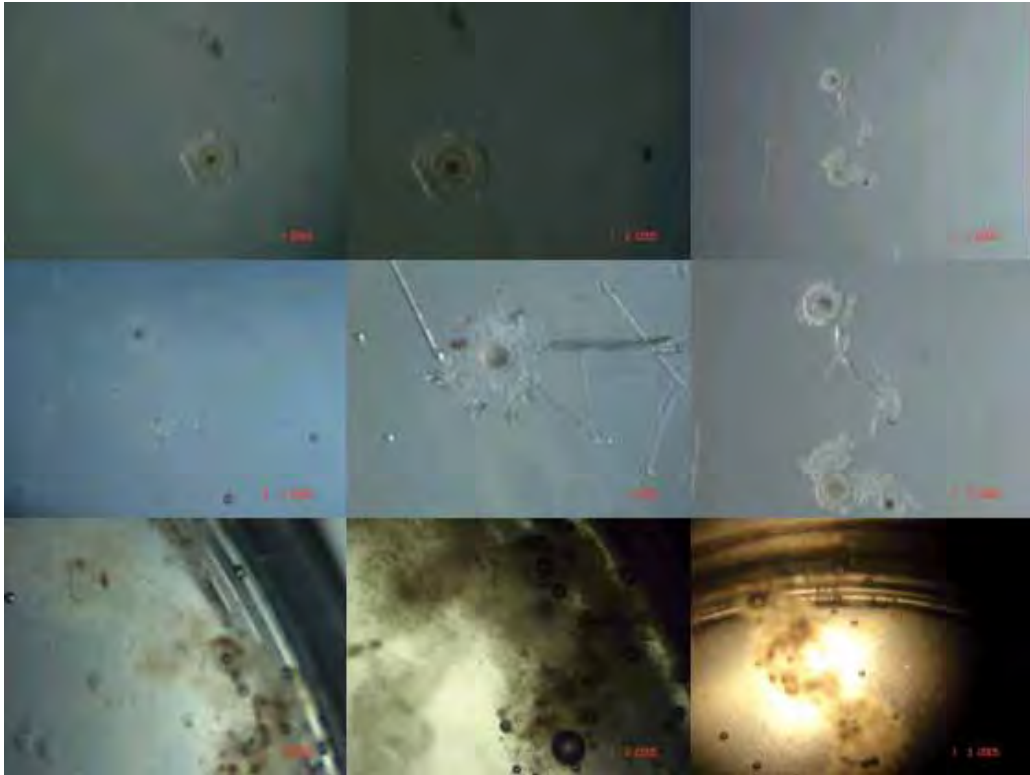


Figura 07: Oócitos e células do cumulus recuperados do oviduto de éguas superovuladas e controle.

4.2.1.4 Análise estatística

Para a comparação de proporções foi utilizado o teste Exato de Fisher. O nível de significância foi de 5%.

Para avaliar o número médio de ovulações, de oócitos viáveis e degenerados por égua, e o diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório foi utilizado o Teste t de Student.

4.2.2 RESULTADOS

Neste experimento foram avaliadas 22 éguas, sendo 09 (nove) destas tratadas com solução fisiológica (grupo controle) e 13 tratadas com extrato de pituitária eqüina (grupo superovulado), resultando um total de 73 ovulações (11 e 62 respectivamente).

O grupo controle apresentou 22% (2/9) dos animais com dupla ovulação e 88% (7/9) com simples, já no grupo tratado com EPE 8% (1/13) com ovulação simples, 23% (3/13) com dupla ovulação e 69% (9/13) com ≥ 3 ovulações ($p < 0,05$). Desta forma as éguas tratadas com EPE apresentaram um número significativamente maior de ovulações ($p < 0,05$), ou seja, o quadruplo (média = 4,77 ovulações) em relação às éguas controle (média = 1,22 ovulações), o que também foi significativo ($p < 0,05$) quando comparado o número médio de oócitos viáveis recuperados/égua no grupo superovulado (3,08) em relação ao grupo controle (1,11), havendo um total de 49 oócitos recuperados no grupo superovulado (40 oócitos viáveis/09 oócitos degenerados) e 13 oócitos no grupo controle (10 oócitos viáveis/03 oócitos degenerados). Quanto ao percentual de oócitos viáveis recuperados/ovulação houve tendência ($p = 0,07$) para um menor número nas éguas superovuladas (90% grupo controle e 64% grupo superovulado, Tabela 1).

Quando unidos os dois grupos (controle/superovulado) e avaliados o percentual de oócitos recuperados por ovulações simples, dupla e tripla e múltiplas (>3 ovulações) observou-se um maior percentual de recuperação ($p < 0,05$) para as ovulações simples (87%) e dupla/tripla (92%) em relação às ovulações múltiplas (48%).

A média dos dias de tratamento com solução fisiológica (controle) e EPE (superovulado) foi de 9,89 e 7,54, respectivamente, havendo uma tendência do grupo superovulado apresentar um crescimento folicular mais rápido que o grupo controle ($p = 0,059$). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado o tempo da administração do hCG à primeira ovulação e a última ovulação entre o grupo controle ($41,43 \pm 6,19$ h e $41,42 \pm 6,19$) e superovulado ($33 \pm 16,97$ e $42,33 \pm 11,14$ – Tabela 1).

O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi significativamente maior no grupo controle ($41,45 \pm 3,56$ mm) quando comparado ao superovulado ($37,27 \pm 4,02$ mm).

Foi observado na região da fossa de ovulação na maioria das éguas superovuladas a presença de uma grande quantidade de coágulo de sangue, já nas éguas do grupo controle, este coágulo nem sempre estava presente e quando presente apresentava-se bem menos evidente.

Tabela 01: Média e desvio padrão das diferentes variáveis estudadas no grupo tratado com extrato de pituitária eqüina e controle.

GRUPO	CONTROLE (SOL. FISIOL.)	SUPEROVULADA (EPE)	VALOR DE P
Nº de éguas	09	13	-
Nº de éguas com ≥ 2 ovulações	02 ^b	12 ^a	P=0,03
Nº de éguas com ≥ 3 ovulações	0 ^b	9 ^a	P<0,01
Total de ovulações	11 ^b	62 ^a	P<0,05
Total de oóc. viáveis recuperados	10 ^b	40 ^a	P<0,05
Total de oóc. degenerados recuperados	03 ^b	09 ^a	P<0,05
Nº médio de ovulações/égua	$1,22 \pm 0,44^b$	$4,77 \pm 3,06^a$	P=0,003
Nº médio de oóc viáveis recuperados/égua	$1,11 \pm 0,6^b$	$3,08 \pm 2,22^a$	P=0,018
Nº médio de oóc degenerados recuperados/égua	$0,33 \pm 0,5^a$	$0,85 \pm 1,34^a$	P=0,29
% oóc viáveis recuperados/ovulação	90 ^a	64 ^a	P=0,07
Intervalo médio entre ovulações (h)	0 ^b	6,46 ^a	P=0,025
Média dos dias de tratamento (dias)	$9,89 \pm 3,69^a$	$7,54 \pm 1,76^a$	P=0,059
Intervalo médio da administração do hCG a primeira ovulação (h.)	$41,43 \pm 6,19^a$	$33 \pm 16,97^a$	P=0,068
Intervalo médio da administração do hCG a última ovulação (h.)	$41,42 \pm 6,19^a$	$42,33 \pm 11,14^a$	P=0,399
Diâmetro médio do fol pré ovulatório (mm)	$41,45 \pm 3,56^a$	$37,27 \pm 4,02^b$	P=0,002

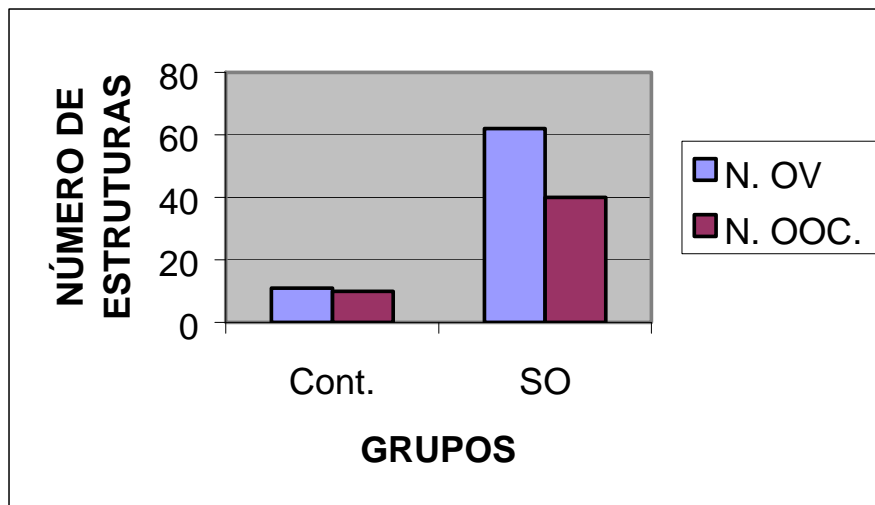
Tabela 02: Número de ovulações por ovário e de oócitos recuperados do oviduto de éguas do grupo controle.

GRUPO CONTROLE (SOL. FISIOL.)				
ÉGUAS	NUMERO DE OVULACOES		NUMERO DE OOCITOS	
	OE	OD	OE	OD
01	2	0	2	0
02	0	1	0	1
03	1	0	0	0
07	1	0	1	0
10	1	0	1	0
14	0	1	0	1
313	1	0	1	0
315	1	1	1	1
320	0	1	0	1
Sub.tota l	6	5	5	5
TOTAL	11		10	

Tabela 03: Número de ovulações por ovário e de oócitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina.

GRUPO SUPEROVULAÇÃO (E.P.E.)				
ÉGUAS	NUMERO DE OVULACOES		NUMERO DE OOCITOS	
	OE	OD	OE	OD
05	3	3	0	1
08	2	4	2	2
11	0	1	0	1
12	1	1	1	1
13	1	1	1	1
15	0	2	0	1
309	4	5	2	2
307	2	2	2	0
311	2	1	2	1
312	3	1	3	1
314	2	2	2	0
318	4	4	1	4
319	7	4	7	2
Sub total	31	31	23	17
TOTAL	62		40	

- OD = Ovário Direito / OE = Ovário Esquerdo



- N OV= Número de ovulações
- N OOC= Número de óocitos recuperados
- Cont.= Grupo controle
- SO= Grupo superovulado

Figura 08: Percentual médio de ovulações e óocitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina e grupo controle.

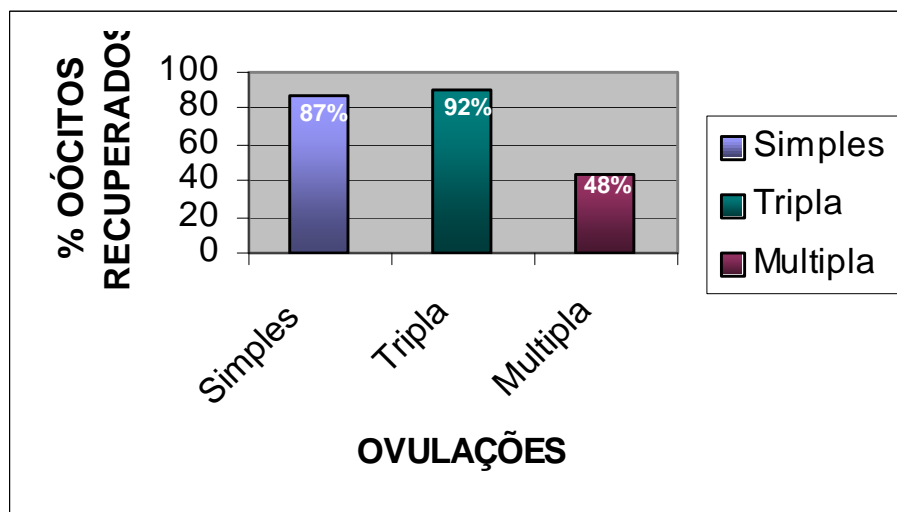


Figura 09: Percentual de óocitos recuperados em relação ao número de ovulações.

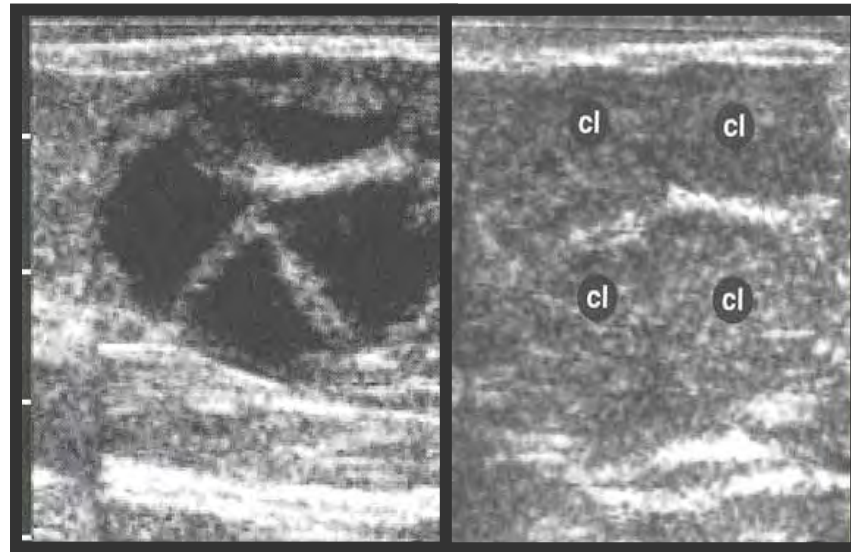


Figura 10: Resposta superovulatória de uma égua tratada com extrato de pituitária eqüina (4 folículos/4 corpos lúteos)

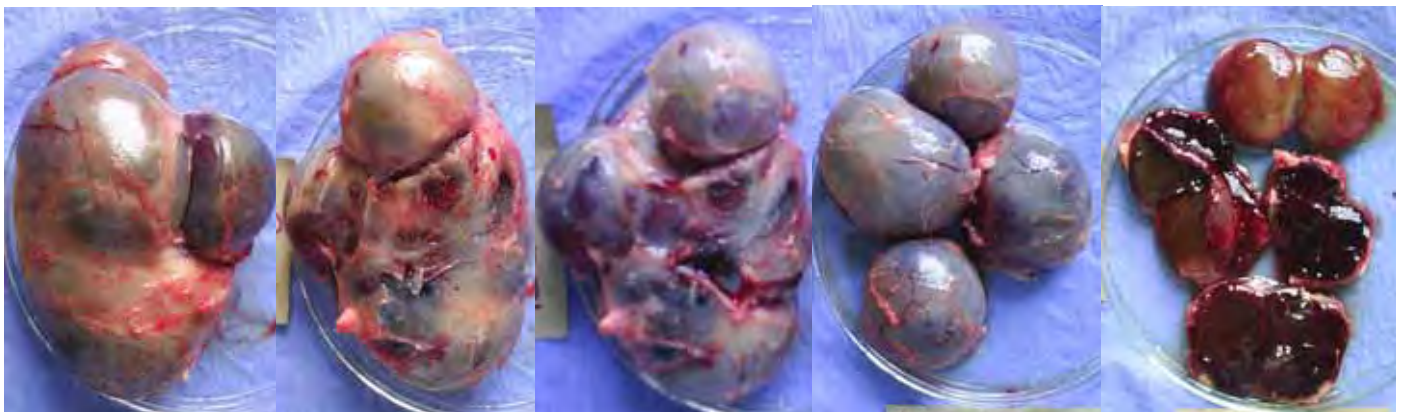
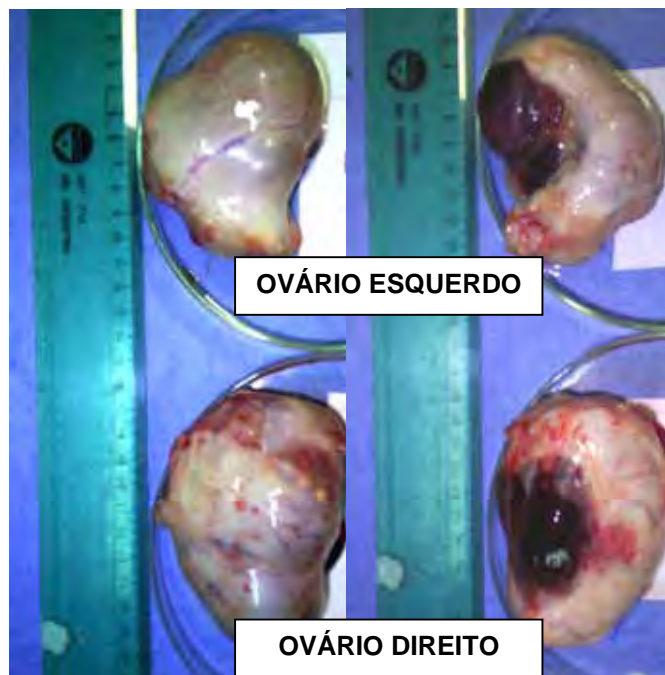
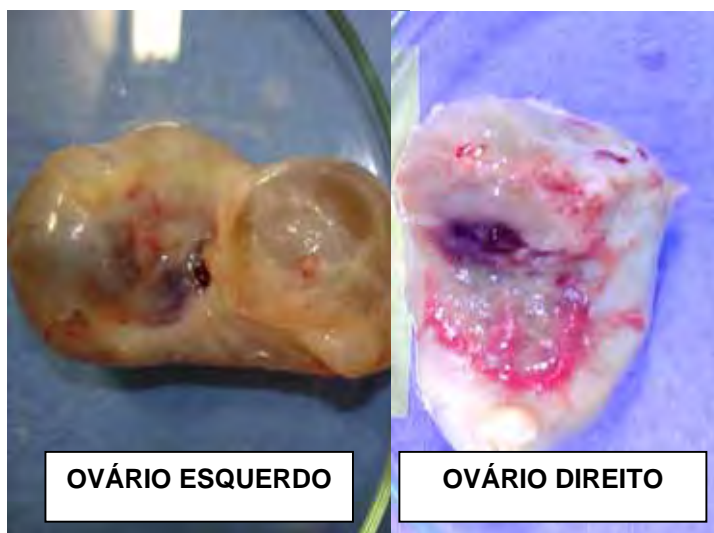


Figura 11: Dissecação do ovário de uma égua superovulada (4 ovulações) com extrato de pituitária eqüina, demonstrando os corpos hemorrágicos



OE: 3 ovulações/0 oócito
OD: 3 ovulações/1 oócito

Figura 12: Presença de grande coágulo de sangue na fossa de ovulação de uma égua do grupo superovulado, a qual apresentou seis (6) ovulações sendo três (3) por ovário.



OE: 1 ovulações / 1 oócito
OD: 1 ovulações / 1 oócito

Figura 13: Presença de pequeno coágulo de sangue na fossa de ovulação de uma égua do grupo superovulado, a qual apresentou duas (2) ovulações sendo uma (1) em cada ovário.



OE: 1 ovulação / 1 oócito
OD: 0 ovulação / 0 oócito



OE: 2 ovulação / 2 oócito
OD: 0 ovulação / 0 oócito

Figura 14: Presença de pequeno coágulo de sangue na fossa de ovulação em duas éguas do grupo controle com diferentes números de ovulações.

4.2.3 Discussão

A superovulação tem por objetivo induzir um maior número de ovulações e subsequentemente aumentar a taxa de óocitos fertilizados. Há mais de duas décadas vários esforços têm sido realizados com o intuito de investigar os fatores que influenciam na resposta superovulatória em vaca e em éguas, identificando vários fatores que possam interferir no desenvolvimento folicular e na ovulação.

Os fatores que afetam a resposta superovulatória, assim como a produção de embriões, pode ser divididos em fatores intrínsecos (idade, raça, variações causadas pela presença de um folículo dominante, dentre outros) e fatores extrínsecos (estação do ano, ambiente, nutrição, variações nas drogas utilizadas na superovulação e outros).

O esforço na elaboração deste experimento, desenrolo dos dados e promoção de uma discussão dos nossos achados frente aos trabalhos científicos anteriormente desenvolvidos, teve por finalidade contribuir conhecimentos sobre a superovulação na espécie eqüina.

O extrato de pituitária eqüino utilizado neste experimento, consistentemente induziu o crescimento de múltiplos folículos em éguas, assim como descrito por Carmo (2003), o qual administrou 25mg desse produto duas vezes ao dia, obtendo uma média de 4,0 ovulações/égua, número este similar aos nossos achados (4,7 ovulações/égua), empregando o mesmo protocolo. Nossos resultados foram superiores aos obtidos por Wood & Ginther (1983), Rosa et al., (1988) e Bézard et al., (1995) com 2,9; 3,0 e 2,39 ovulações por égua, respectivamente, quando do uso de EPE uma vez ao dia.

Já Alvarenga et al. (2001) obtiveram um maior número de ovulações (7,1) do que os nossos achados. O número médio de embriões recuperados/égua por estes autores foi de 3,5. Estes valores seriam extremamente animadores se não fosse o fato de uma égua ter apresentado 18 ovulações com nove embriões recuperados.

A espécie eqüina é monovulatória, havendo contudo predisposição raciais e individuais para ovulações duplas espontâneas. Todos os animais utilizados neste experimento tiveram ciclos anteriores monitorizados não possuindo predisposição para múltiplas ovulações espontâneas sendo observado um percentual de 92% (12/13) de éguas com duas ou mais ovulações quando tratada com EPE e 22% (2/9) para éguas controles tratadas com solução fisiológica. Estes dados são compatíveis

aos descritos por Douglas (1979), Woods & Guinther (1977), Squires et al. (1987ab), Scoggin et al. (2002) e Carmo (2003) onde 86%, 70%, 92%, 84% e 90% de éguas apresentaram múltiplas ovulações, respectivamente, após o tratamento superovulatório com EPE.

O percentual de oócitos viáveis recuperados do oviduto de éguas superovuladas e não superovuladas foi de 64 e 90% respectivamente, semelhantes aos resultados de Carmo et al. (2006), os quais observaram uma diminuição no percentual de oócitos recuperados do oviduto de éguas superovuladas com EPE, sendo estes resultados também consistentes com a baixa taxa de recuperação de embriões por ovulação relatada por Alvarenga et al. (2001) utilizando a mesma dose de EPE de nosso experimento e por Peres et al. (2005) utilizando FSHe.

As causas da baixa taxa de recuperação embrionária em éguas superovuladas é ainda uma incógnita, levando-nos a questionar se este problema está relacionado à captação dos oócitos para o interior do oviduto, a maturação oocitária ou por alteração folicular ou infundibular e a fertilização. Os altos níveis de LH encontrados no extrato de pituitária eqüina é considerado um fator deletério à maturação oocitária tanto em bovinos (Donaldson et al., 1986).

Contudo de todos estes fatores relacionados acima, em nosso experimento observamos que as alterações no mecanismo de captação oocitária é um fator decisivo, já que o número médio de oócitos viáveis recuperados por ovulação em nosso experimento no grupo superovulado foi de 0,6 (oócitos), número este inferior ao grupo controle com 0,9 (oócitos).

A esta questão, se impõem alguns mitos, como os levantados por Onuma & Ohnami (1975) e Liu et al. (1991), onde foram pertinentes em propor uma falha na captação dos oócitos pela fímbria do infundíbulo sendo em decorrência do líquido folicular apresentar uma consistência “gelatinosa”, o que poderia reter o oócito, impedindo-o de migrar para o interior do infundíbulo ou mesmo bloqueando o lúmen do oviduto evitando a migração do embrião do oviduto para o útero. Já Palmer et al. (1993) acreditam que a baixa taxa na recuperação de embriões é conseqüência da não fertilização do oócito em função da falha da liberação deste pelo folículo, observação esta difícil de ser suportada, pois desde que ocorram as ovulações os oócitos serão liberados.

Já Dippert et al. (1994) afirmaram não haver diferença na recuperação de oócitos de éguas tratadas com EPE e não tratadas, onde o percentual médio de

recuperação de estruturas (ócitos e/ou embriões) do oviduto de éguas superovuladas foi de 62% (51 ovulações e 32 estruturas), e para o grupo não superovulado de 68% (16 ovulações e 11 estruturas), obtendo uma média de 3,5 e 1,1 ovulações, respectivamente. Corroborando com nossos achados onde a recuperação de ovócitos /ovulação se aproxima do normal quando temos menos de 3 ovulações por égua tratada com EPE.

Contudo, dos poucos estudos realizados até o presente momento, não houve nenhuma citação quanto a diferença na massa de coágulo de sangue que se forma na fossa de ovulação como demonstrado em nosso estudo. Observamos a formação de um grande coágulo em éguas com múltiplas ovulações no mesmo ovário ao contrário das éguas que apresentam ovulações simples, duplas e triplas. Acreditamos que este fator possa ser um fator importante na queda observada da taxa de recuperação de embriões em éguas que apresentam várias ovulações no mesmo ovário. Alterações no mecanismo de coagulação ou mesmo um maior sangramento de folículos de éguas superovuladas com resposta ovariana exacerbada podem estar relacionadas a uma inadequada produção de fatores de coagulação (fibrinogênio e antitrombina) bem como de agentes anticoagulantes . Kim et al., (2006) observaram uma inadequada expressão de fatores de coagulação no líquido folicular de mulheres com aborto espontâneo recorrente.

Fica claro perante aos nossos resultados que existe queda significativa do número de óócitos/ovulações quando ocorrem ovulações de um número maior que três (3) folículos.

Se observarmos na tabela 02 e 03 o percentual de óócitos recuperados por ovário que apresentou duas ou três ovulações e resultou em 100% (recuperação total de óócitos/ovulação) de recuperação foi de 63% (7/11) dos ovários. Já nos ovários em que ocorreram quatro ou mais ovulações o percentual de 100% de recuperação de óócito/ovulação foi de 14% (1/7) dos ovários.

Os nossos percentuais de óócitos recuperados por ovulações duplas e triplas (92%) são similares aos de ovulações simples (87%), vindo a ser concordante com os achados de Alvarenga et al. (2001) os quais observaram uma maior taxa de recuperação de embriões (70%) por ovulação em éguas que apresentaram uma menor média de ovulações (2,4 ovulações) quando comparados com éguas com muitas ovulações (7,1 ovulações e 49% de embriões recuperados).

Este baixo percentual de recuperação de embriões relatados por estes autores (49%) é similar ao percentual de 55% de oócitos recuperados por ovulações demonstrados em nosso experimento quando observamos quatro ou mais ovulações.

Rocha Filho et al. (2005) e Farinasso et al. (2005), utilizando baixas doses de EPE obtiveram em média o desenvolvimento de dois folículos um embrião por lavado, por outro lado Carmo (2003) quando utilizou altas doses de EPE obteve uma média de cinco folículos e 45% de embriões recuperados por ovulação. O mesmo já havia sido relatado por Douglas (1979) onde o percentual de embriões recuperados por ovulações no grupo tratado com EPE foi de 35% e no grupo não superovulado de 67%.

Um outro fator que indica ocorrer alterações no desenvolvimento folicular de éguas superovuladas diz respeito as diferenças nos diâmetros dos folículos pré-ovulatório. Em nosso trabalho o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório observado em éguas superovuladas foi menor que os das éguas controle (37,27mm / 41,45mm, respectivamente), dados que são similares aos descritos por Ginther (1992), quando comparou o diâmetro médio dos folículos pré-ovulatório de ovulações simples e duplas, descrevendo o diâmetro de 44mm para ovulações simples e 35mm e 40mm para ovulações duplas unilaterais e bilaterais, respectivamente. Em vacas superovuladas os folículos pré-ovulatórios apresentam um diâmetro 20% a 30% menor que as não superovuladas, apresentando também um crescimento folicular mais acelerado (Driancourt et al., 1991). Já em ovelhas superovuladas tem-se observado uma grande variação no tamanho dos folículos e no número de células da granulosa por folículos (Driancourt & Fry, 1992).

4.3 EXPERIMENTO II

“EFEITO DA SUPEROVULAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS QUANDO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRAFIA”

4.3.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas

A monitorização e o tratamento das éguas do grupo superovulatório (Extrato de Pituitária Eqüina) e controle foram realizados conforme descrito no experimento I. As aspirações foliculares foram realizadas 30h após a administração do hCG.

4.3.1.2 Animais

Foram utilizadas 24 éguas divididas aleatoriamente em dois grupos G1 - éguas superovuladas (n=12), e G2 - éguas controle (n=12), em bom estado geral de saúde, com idade variando de quatro a 14 anos, massa corpórea entre 400 a 600Kg e com bom histórico reprodutivo. Estes animais foram mantidos em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo, suplementação mineral em um consumo médio diário de 70 g, ração fornecida uma vez ao dia em um total de três quilos/égua, o feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) sendo ofertado duas vezes ao dia, em um total de 10 quilos/égua.

O experimento foi realizado no Posto de Monta da Fazenda Lajeado, UNESP localizado no município de Botucatu, estado de São Paulo, e no Polo regional da Alta Mogiana localizado na cidade de Colina, estado de São Paulo.

4.3.1.3 Obtenção do oócito

Após a higienização da região perivulvar, as éguas foram sedadas com a associação de Xilazina 10% (0,5mg/kg, Sedazine[®] Fort Dodge) e Acepromazina 1% (0,05mg/kg, Acepran[®] Univet), e administrado 0,14mg/kg de Brometo de Hoxima (Buscopan[®] Boehringer Ingelheim do Brasil) via venosa, com a finalidade de

diminuir o peristaltismo para uma melhor manipulação ovariana pelo reto. Todos os folículos maiores que 35mm foram aspirados, utilizando uma agulha de lume duplo modelo Cook (12-GA-Cook Veterinary Products, Spencer, IN) acoplada a uma probe de aspiração (Nutricell, Campinas-SP) transvaginal guiada por ultra-som, (Figura 15). Após a recuperação do fluido folicular, o antro do folículo puncionado foi lavado com DPBS heparinizado (10%), visando a recuperação do oócito, conforme descrito por Coutinho da Silva (2004). O fluido folicular e o lavado intra-folicular foram individualmente inspecionados em um esteromicroscópio com aumento de 40x, para identificação do oócito.



Figura 15: Transdutor e guia de aspiração utilizada no experimento.

4.3.1.4 Análise estatística

Para a comparação de proporções foi utilizado o teste Exato de Fisher. O nível de significância foi de 5%.

Para avaliar o número médio de ovulações, de oócitos viáveis e degenerados por égua, e o diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório foi utilizado o Teste t.

4.3.2 RESULTADOS

Neste estudo foram utilizados 24 animais distribuídos aleatoriamente em grupo controle (n=12) e superovulado (n=12), observamos que o número total de folículos aspirados e o total de oócitos recuperados foram significativamente superiores ($p<0,05$) no grupo superovulado (58 e 14, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (12 e 8, respectivamente). O número médio de folículos aspirados/égua e o número médio de oócitos/égua também foi significativamente maior no grupo superovulado (4,73 e 1,17) em relação ao grupo controle (1,0 e 0,66). Entretanto o grupo controle apresentou um maior número médio de oócitos/folículo aspirado do que o grupo superovulado (0,66 e 0,25, respectivamente) , com $p<0,05$.

O percentual de oócitos recuperado/folículo aspirado foi maior no grupo controle (66%) do que no grupo superovulado (25%), porém o percentual de oócitos recuperados/égua foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo superovulado quando comparado ao grupo controle (116,7 e 66%).

Todas éguas superovuladas apresentaram dois ou mais folículos pré-ovulatórios, enquanto que no grupo controle, as éguas apresentaram apenas um folículo pré-ovulatório ($p<0,01$).

O número médio de dias de tratamento foi maior no grupo controle ($p<0,01$) do que no grupo superovulado (10,17 e 7,17, respectivamente), demonstrando que o tratamento com EPE acelera o desenvolvimento folicular.

O diâmetro médio dos folículos aspirados 30 horas após a administração do hCG foram de $40,75\pm 2,01$ e $39,25\pm 2,49$ nos grupos controle e superovulados, respectivamente não havendo diferença estatística entre os dois grupos ($p>0,05$).

Os resultados relacionados à aspiração folicular estão sumarizados nas tabelas 04, 05 e 06.

Tabela 04: Média e desvio padrão das diferentes variáveis avaliadas no experimento II do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina e do controle.

GRUPO	CONTROLE	SUPEROVULADAS	P
Nº de éguas	12	12	-
Nº de éguas com ≥ 2 fol. Pré-ov.	0 ^a	12 ^b	P<0,01
Total de Fol. Aspirados	12 ^b	58 ^a	P<0.01
Nº médio de fol. asp./égua	1,0 \pm 0,0 ^b	4,75 \pm 2,7 ^a	P<0,001
Total de oócitos recuperado	8 ^b	14 ^a	P<0,05
Nº médio de oóc/égua	0,66 ^b	1,17 ^a	P=0,013
Nº medio de ooc/fol. aspirado	0,66 ^a	0,25 ^b	P<0,05
% oóc recuperado / égua	66 ^b	116,7 ^a	P<0,05
% oóc recuperados/fol. aspirado	66 ^a	25 ^b	P<0,05
Média dos dias de tratamento (dias \pm DP)	10,17 \pm 0,94 ^a	7,17 \pm 0,89 ^b	P<0,01
Diâmetro médio dos folículos aspiração (mm \pm DP)	40,75 \pm 2,01 ^a	39,25 \pm 2,49 ^a	P=0,506

Tabela 05: Número de ovulações e de oócitos aspirados de folículos de éguas do grupo controle.

GRUPO CONTROLE (SOL. FISIOL.)				
ÉGUAS	NUMERO DE FOLÍCULOS ASPIRADOS		NUMERO DE OOCITOS RECUPERADOS	
	OE	OD	OE	OD
10	0	1	0	0
29	0	1	0	1
30	1	0	1	0
35 ^A	1	0	1	0
35B	0	1	0	1
46	1	0	0	0
54	1	0	0	0
58	1	0	0	0
101	0	1	0	1
212	0	1	0	1
263	1	0	1	0
Esmeralda	0	1	0	1
Sub.Total	6	6	3	5
TOTAL	12		8	

- OD = Ovário Direito
- OE = Ovário Esquerdo

Tabela 06: Número de ovulações e de oócitos aspirados de folículos de éguas do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.

GRUPO SUPEROVULAÇÃO (E.P.E.)				
ÉGUAS	NUMERO DE FOLICULOS ASPIRADOS		NUMERO DE OOCITOS RECUPERADOS	
	OE	OD	OE	OD
16	1	3	1	0
29b	2	1	1	1
46	1	2	1	1
54	3	4	1	0
60	2	1	1	1
100	2	2	2	0
112	6	4	0	0
140	2	2	0	0
256b	1	2	0	0
387	1	2	0	2
Jady	1	2	1	1
Colina	5	5	0	0
Sub.Total	27	30	8	6
TOTAL	57		14	

- OD = Ovário Direito
- OE = Ovário Esquerdo

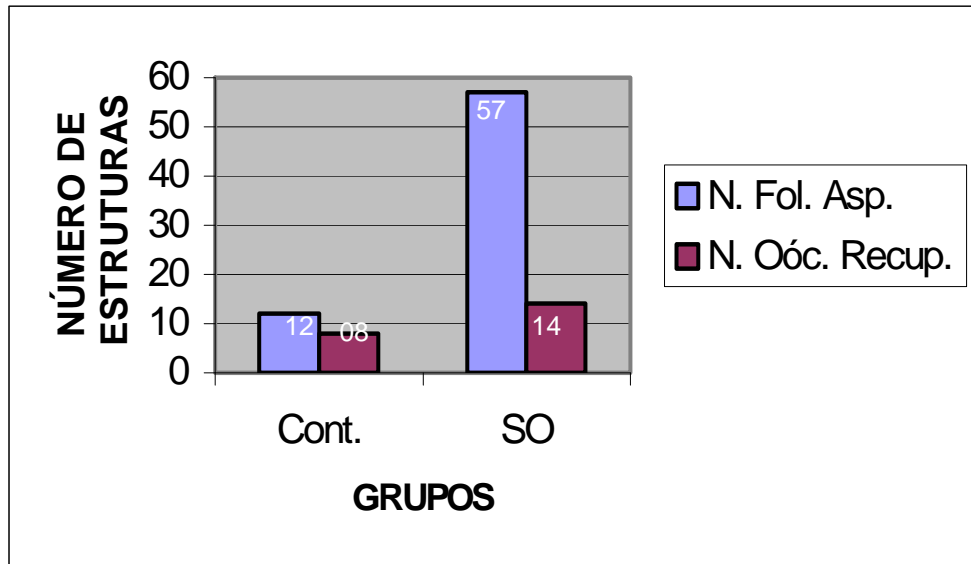


Figura 16: Número total de folículos aspirados e de oócitos recuperados de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina e solução fisiológica.

- **N FOL ASP.** = Número de folículos aspirados
- **N OÓC REC.** = Número de oócitos recuperados
- **Cont.** = Grupo controle
- **SO** = Grupo superovulado

4.3.3 DISCUSSÃO

Observamos em nosso experimento a recuperação de um maior número de oócitos por égua no grupo superovulado (1,17) quando comparado ao grupo controle (0,66), estes resultados são idênticos aos reportados por Bézard et al. (1995). Conforme esperado foram aspirados um maior número de folículos no grupo superovulado (4,75) do que o não superovulado (1,0). Entretanto o percentual de oócitos recuperados por folículo aspirado foi menor no grupo tratado com EPE (25%) quando comparado ao grupo controle (66%), o que discorda dos achados de Bézard et al. (1995) os quais obtiveram um percentual médio de oócitos recuperados de folículos pré-ovulatório de éguas tratadas e não tratadas de 60% e 79% respectivamente. Esta alta recuperação atribuída por estes autores pode estar relacionadas ao baixo número de ovulações (2,39) obtidas quando da superovulação. Acreditamos que o dobro da resposta superovulatória que obtivemos de éguas superovuladas em relação aos autores anteriores citados tenha interferido na recuperação dos oócitos.

Dentre as dificuldades que possam ter interferido na recuperação dos oócitos de éguas superovuladas, ressaltamos a grande quantidade de folículos presentes no ovário. Em função disto alguns destes foram perfurados acidentalmente e se perderam por estarem muito próximos uns dos outros. Um outro aspecto importante diz respeito a dificuldade de manipular o ovário após terem sido aspirados dois ou três folículos, ficando o ovário com uma consistência gelatinosa o que dificultou a sua manipulação.

Landim-Alvarenga (1999) relata uma série de fatores que possam interferir nos índices de recuperação de oócitos aspirados. Alguns destes fatores são: o sistema de punção, incluindo o uso de agulhas com lume simples ou duplo, a lavagem contínua do folículo, a curetagem ou não da parede do folículo com a agulha e o tamanho do folículo a ser aspirado. Além disso, outro fator é a experiência do técnico. Ao decorrer do experimento observamos uma maior facilidade na recuperação dos oócitos ao massagear o folículo contra a agulha e movimentando a agulha dentro do folículo sobre o estroma.

A grande dificuldade encontrada na recuperação de oócitos de folículos imaturos de éguas, é conseqüente de diferenças anatômicas da relação entre o oócito e o folículo. Uma das particularidades anatômicas desta estrutura em eqüinos é a presença de processos celulares emitidos pelas células da granulosa para o interior da camada de células tecais. Desta forma, os processos das células da granulosa, bem como a posição da camada de células tecais e a estrutura do componente polissacarídeo, funcionam como uma âncora do complexo Cumulus-oócito à parede folicular, dificultando desta forma a recuperação do oócito de folículos imaturos. Em éguas que estejam com folículos próximos a ovulação ocorre um afrouxamento desta estrutura, o que facilita a recuperação dos oócitos, aumentando desta maneira a taxa de recuperação (Hawley, 1995).

Palmer (1987) foi o primeiro a descrever uma técnica de aspiração com o animal em estação, onde o operador manipulava o ovário pelo reto e guiava uma agulha pelo flanco até os folículos. Os primeiros milímetros do fluido folicular eram reinjetados para recuperar o oócito e então o folículo era lavado com 20mL de solução Dulbecco com heparina. A taxa de recuperação obtida neste trabalho pioneiro foi 63% para folículos maiores que 35mm em éguas previamente tratadas com hCG, valores este semelhante aos nossos em éguas não superovuladas (66%) utilizando a técnica de aspiração via vaginal guiada pelo ultra-som (Bruck et al., 1992). Este mesmo percentual foi obtido por Vogelsang et al. (1988) ao coletar oócitos via punção transcutânea pelo flanco, usando uma agulha de 13G e 15cm de comprimento conectada a um tubo de látex e ligado a um sistema de irrigação contínua (60%), entretanto os índices foram menores ao utilizar uma seringa para aspiração (10%). Com a laparotomia, usando a mesma agulha, esta taxa também foi baixa (14%). Outro procedimento foi descrito por Hinrichs et al. (1991) com taxas de recuperação de 73% em folículos pré-ovulatórios de éguas tratadas com hCG, além da incisão pelo flanco, outra era feita em fundo de vagina, permitindo que o operador introduzisse sua mão na cavidade peritoneal e direcionasse o ovário diretamente contra a cânula.

Entretanto, todas estas técnicas envolvendo procedimentos cirúrgicos apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como aderências que limitam o número de vezes em que o procedimento pode ser repetido, infecções e complicações anestésicas, entre outros fatores.

A aspiração transvaginal guiada por ultra-som é um método não invasivo, relativamente simples punções repetidas de folículos imaturos e pré-ovulatórios em éguas. Em nosso experimento o procedimento foi bem tolerado e nenhum efeito colateral significativo foi notado, sendo que em todas as éguas ao final da aspiração era visualizado com um espelho o fundo de vagina e nenhuma laceração foi constatada, sendo observado apenas um pequeno ponto de coágulo de sangue, contudo 36h após a aspiração o fundo de vagina estava íntegro, assim com descrito por Bracher et al, (1993) que ao aspirarem éguas pelo fundo de vagina auxiliado por uma guia conectada ao ultra-som, não observaram qualquer anormalidade pós-aspiração.

A pressão de bomba de vácuo utilizada em nosso trabalho foi de 180 a 200mmHg, pressão esta satisfatória as nossas aspirações quanto a recuperação de oócitos, visto que testamos em uma fase pré experimental uma menor pressão de vácuo, não tendo sido verificado melhora dos resultados. Fato também observado por Kanitz & Berger (1995), os quais ao utilizarem uma pressão de 0,2 ou 0,4 bar ($1\text{mmHg} = 1,333 \times 10^{-3}\text{bars}$) não observaram diferença na taxa de recuperação (28,8% x 26,4%) em éguas.

Os índices de recuperação de oócitos também podem ser variáveis na dependência do calibre da agulha utilizada na aspiração folicular. Procuramos seguir a mesma linha de autores que trabalharam rotineiramente na recuperação de oócitos de éguas (Carnevale et al., 1993; Carnevale, 2005; Cook et al., 1993) utilizando agulhas modelo Cook de duplo lumen com calibre de 12g. Ao comparar agulhas de lúmen simples e duplo com calibre de 12g, Cook et al. (1993) observaram uma melhor recuperação de oócitos em folículos pré-ovulatório com agulha de duplo lúmen (84%) do que simples lúmen (52%). O que podemos observar é que a agulha de duplo lúmen permite um fluxo contínuo de fluido no folículo ao mesmo tempo em que é realizada a aspiração, facilitando assim o lavado e a escarificação interna do folículo.

Nosso índice de recuperação de oócitos/folículo no grupo controle (66%) foi similar aos obtidos por Mackinnon et al. (1987), Hinrichs et al. (1991) e Mari et al. (2005) os quais obtiveram um percentual de recuperação de 71,4%, 73% e 46,4% respectivamente, ao aspirarem folículos pré-ovulatórios de éguas previamente tratadas com hCG. Carnevale (2005) obteve uma taxa de recuperação de oócitos um pouco superiores aos nossos quando aspirados folículos pré-ovulatórios (77%),

entretanto as aspirações neste trabalho foram realizadas muito próximas as ovulações, o que aumenta a taxa de recuperação de oócitos Estes autores relatam também que a taxa de recuperação de oócitos foi maior quando se realizou a indução da ovulação com a associação do hCG com a desorelina do que com apenas um destes, como foi realizado por nós quando utilizamos apenas o hCG.

Cook et al. (1992) ao aspirarem folículos de éguas durante os dias sete (7) a nove (9) do diestro com diâmetro entre 10 a 25m, obtiveram um percentual de 18,5% de recuperação de oócitos, sustentando a hipótese de que o tamanho do folículo influencia a taxa de recuperação de oócitos. Bezard et al. (1997) observaram um maior percentual na recuperação de oócitos em folículos pequenos com 5 a 15mm (52%) do que em folículos com 20 a 27mm (22%), relatando que a curetagem da parede folicular é mais fácil de ser realizada quando o folículo apresenta diâmetro pequeno, entretanto no folículo pré-ovulatório o índice de recuperação de oócitos foi mais alto (78%). Em bovinos, a taxa de recuperação de oócitos por OPU chega a 72% para folículos maiores que 4mm de diâmetro e 50% para folículos menores que 4mm (Seneda et al., 2001)

A baixa taxa na recuperação de oócitos de éguas superovuladas encontradas em nossos trabalhos pode também estar associada a não completa maturidade do folículo superovulado, ou seja este poderia não estar responsivo ao estímulo do hCG aplicado 30 horas antes da aspiração.

4.4 EXPERIMENTO III

“AVALIAÇÃO DO AMBIENTE FOLICULAR DE ÉGUAS SUPEROVULADAS”

4.4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas

A monitorização e o tratamento das éguas do grupo superovulatório (Extrato de Pituitária Eqüina) e controle foram realizados conforme descrito no experimento II.

4.4.1.2 Animais

Foram utilizadas 24 éguas divididas aleatoriamente em dois grupos G1 - éguas superovuladas (n=12), e G2 - éguas controle (n=12), em bom estado geral de saúde, com idade variando de quatro a 14 anos, massa corpórea entre 400 a 600Kg e com bom histórico reprodutivo. Estes animais foram mantidos em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo, suplementação mineral em um consumo médio diário de 70g, ração fornecida uma vez ao dia em um total de três quilos/égua, o feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) sendo ofertado duas vezes ao dia, em um total de 10 quilos/égua.

O experimento foi realizado no Posto de Monta da Fazenda Lajeado, UNESP localizado no município de Botucatu, estado de São Paulo, e no Polo regional da Alta Mogiana localizado na cidade de Colina, estado de São Paulo.

4.4.1.3 Obtenção do fluido folicular

O fluido folicular foi recuperado através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia via vaginal conforme descrito no experimento II.

4.4.1.4 Avaliação do fluido folicular

Após a obtenção do fluido folicular, este foi centrifugado a uma força de 600g por 10 (dez) minutos com o intuito de separar o precipitado (células da granulosa) do sobrenadante (fluido folicular). O precipitado foi transferido para uma placa de petri com a finalidade de avaliar as características e a viabilidade das células em expansão. O sobrenadante foi armazenado (-20^o C).

4.4.1.4.1 Dosagens Hormonais

O líquido folicular foi encaminhado para Universidade da Califórnia, Davis – EUA para dosagem de 17 β -estradiol, testosterona, progesterona, inibina por meio de radioimunoensaio (RIA).

A concentração de testosterona foi determinada por RIA, assim como descrito por Rose & Hughes (1991). Foi utilizado o anti-T anticorpo ovino (S-250; G. Niswender, Colorado State Univ., Fort Collins, CO). A sensibilização da amostra foi de 0,15ng/mL.

A concentração de estrogênio foi determinada por RIA, assim como descrito por Pinaud & Coworkers (1991). Foi utilizado o anticorpo de ovino, anti-estradiol-17 β -6-BSA (#244; G. Niswender, Colorado State Univ., Fort Collins, CO). A sensibilização da amostra foi de 15,0pg/mL.

A concentração de imunorreação de inibina foi determinada por um heterólogo de RIA, assim como descrito por Roser et al. (1994). Foi utilizado o anti-T anticorpo ovino (S-250; G. Niswender, Colorado State Univ., Fort Collins, CO). A sensibilização da amostra foi de 0,33ng/mL.

A concentração de progesterona foi determinada, em duplicata por RIA, assim como descrito por Rose et al. (1994). O limite determinado para as amostras foi de 0,02ng/mL.

4.4.1.4.2 Concentração de Óxido Nítrico

Foi realizada no Laboratório Clínico da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Botucatu, SP utilizando-se o detector químico luminescente (Nitric oxide Analyzer NOA™, Model 280, Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO).

O óxido nítrico decompõe-se em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) em cultura. Assim, a produção desse metabólito pode ser avaliada indiretamente medindo-se a concentração de NO_2^- acumulado, por meio de método colorimétrico baseado na reação de diazotização com o reagente de Greiss (NEED 0,1% e sulfanilamida 1%).

A concentração de nitrito no líquido folicular reflete a produção de óxido nítrico celular, que foram determinados segundo a reação de Griess, como descrito por Hawkins et al. (1998). Para tanto, volumes iguais de líquido folicular (100 μL) e reagente de Griess foram colocados em placas de 96 alvéolos a temperatura ambiente por 10min. e mensurados por leitura em leitor de placas a 550nm. A concentração de nitrito foi determinada por referência a uma curva padrão criada por diluição seriada de nitrito de sódio (200mM a 1,58mM).

4.4.1.4.3 Perfil eletroforético de proteína do líquido folicular

Foi realizado o perfil eletroforético de proteínas no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Botucatu, SP, através da técnica de Eletroforese, onde as amostras foram recentrifugadas (4200xg, por 1 hora, a 4°C) e a dosagem de proteína total em duplicata foi realizada pelo método do Bradford (Microprot Dolles), utilizando o corante “cromassie azul” como reagente de cor.

A eletroforese foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970) e adaptado por Bollag et al. (1996), utilizando-se duas concentrações de poliacrilamida (29,2% de Acrilamida e 0,8% de Bisacrilamida), de 13% e 22%, nos géis de separação para cada amostra.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em mini cubas verticais (Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System - Amersham Biosciences). Após

a limpeza das placas de vidro com álcool etílico 96°, as mesmas foram montadas sobre o suporte da cuba.

Posteriormente, as imagens dos géis foram digitalizadas (VDS, Amersham Biosciences) e um “software” analisador de imagens (Image Master, Amersham Biosciences), do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, foi utilizado para determinar o peso molecular e a densidade óptica integrada (IOD) para cada banda, de cada amostra no gel.

Os géis foram montados entre papel celofane permeável com gelatina incolor, sobre uma placa de vidro.

4.4.1.5 Análise estatística

Para detectar diferenças entre as médias (\pm erro padrão da média) dos hormônios (estrógeno, progesterona, testosterona, inibina) e do óxido nítrico dosados no fluido folicular aspirado dos animais dos grupos controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina, foi utilizado o Teste t, com nível de significância de 5%.

Para as lacunas de dados da densidade óptica integrada, utilizou-se o programa estatístico (SigmaStat™), que emprega um sofisticado sistema baseado no cálculo do quadrados mínimos e na regressão dos dados, linear ou não para substituir as células vazias por valores próximos aos médios reais, mas, extrapolados por fórmulas matemáticas. Mostrando a ausência da banda não como um valor nulo ($p < 0,05$). Já para os percentuais de presença ou ausência do padrão das bandas eletroforéticas do líquido folicular dos grupos controle e superovulado foram realizado o teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

Para a avaliação dos níveis hormonais entre indivíduos de folículos aspirados foi utilizado o teste de Anova e Student Newman Keuls, para se evidenciar as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.4.2 Resultados

4.4.2.1 Análise hormonal e de óxido nítrico intra-folicular

Não foi encontrada nenhuma variação significativa nas concentrações médias dos hormônios e de óxido nítrico dosados entre os grupos controle e superovulado, como demonstrado na tabela 07. Observação semelhante foi encontrada quando avaliado os níveis hormonais entre folículos de um mesmo animal dentro do grupo superovulado, apesar da grande variação de valores detectada (Figura 19).

Contudo, houve diferenças quando comparados os valores hormonais dos indivíduos do grupo superovulado ($p < 0,05$), com exceção da progesterona ($p > 0,05$), conforme demonstrado na tabela 08. No grupo de éguas controle não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores hormonais entre os indivíduos.

Tabela 07: Média e erro padrão dos hormônios dosados no fluido folicular dos animais dos grupos controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina.

Hormônios	Controle	EPE	Valor de P
Inibina ($\mu\text{g/mL}$)	$1,59 \pm 0,12$	$2,33 \pm 0,25$	P=0,106
Testosterona (ng/mL)	$7,96 \pm 0,76$	$8,89 \pm 0,36$	P=0,231
Estrógeno ($\mu\text{g/mL}$)	$1,60 \pm 0,17$	$1,39 \pm 0,09$	P=0,265
Progesterona (ng/mL)	$324,25 \pm 93,1$	$241,92 \pm 47,46$	P=0,411
Oxido Nítrico ($\mu\text{M/mL}$)	$5,61 \pm 0,61$	$5,94 \pm 0,42$	P= 0,688

Tabela 08: Média e erro padrão por indivíduo dos hormônios dosados no fluido folicular dos animais do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.

ÉGUAS	INIBINA	TESTOSTERONA	ESTROGENO	PROGESTERONA
16	$1,56 \pm 0,012$ C	$8,8 \pm 0,44$ AB	$1,5 \pm 0,05$ B	$67,0 \pm 2,12$ A
29	$2,77 \pm 0,191$ C	$7,03 \pm 1,07$ B	$1,34 \pm 0,13$ B	$94,33 \pm 38,32$ A
46	$5,02 \pm 0,55$ B	$9,9 \pm 0,51$ AB	$1,87 \pm 0,13$ B	$333,0 \pm 6,66$ A
54	$1,232 \pm 0,46$ D	$6,75 \pm 0,08$ B	$0,64 \pm 0,023$ C	$233,25 \pm 72,25$ A
60	$2,5 \pm 0,0$ CD	$8,9 \pm 0,0$ AB	$1,05 \pm 0,0$ B	$1232,0 \pm 0,0$ A
100	$1,86 \pm 0,26$ C	$10,3 \pm 2,0$ AB	$1,66 \pm 0,47$ B	$55,0 \pm 11,0$ A
112	$1,47 \pm 0,88$ D	$10,4 \pm 1,07$ AB	$1,44 \pm 0,14$ B	$225,25 \pm 60,65$ A
140	$1,59 \pm 0,86$ C	$12,17 \pm 0,57$ A	$2,53 \pm 0,09$ A	$197,25 \pm 19,69$ A
256	$1,24 \pm 0,025$ D	$9,23 \pm 1,09$ AB	$0,89 \pm 0,061$ C	$602,67 \pm 432,4$ A
387	$2,2 \pm 0,185$ C	$7,17 \pm 0,38$ B	$1,0 \pm 0,16$ C	$268,0 \pm 40,5$ A
Colina	$1,815 \pm 0,09$ C	$7,7 \pm 0,38$ B	$1,45 \pm 0,13$ B	$211,0 \pm 112,33$ A
Jady	$6,04 \pm 0,82$ A	$8,33 \pm 2,18$ AB	$0,9 \pm 0,05$ C	$74,0 \pm 40,15$ A

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,01$)

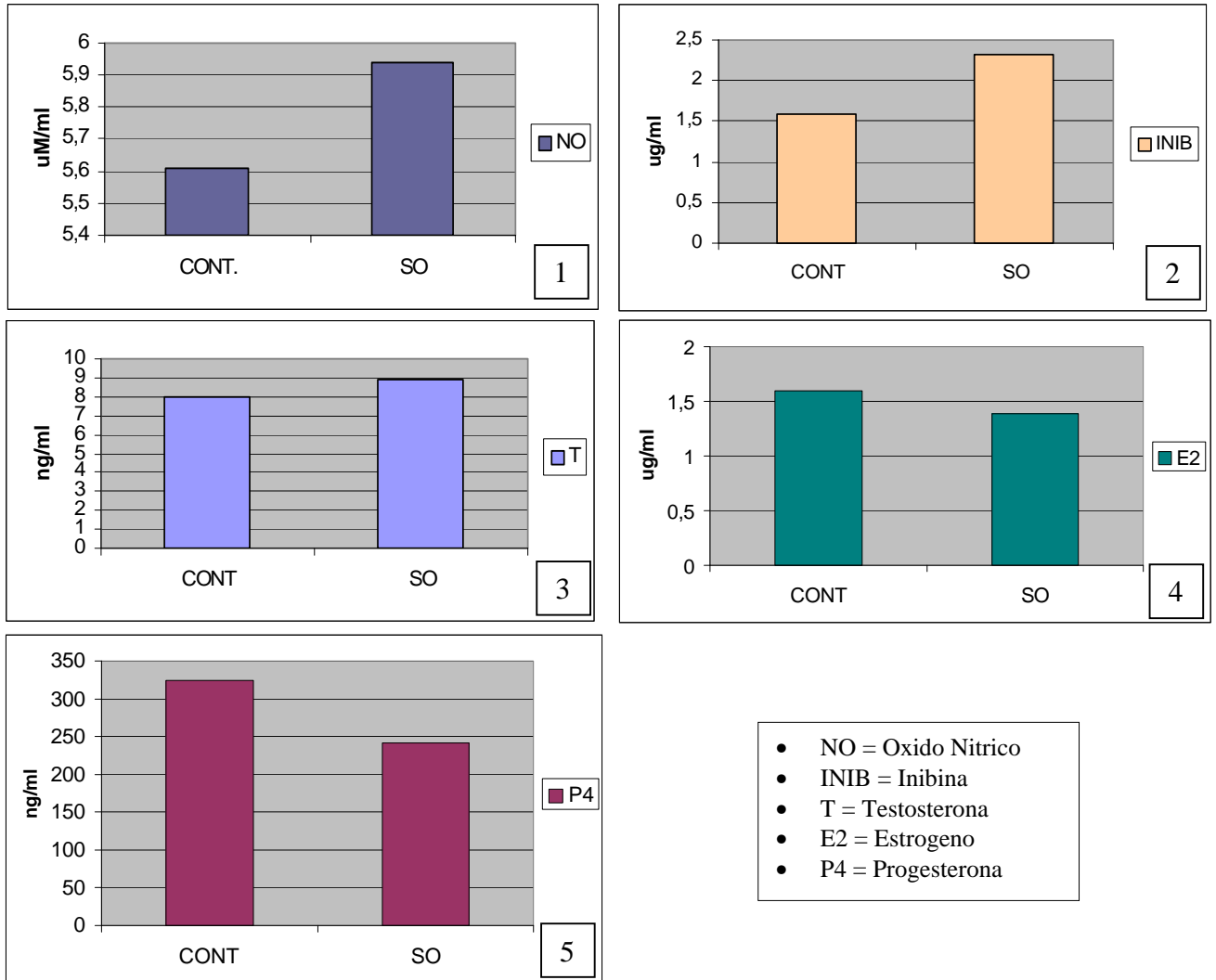
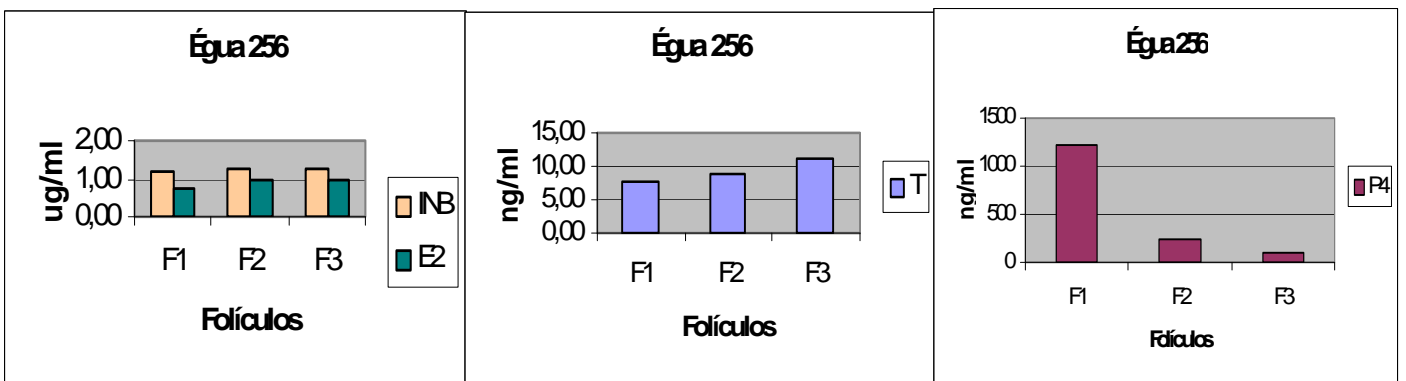
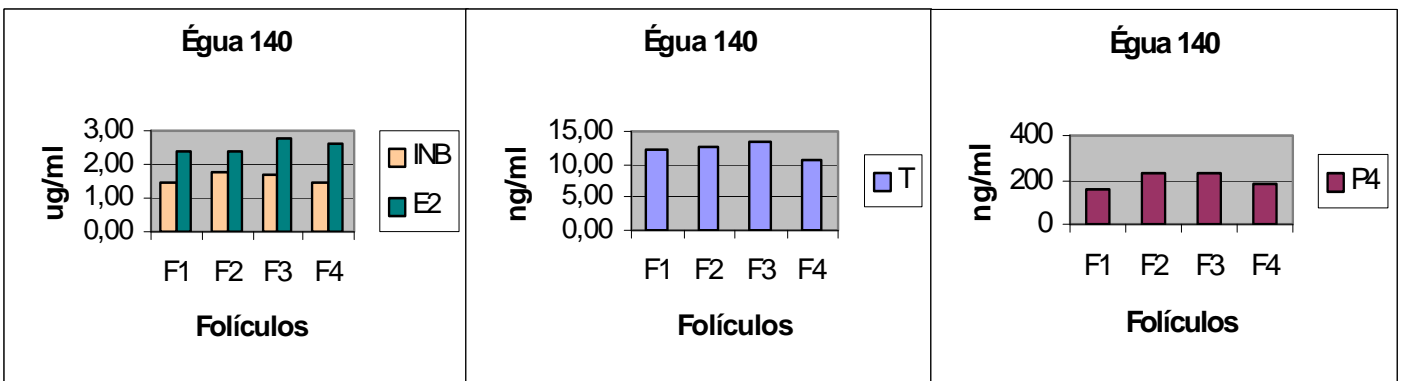
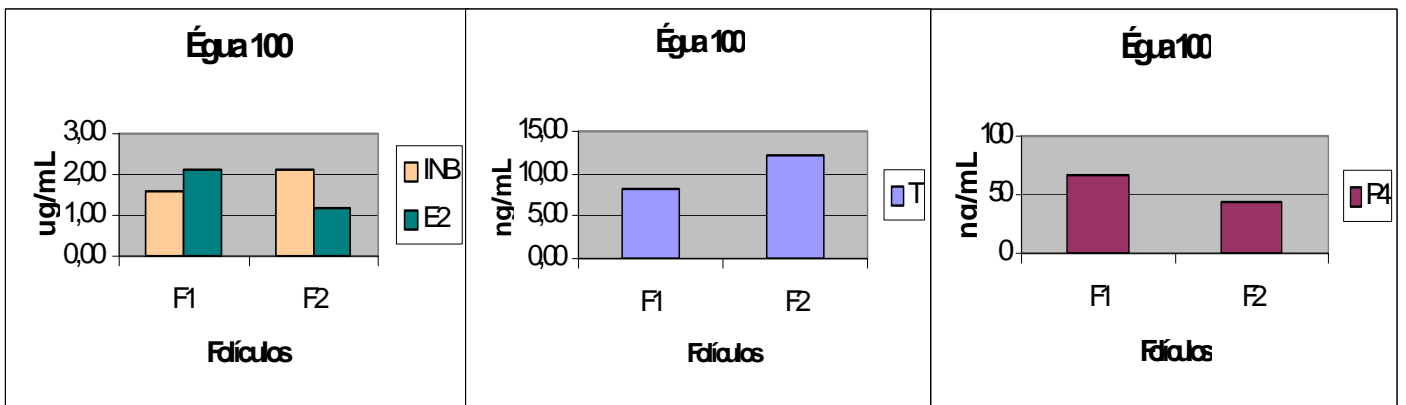
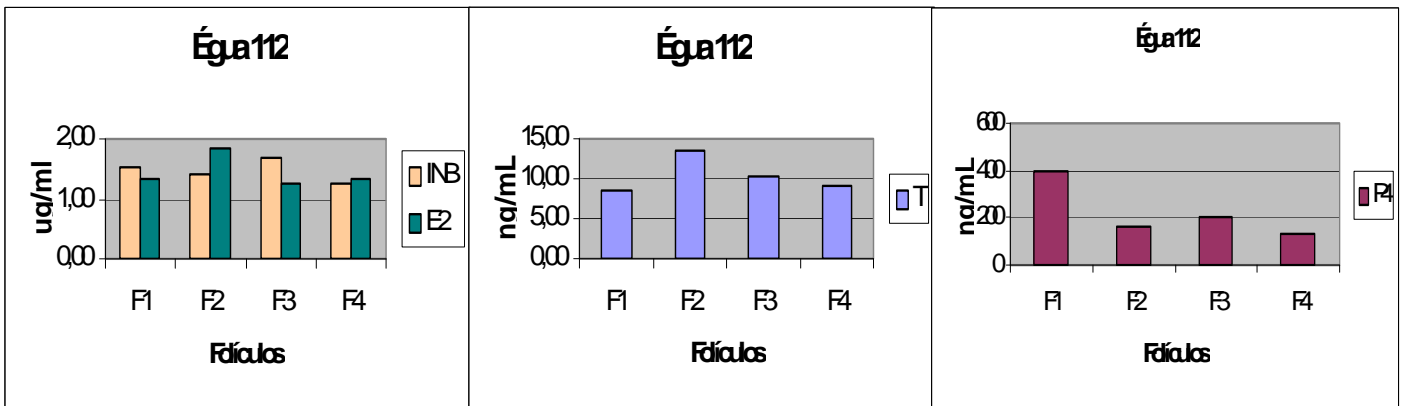
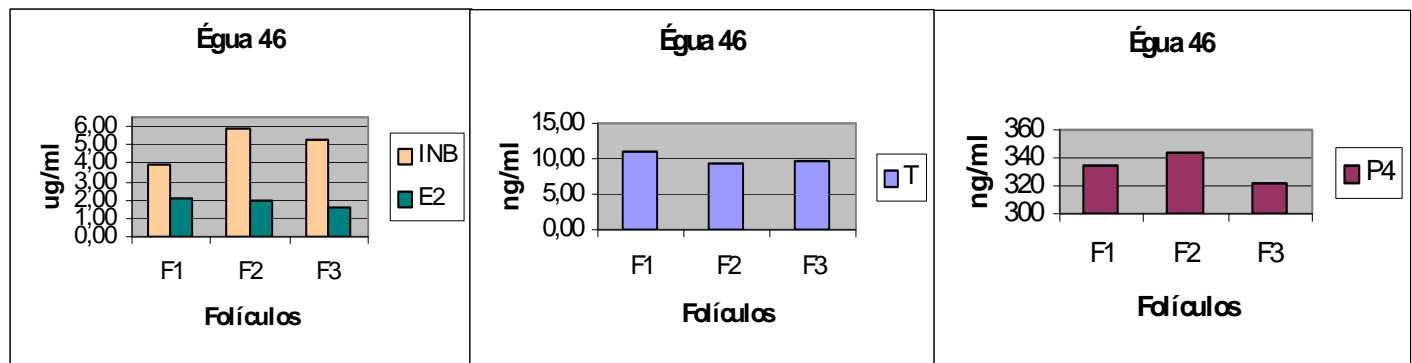
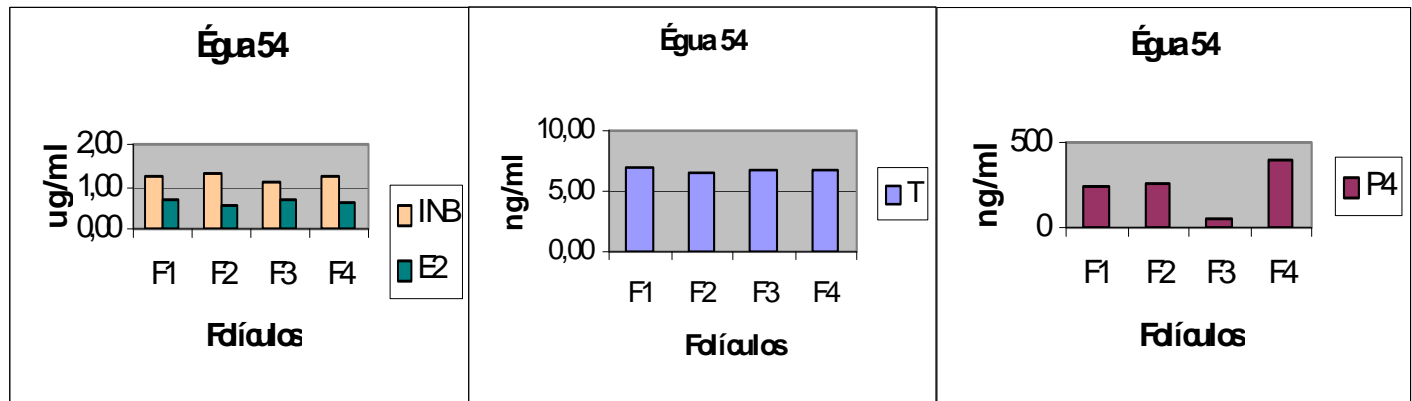
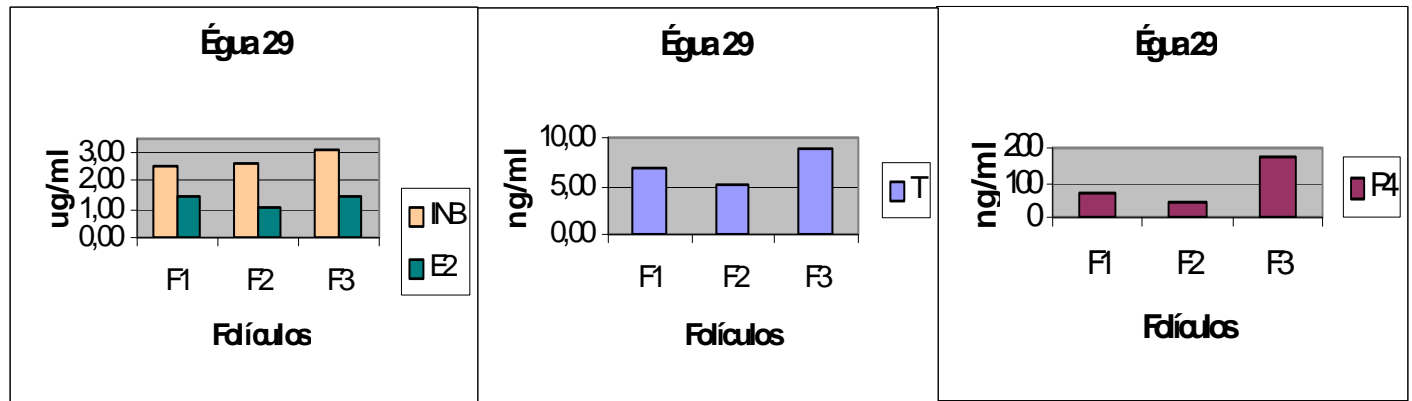
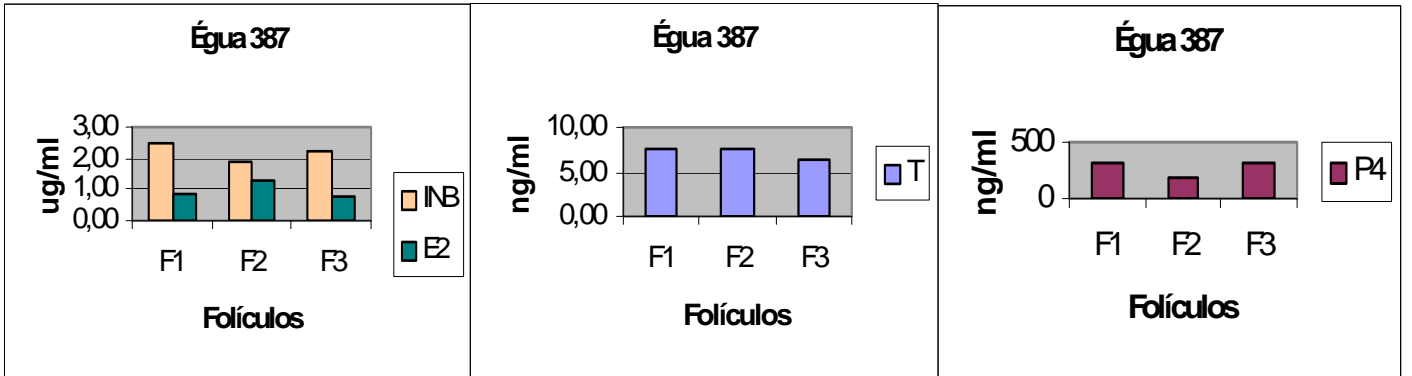
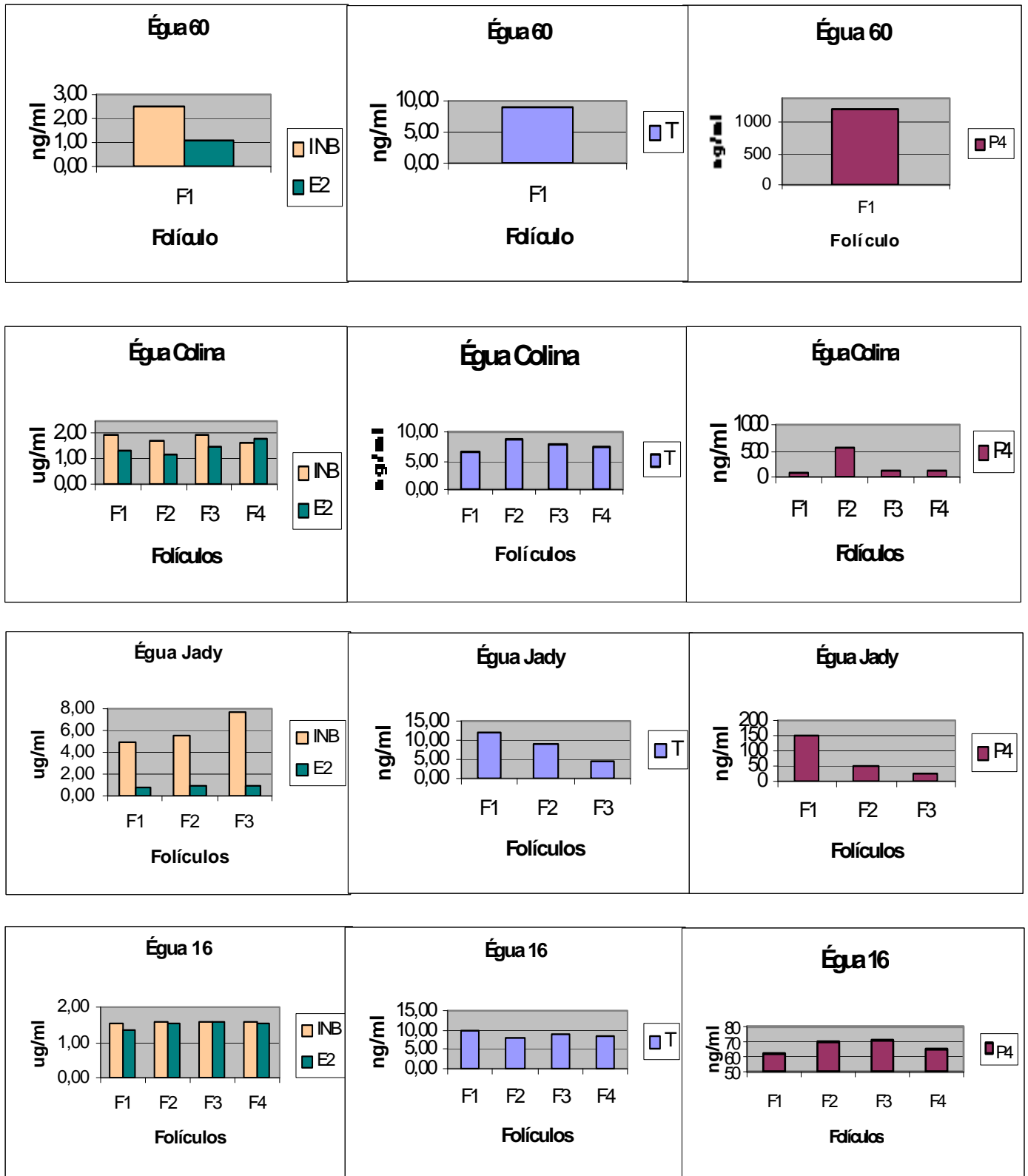


Figura 17: Valores médios da concentração de oxido nítrico (1), inibina (2), testosterona (3), estrógeno (4) e progesterona (5) do líquido folicular dos grupos controle (CONT) e superovulado (SO).







- INB = Inibina, T = Testosterona, E2 = Estrógeno, P4 = Progesterona, F = Folículo

Figura 18: Concentração de inibina, testosterona, estrógeno e progesterona do líquido folicular por animal do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.

4.4.2.2 Perfil eletroforético das proteínas do fluido folicular

Foram encontradas 30 bandas nas éguas superovuladas e 24 nas éguas controle, sendo a B1, B2, B10, B14, B16 e B29 sempre ausentes no grupo controle. No grupo superovulado apenas 09 bandas estavam presentes em todas as amostras, sendo encontrado 17 bandas comuns a todas as éguas no grupo controle.

A B5 estava ausente no folículo do animal 46A e a B30 estava ausente no F2 da égua Jady do grupo superovulado. A B22, B27 e B28 estavam ausentes na égua 212 do grupo controle. Já a B14 e B16 estavam presentes apenas no F1 do animal 140 e no F1 da égua 387 do grupo superovulado.

Comparando-se a densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas encontradas nos diferentes grupos, observou-se uma maior densidade na B7 (129,2Kda), no grupo superovulado do que no controle ($p=0,01$), bem como nas B8, B9, B11, B12 e B13 (tabela 09).

Na faixa das bandas B17 a B23 (28,1 a 47Kda) encontraram-se proteínas com pesos moleculares similares aos das Proteínas Ligadoras de IGF (IGFBP) envolvidas no processo de maturação folicular, como a IGFBP – 3 (42 a 44Kda), IGFBP – 5 (28 a 32Kda) e IGFBP – 2 (35Kda), Gerard & Monget (1998). Nessa faixa encontrou-se uma maior densidade na B17 (47Kda) no grupo superovulado do que no controle ($p= 0,04$), também foi detectado uma tendência estatística ($0,05 < P < 0,1$) na IOD das bandas B19 e B20 do grupo superovulado.

Analisando-se as porcentagens da presença das bandas protéicas dos grupos (tabela 10), observou-se uma menor freqüência da B8 (117Kda), B10 (100,4Kda), B14 (96Kda), B22 (31,2Kda), B23 (28,1Kda) e B28 (17,6Kda) no grupo superovulado do que no controle ($p < 0,05$). Ao passo que a B1 (352,8Kda), B2 (327,8Kda), B4 (255Kda) e B26 (22,3Kda) apresentaram uma maior freqüência no grupo controle ($p < 0,05$).

A B27 (20,2Kda) demonstrou uma tendência de maior freqüência no grupo controle do que no superovulado ($p=0,073$). Nas faixas das proteínas conhecida e envolvidas no processo de maturação folicular (B17 a B23) somente observou-se diferença na B22 e na B23 em possuir uma freqüência menor no grupo superovulado, Gerard & Monget (1998).

Não foi realizada uma correlação entre o grau de maturação oocitária e os resultados obtidos na eletroforese por foliculo, pois a maturação foi avaliada pela microscopia eletrônica, na qual foi necessária a utilização de um “pool” de oócitos recuperados pela aspiração folicular no grupo controle e superovulado.

Tabela 09: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas encontradas nos diferentes folículos de éguas do grupo controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina.

Banda	Superovulado			Controle			P
	n	lacunas	Média±SEM	n	lacunas	Média±SEM	
B1	37	25	24,25 ± 1,88	12	12	—	—
B2	37	25	26,43 ± 2,59	12	12	—	—
B3	37	7	33,75 ± 2,38 ^a	12	0	39,69 ± 3,78 ^a	0,191
B4	37	32	37,04 ± 6,30 ^a	12	7	29,47 ± 3,42 ^a	0,126
B5	37	01	53,43 ± 2,71 ^a	12	0	61,34 ± 5,09 ^a	0,160
B6	37	7	53,86± 2,04 ^a	12	0	55,35 ± 3,98 ^a	0,719
B7	37	5	63,84 ± 3,42 ^a	12	0	48,07 ± 3,03 ^b	0,011
B8	37	13	61,57 ± 5,3 ^a	12	0	41,72 ± 2,03 ^b	0,014
B9	37	0	54,43 ± 3,24 ^b	12	0	71,68 ± 4,57 ^a	0,008
B10	37	31	38,78 ± 3,52 ^a	12	12	—	—
B11	37	0	56,98 ± 4,21 ^a	12	0	40,36 ± 4,09 ^b	0,038
B12	37	0	165,24 ± 9,48 ^b	12	0	222,67 ± 14,29 ^a	0,003
B13	37	11	97,74 ± 7,22 ^b	12	5	134,67 ± 9,38 ^a	0,018
B14	37	36	107,93	12	12	—	—
B15	37	0	778,25±36,69 ^a	12	0	801,59±77,37 ^a	0,766
B16	37	36	231,55	12	12	—	—
B17	37	0	289,42 ± 9,53 ^a	12	0	249,87 ± 14,82 ^b	0,040
B18	37	0	74,87 ± 4,39 ^a	12	0	63,54 ± 2,08 ^a	0,156
B19	37	0	82,02 ± 3,04 ^{a'}	12	0	75,50 ± 4,31 ^{a'}	0,056
B20	37	0	70,73 ± 4,79 ^{a'}	12	0	55,86 ± 2,27 ^{a'}	0,089
B21	37	0	93,81 ± 10,27 ^a	12	0	69,31 ± 4,08 ^a	0,187
B22	37	20	89,20 ± 11,18 ^a	12	1	90,17 ± 8,44 ^a	0,951
B23	37	20	242,27±31,59 ^a	12	0	180,00 ± 19,45 ^a	0,142
B24	37	9	332,23 ± 19,6 ^{a'}	12	5	259,13 ± 7,76 ^{a'}	0,075
B25	37	0	111,27 ± 5,29 ^a	12	0	101,76 ± 6,93 ^a	0,352
B26	37	30	65,70 ± 7,85 ^a	12	5	58,95 ± 5,92 ^a	0,506
B27	37	15	54,63 ± 6,59 ^a	12	1	40,58 ± 4,80 ^a	0,169
B28	37	26	40,03 ± 5,17 ^a	12	1	34,46 ± 5,08 ^a	0,451
B29	37	33	49,74 ± 7,69	12	12	—	—
B30	37	1	65,27 ± 4,48 ^{a'}	12	0	51,53 ± 3,41 ^{a'}	0,095

Letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística (Teste t, p<0,05).

Tabela 10: Percentual de bandas protéicas no líquido folicular de éguas do grupo controle e superovulado.

Banda	Superovulado			Controle			P
	n	Presença	%	n	Presença	%	
B1	37	12	32,43 ^a	12	0	0 ^b	0,024
B2	37	12	32,43 ^a	12	0	0 ^b	0,024
B3	37	30	81,08 ^a	12	12	100 ^a	0,171
B4	37	32	86,48 ^a	12	5	41,66 ^b	0,004
B5	37	36	97,29 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B6	37	30	81,08 ^a	12	12	100 ^a	0,171
B7	37	32	86,48 ^a	12	12	100 ^a	0,315
B8	37	24	64,86 ^b	12	12	100 ^a	0,021
B9	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B10	37	6	16,21 ^b	12	12	100 ^a	<0,001
B11	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B12	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B13	37	26	70,27 ^a	12	7	58,33 ^a	0,492
B14	37	1	2,7 ^b	12	12	100 ^a	<0,001
B15	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B16	37	1	2,7 ^a	12	0	0 ^a	1,0
B17	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B18	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B19	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B20	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B21	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B22	37	17	45,94 ^b	12	11	91,66 ^a	0,007
B23	37	17	45,94 ^b	12	12	100 ^a	<0,001
B24	37	28	75,67 ^a	12	7	58,33 ^a	0,285
B25	37	37	100 ^a	12	12	100 ^a	1,0
B26	37	7	18,91 ^b	12	7	58,33 ^a	0,023
B27	37	22	59,45 ^{a'}	12	11	91,66 ^{a'}	0,073
B28	37	11	29,72 ^b	12	11	91,66 ^a	<0,001
B29	37	4	10,81 ^a	12	0	0 ^a	0,561
B30	37	36	97,29 ^a	12	12	100 ^a	1,0

Letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística (Teste Exato de Fisher, $p < 0,05$).

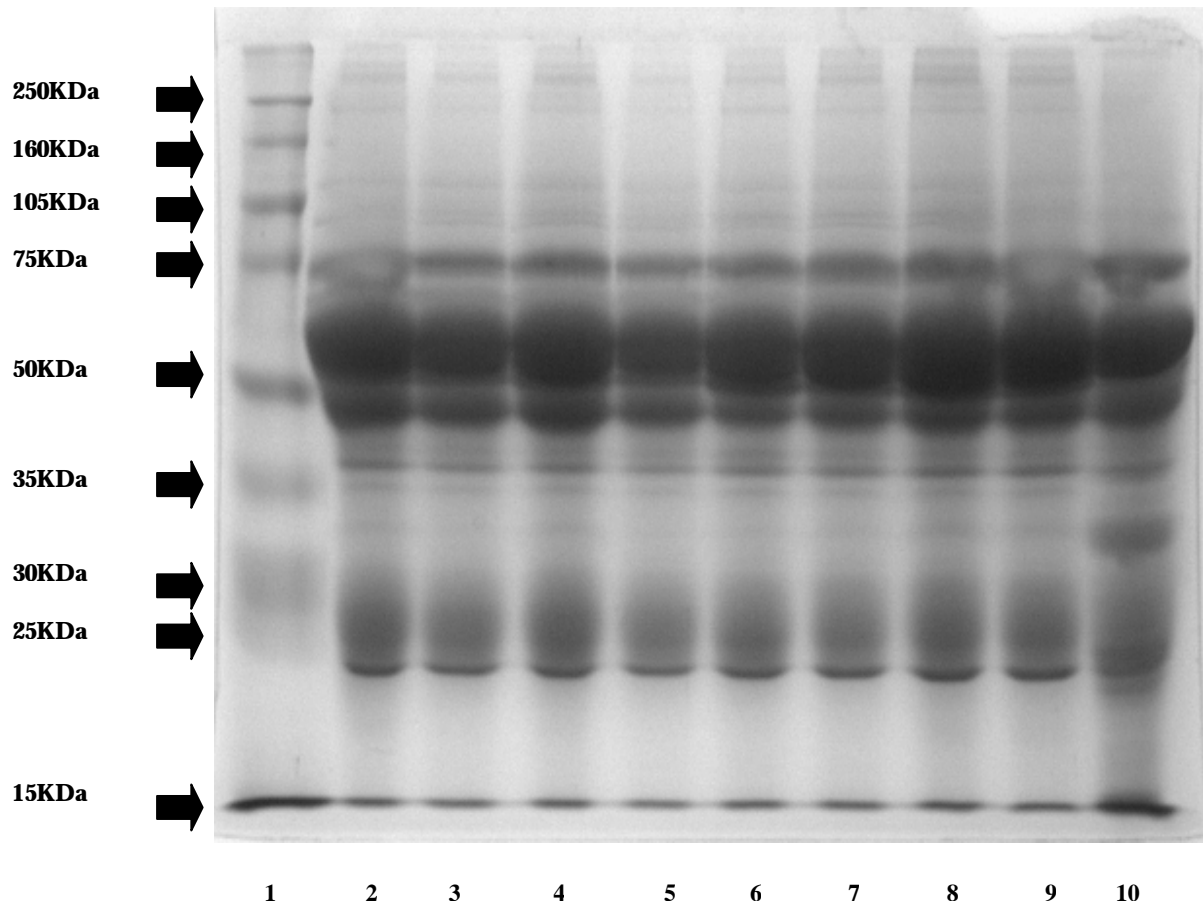


Figura 19: Eletroforese em poliacrilamida de proteínas do líquido folicular de éguas superovuladas. Canaleta 1, Marcador de Peso (10 a 250Kda); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 10 são amostras do líquido folicular de éguas superovuladas.

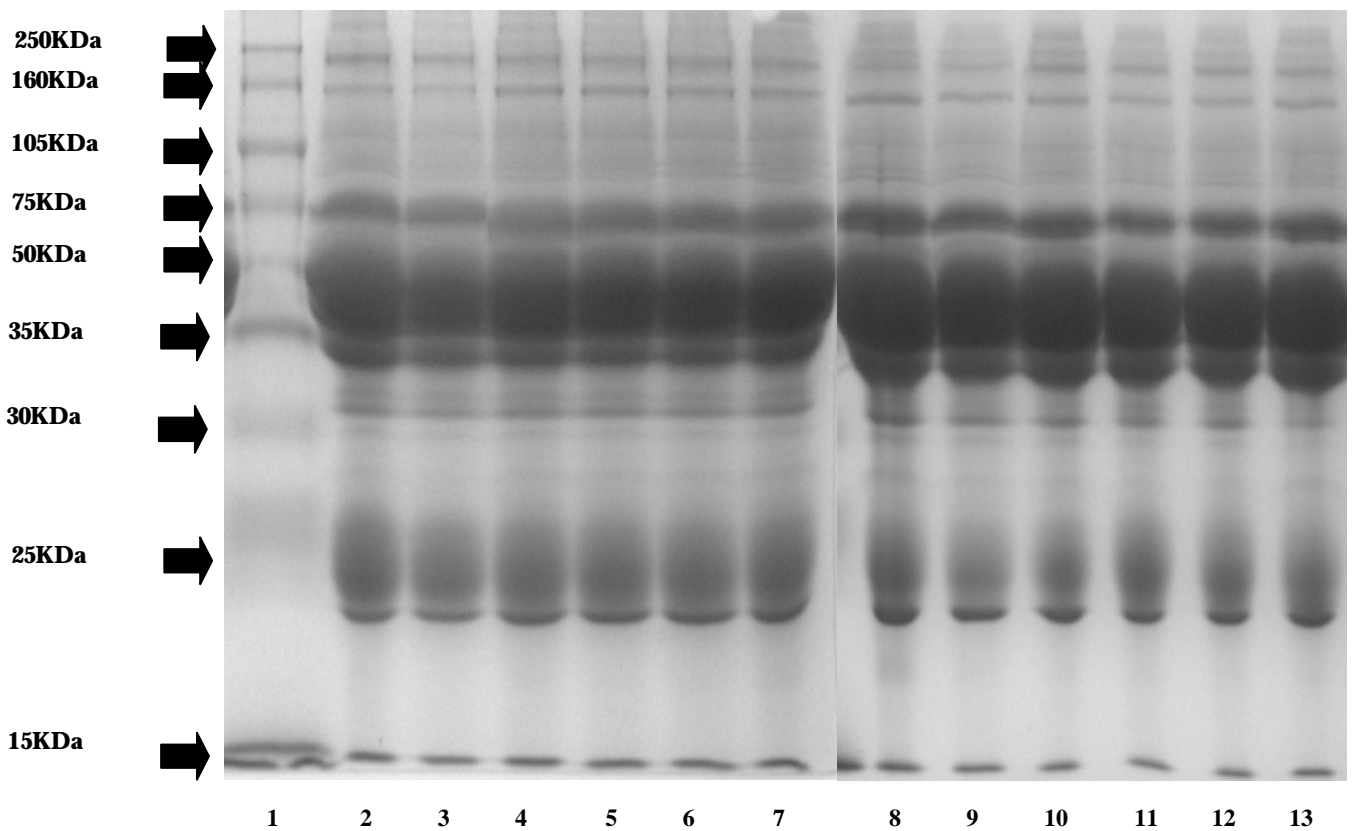


Figura 20: Eletroforese em poliacrilamida de proteínas do líquido folicular de éguas não superovuladas. Canaleta 1, Marcador de Peso Molecular (10 a 250kDa); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 13 são amostras do líquido folicular de éguas não superovuladas.

4.4.3 DISCUSSÃO

O líquido folicular apresenta concentrações variáveis de hormônios de acordo com a fase de desenvolvimento folicular, estando estas variações bem estudadas na fêmea eqüina. Contudo, a literatura é falha em apresentar trabalhos que comparem diferenças na composição do fluido folicular entre éguas submetidas a estímulo hormonal visando superovulação e éguas não estimuladas.

Não foram encontradas em nosso experimento diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações dos diferentes hormônios estudados (progesterona, Testosterona, Estrógeno e Inibina) entre éguas tratadas ou não com EPE. Contudo foi observado uma maior variação ($p < 0,05$) nos níveis entre indivíduos nas éguas superovuladas, o que não foi observado nas éguas controle ($p > 0,05$).

Quando avaliado os valores de cada hormônio, observamos que os valores de testosterona obtidos em nosso trabalho não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e superovulado ($7,96 \pm 0,76$ e $8,89 \pm 0,36$ ng/mL, respectivamente). O mesmo foi observado por Alvarenga et al. (2000) ao aspirar folículos de éguas de 10 a 20mm, 20 a 30mm e > 30 mm, sem indução da ovulação.

Altas concentrações de andrógenos intra-foliculares estão correlacionadas com o processo de atresia, porem não se sabe se são responsáveis ou conseqüências desta condição. Os andrógenos produzem um aumento da atividade da P450scc promovendo uma maior captação de lipoproteínas e maior conversão do colesterol em pregnenolona. Nas células da teca de humanos, eles promovem um aumento da atividade da 3β HSD, e nas células da granulosa uma diminuição da atividade desta enzima, diminuindo a produção de progesterona. Também possuem uma ação conjunta com o FSH no complexo P450aromatase das células da granulosa, promovendo maior aromatização dos andrógenos.

Não observamos também diferença estatística entre os grupos em relação aos níveis de progesterona ($324,25 \pm 93,1$ e $241 \pm 47,46$ ng/mL grupo controle e superovulado, respectivamente) e estradiol ($1,60 \pm 0,17$ e $1,39 \pm 0,09$ μ g/mL grupo controle e superovulado, respectivamente). Alvarenga

et al. (2000) ao aspirar folículos de éguas de 10 a 20mm, 20 a 30mm e >30mm, sem indução da ovulação, também não observaram diferença significativa nos níveis de P4. Gérard et al. (2002) encontraram no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de éguas não superovuladas uma concentração $1094,3 \pm 170,9$ ng/mL de progesterona e $2,8 \pm 0,24$ µg/mL de estradiol, valores bem superiores ao encontrado no grupo controle de nosso experimento. Somente um animal do grupo controle apresentou nível de estradiol superior a 2,3 µg/mL e em dois animais do grupo superovulado foram observados níveis de progesterona superiores a 1000 ng/mL no fluido folicular.

Assey et al. (2005) relataram uma menor concentração de E2 e P4 no fluido folicular de novilhas superovuladas, corroborando com os nossos achados, pois mesmo não havendo diferença significativa, os valores desses hormônios foram numericamente menores no grupo superovulado do que no controle (1,39 e 241,92 µg/mL; 1,60 e 324,25 ng/mL, respectivamente). Em contraste, Yun et al. (2005) relataram que os níveis de progesterona foram superiores em ratas superovuladas com PMSG, entretanto os valores de estrógeno não apresentaram variação entre os grupos (controle e tratado). Esses resultados indicam uma evidencia direta de que essas ovulações atípicas geraram oócitos com maturação nuclear assíncrona ou prematura e demonstraram uma correlação direta entre esses oócitos com aberrações meióticas e a esteroidogênese folicular anormal que se seguiu após o tratamento com PMSG, em ratas. O'Callaghan et al. (2000) em ovelhas, encontraram valores superiores no líquido folicular tanto de P4 quanto de E2 no grupo superovulado quando comparado ao controle.

O EPE é um produto que apresenta maior concentração de LH do que o FSH, podendo inclusive ser utilizado na indução da ovulação em éguas (Medeiros et al., 2005; Melo et al., 2005) de forma tão eficaz quanto aos outros indutores de ovulação utilizados nesta espécie (hCG e GnRH). Esses altos níveis de LH administrado no grupo superovulado não resultaram em uma maior secreção de P4 e de E2 em relação ao grupo controle, entretanto os níveis de testosterona a despeito de não ter sido verificada diferença estatística foram numericamente maiores nas éguas superovuladas do que as do grupo controle (8,89 e 7,96 ng/mL, respectivamente), porém não o suficiente para

promover uma maior estimulação na síntese de E2 nos folículos do grupo superovulado. Estes achados concordam com outros autores (Watson and Hinrichs 1988), os quais observaram um aumento dos níveis intrafolicular de testosterona em éguas tratadas com hCG, indicando que como demonstrado por Tucker et al., (1986), as células da teca interna produza mais testosterona quando estimulada com LH. Diferente do esperado, os níveis de P4 foram numericamente mais baixo nas éguas superovuladas. Estas duas observações indicam que os folículos das éguas superovuladas não estão completamente maturados, onde aparentemente as células da granulosa estão menos responsivas ao estímulo exógeno de LH. Esperava-se que os níveis de P4 intrafolicular de éguas superovuladas fosse superior pois o EPE contem altos níveis de LH o que deveria induzir uma maior luteinização folicular das células da granulosa. Em bovinos é sabido que um dos fatores determinantes da baixa taxa de recuperação de embriões utilizando eCG está relacionado com a alta atividade de LH destes hormônios (Soumano & Price, 1997). Estes mesmos autores demonstraram que folículos de vacas superestimuladas com eCG apresentaram um aumento na produção da “Star” (steroidogenic acute regulatory protein) proteína esta responsável pelo transporte de colesterol pela membrana mitocondrial, sendo posteriormente convertido o colesterol em pregnenolona pela enzima P450scc (cholesterol side-chain cleavage).

O fato do LH/hCG não estimular a atividade da P450aromatase (arom) e a testosterona apresentar efeito estimulador marcante na síntese de E2 sugere que, pelo menos durante a fase folicular tardia, a disponibilidade de substrato aromatizável seja limitante para que ocorra a síntese de E2 pelas células da granulosa. Essa hipótese é sustentada por relatos que demonstraram que a célula da granulosa de folículos pré-ovulatórios de ovinos (Evans et al., 1981) e suínos (Tsang et al., 1985), cultivadas *in vitro* e coletadas durante diferentes tempos após o tratamento com eCG, apresentam atividade da P450arom constante (Caldas-Bussiere et al., 2005). Essa alteração na esteroidogênese de folículos superovulados, tem sido relatada como um forte contribuinte na redução do desenvolvimento e na maturação do oócito em ratas (Yun et al., 2005), em vacas (Assey et al., 2005).

Bézard et al. (1995) observaram níveis mais baixos de androstenediona e testosterona nas éguas superovuladas com EPE do que nas não

superovuladas, não havendo observado contudo, diferença nos níveis de progesterona e estradiol .

Estes resultados contradizem nossos achados, pois não encontramos diferença significativa nas concentrações intra-foliculares de P4, E2 e testosterona entre as éguas superovuladas e não superovuladas. Os valores médios de progesterona intra-folicular de nosso experimento (282,5ng/mL), estão bem a baixos dos encontrados por Bézard et al. (1995) 861 ng/mL, porém próximos aos descritos por Watson & Hinrichs (1988) para folículos pré-ovulatório aspirados 28 a 32h após a administração do hCG (401,5ng/mL).

Já os níveis de testosterona (8,42ng/mL) obtidos em nosso trabalho foram próximos aos descritos Watson & Hinrichs (1988) e por Bézard et al. (1995) (12,1 e 10,6ng/mL, respectivamente) para folículos pré-ovulatório, ocorrendo o mesmo quanto aos níveis de estrógeno, onde observamos concentrações iguais aos de Bézard et al. (1995) 1,5ng/mL. Bézard et al. (1995), também relatam uma correlação positiva entre os níveis de E2 e P4 e a recuperação de embriões.

O óxido nítrico (NO) é caracterizado como um importante mensageiro intra e intercelular que tem papel fundamental na fisiologia ovariana na espécie eqüina, como no crescimento folicular e no processo ovulatório (Maira et al., 1998; Pinto et al., 2002). Dentre as várias funções do NO uma das mais importantes é a de controlar a relação dos vasos e volume sanguíneo circulante folicular (Salvemine, 1987).

A ausência de diferença estatística nas concentrações médias de óxido nítrico do fluido folicular do grupo superovulado e do controle ($5,94 \pm 0,42$ e $5,61 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), neste experimento, é um bom indicador de que este esteja presente em condições adequadas para funcionar como mediador do mecanismo celular e vascular que ocorrem no ovário, favorecendo, assim o desenvolvimento folicular e o processo ovulatório em ambos os grupos. O fluido folicular contém proteínas que modulam a diferenciação das células da granulosa induzidas pelo FSH, como inibina e ativina ((Findlay et al., 1993), lipoproteínas (Veldhuis & Gwynne, 1989) e proteínas ligadoras de IGF (Ui et al., 1989)

Em nosso trabalho foram encontradas bandas de peso molecular no perfil eletroforético do líquido folicular semelhantes aos das IGFBP descritas

por Gérard & Monget (1998). De acordo com alguns pesquisadores existe uma alta correlação entre as concentrações de IGFBPs, de estradiol e de progesterona presentes no fluido folicular e a capacidade desses folículos atingirem a dominância e maturação final pré-ovulação (Mihn et al., 2000; Austin et al., 2001; Beg et al., 2001; Crowe et al., 2001; Ginther et al., 2001). Na espécie eqüina o crescimento folicular juntamente com a maturação oocitária estão associados com a diminuição nas concentrações intrafoliculares de IGFBP-3, IGFBP-2 e de IGFBP-5 e um aumento de IGF-I livre (Gérard & Monget 1998; Carneiro et al., 2002). Alvarenga et al. (2000) observaram que a banda de 35Kda estava presente apenas em folículos maiores que 35mm, afirmando ser essa banda um bom indicador de maturidade folicular, já em folículos < 35mm esteve presente em maior a banda 23, a qual tem peso molecular similar a IGFBP-5 encontrada em folículos imaturos.

Em nosso experimento observamos uma freqüência menor na presença das bandas B22 e B23 (IGFBP-5) no grupo superovulado do que no controle, não havendo diferença estatística entre as demais bandas. Por não possuímos os valores das concentrações dessas proteínas durante o desenvolvimento folicular não podemos afirmar se esses valores diminuíram ou não no folículo pré-ovulatório, contudo a ausência de diferença significativa entre o grupo controle e superovulado, com exceção das bandas 17, 22 e 23, indicando que provavelmente não houve influencia do tratamento superovulatório nas concentrações da maioria das IGFBP intra-folicular e conseqüentemente no desenvolvimento e maturação folicular. Este evento pode estar influenciado pela administração do hCG (LH) em ambos os grupos promovendo desta forma a maturação de todos os folículos aspirados, já que em folículos com diâmetro entre 10 a 30mm tem-se demonstrado haver uma maior quantidade de proteínas com peso molecular de 28-32Kda (IGFBP-5) indicando imaturidade folicular, ao contrário de folículos pré-ovulatórios (folículos maduros) que há a ausência destas e a presença de proteínas com peso molecular de 35Kda (IGFBP-2) (Alvarenga et al., 2000).

Gérard & Monget (1998) observaram em éguas que há uma diminuição na concentração intra-folicular de IGFBP-3 e de IGFBP-5 antes da indução da ovulação, e um aumento de IGFBP-2 após a indução da ovulação. Portanto, o crescimento e a regressão folicular em éguas está associado a mudanças

específicas nos níveis de IGFBP, o qual pode ser de importância crucial no desenvolvimento folicular, na ovulação e na atresia folicular.

4.5 EXPERIMENTO IV

“ESTUDO DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA DE ÉGUAS SUPEROVULADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA”

4.5.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.5.1.1 Monitorização e tratamento das éguas superovuladas

A monitorização e o tratamento das éguas do grupo superovulatório (Extrato de Pituitária Eqüina) foi realizados conforme descrito no experimento I e II.

4.5.1.2 Avaliação dos oócitos recuperados de folículos aspirados

4.5.1.2.1 Avaliação ultraestrutural da maturação citoplasmática

A morfologia dos ovócitos foi analisada utilizando-se a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram utilizados neste experimento 10 ovócitos obtidos após superovulação e 6 ovócitos obtidos de animais não superovulados (controle). Os oócitos foram fixados em glutaraldeído a 2.5% em tampão fosfato a 0.1M (pH 7.4) e pós-fixados em tetróxido de osmio a 1% em mesmo tampão. Após a desidratação em séries crescentes de acetona os ovócitos foram incluídos em Epon. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram então examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

4.5.1.2.2 Avaliação da maturação nuclear

A) Avaliação dos oócitos recuperados do oviduto

A classificação morfológica de 27 oócitos (degenerado, compacto, desnudado e expandindo) foi realizada imediatamente após a sua localização utilizando um estereomicroscópio (Figura 21).

Logo após a classificação dos oócitos, estes foram imersos durante 15 minutos em MitoTracker Red CMX Ros[®] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 250nM, sendo posteriormente fixados em paraformaldeído a 3.7% em PBS e armazenados individualmente em criotubos a 4°C. Ao serem avaliados por microscopia confocal, os oócitos foram permeabilizados com Tritón X (Sigma cat # T8787) durante 5 minutos, incubados com Sytox Green[®] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 2.5µM e montados em porta objetos preparados com poly L-Lysina. As amostras foram processadas com um microscópio confocal Laser Scanning LSM 510[®], (Inverted Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Germany), utilizando lasers de Hélio / Neón e Argón, e obtendo-se séries de cortes confocais de 2µm de cada oócito.

As avaliações dos oócitos seguiram as seguintes determinações:

a) Estágio nuclear (Losinno, 2006)

- Metáfase I (MI)
- Metáfase II (MII)
- Não Definido (ND): Configuração da cromatina não compatível com as fases meióticas ou cromatina não visível.

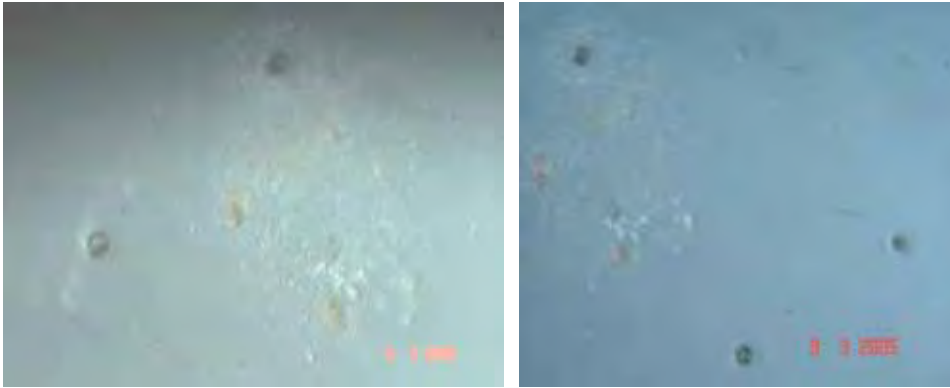


Figura 21: Oócitos recuperados do oviduto de éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina.

4.5.1.3 Análise estatística

Para a comparação entre as proporções foi utilizado o teste Exato de Fisher. O nível de significância utilizado foi de 5%.

4.5.2 Resultados

4.5.2.1 Avaliação ultraestrutural oocitária através da microscopia eletrônica

➤ Oócitos de éguas controle

Nos oócitos do grupo controle a característica principal foi a presença de uma grande quantidade de gotas de lipídeos e mitocôndrias distribuídas de maneira homogênea por todo o citoplasma (Figura 22). As mitocôndrias apresentam formato arredondado ou em formato de alteres com poucas cristas, não diferindo morfológicamente das observadas nos oócitos superovulados.

Complexos de Golgi pouco desenvolvidos aparecem na região cortical do oócito. A quantidade de vesículas observada também foi pequena. Apesar disto, o retículo endoplasmático liso se encontrava presente, principalmente na região sub-cortical associado às mitocôndrias e às gotas de lipídeo (Figura 23).

O espaço perivitelínico apresentou-se estreito e em seu interior foram observadas inúmeras microvilosidades (Figura 24). Nestes oócitos não foram vistos pontos de contato entre as microvilosidades oocíticas e os prolongamentos das células da granulosa circundantes. Logo abaixo da membrana vitelínica foi detectada a presença de inúmeros grânulos corticais de tamanho e eletron-densidade homogêneas (Figura 24).

➤ Oócitos de éguas superovuladas

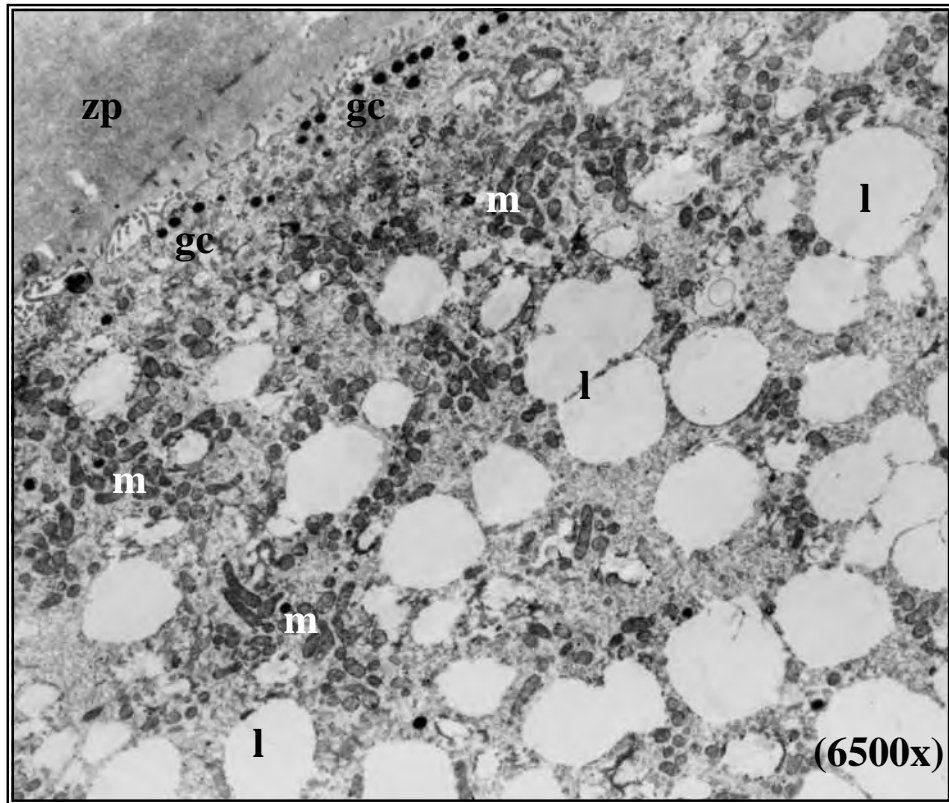
A principal característica dos oócitos obtidos após a superovulação também foi a grande riqueza em mitocôndrias e a presença no citoplasma de uma grande quantidade de grânulos de lipídeo (Figura 25). Estes grânulos com freqüência apareceram associados às mitocôndrias (Figura 26). Em alguns dos casos foram observados restos membranosos no interior de alguma das gotas ou grânulos (Figura 25), as quais também se encontravam associadas às mitocôndrias.

As mitocôndrias apresentavam-se pequenas arredondadas ou em forma de alteres com poucas cristas internas e distribuídas por todo o ovoplasma, semelhante ao observado no oócitos do grupo controle.

O complexo de Golgi apresentou-se também na periferia do ovoplasma. No entanto, enquanto no grupo controle este aparecia pouco desenvolvido, nos

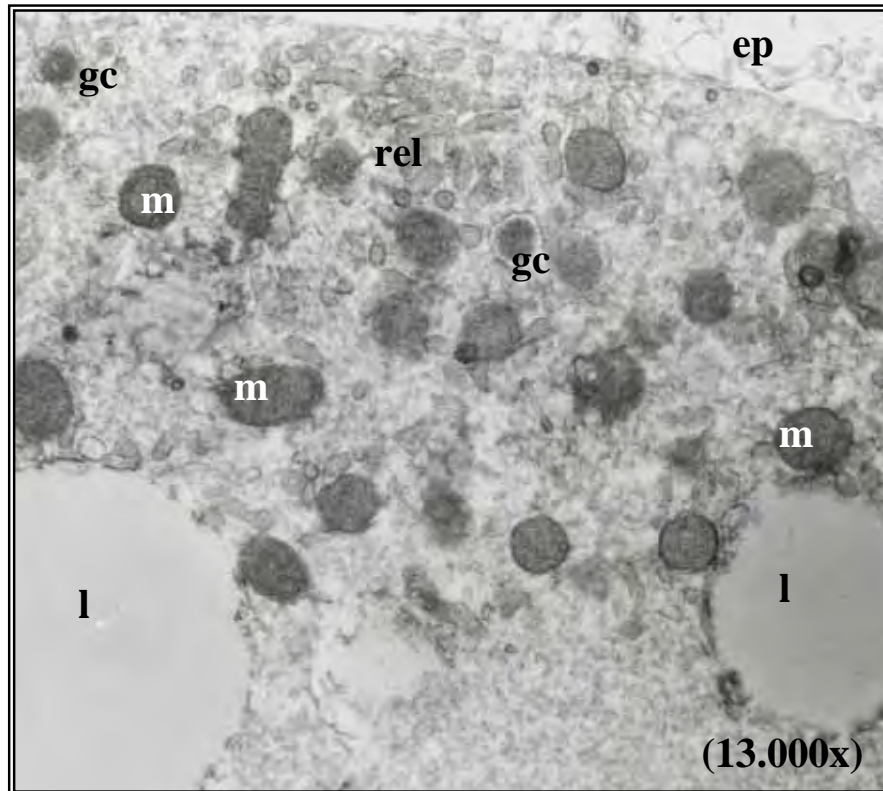
oócitos oriundos de folículos superovulados o complexo de Golgi apresentara-se bem desenvolvido e constituído por várias cisternas sobrepostas e associado a pequenas vesículas recobertas (Figura 26), semelhantes às vistas originando-se por pinocitose na superfície do oócito. Nas proximidades do complexo de Golgi foram observados alguns grânulos limitados por membranas, com conteúdo elétron-densos, os quais foram caracterizados como grânulos corticais. Grânulos semelhantes foram observados próximos a membrana plasmática, embora em pequeno número (Figura 27) e dispersos pelo citoplasma, ou agrupados em conjunto com as mitocôndrias. Retículo endoplasmático liso (REL) tubular apareceu principalmente na região sub-cortical do oócito associados a mitocôndrias (Figura 27).

O espaço vitelínico dos oócitos superovulados apresentou-se ligeiramente dilatado e atravessado por microvilosidades (Figuras 27 e 28). Através da zona pelúcida, constituída por material fibrilar, foram observados alguns prolongamentos celulares originados das células da granulosa ainda presentes ao redor dos oócitos. No interior do espaço perivitelínico estes prolongamentos fazem contato com a membrana vitelínica do oócito ou com seus prolongamentos, sendo que em alguns pontos foi observada a presença de complexos juncionais entre eles (Figura 28).



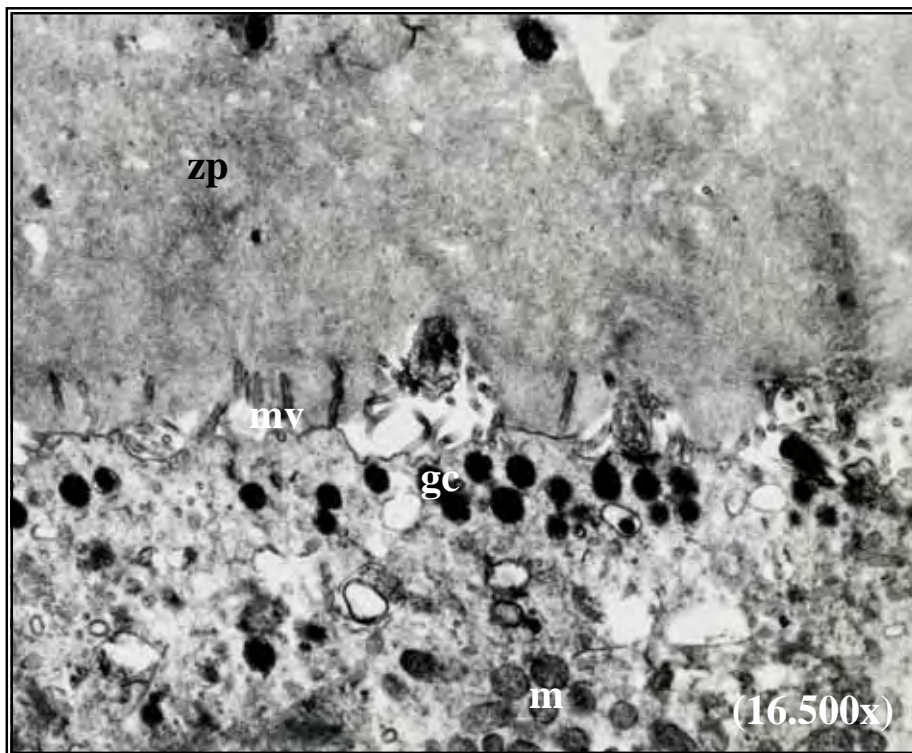
zp = zona pelúcida

Figura 22: Aspecto geral do oócito de eqüino do grupo controle. Notar o grande número das gotas lipídicas (l) e mitocôndrias (m) e a presença de grânulos corticais (gc) distribuídos na região cortical.



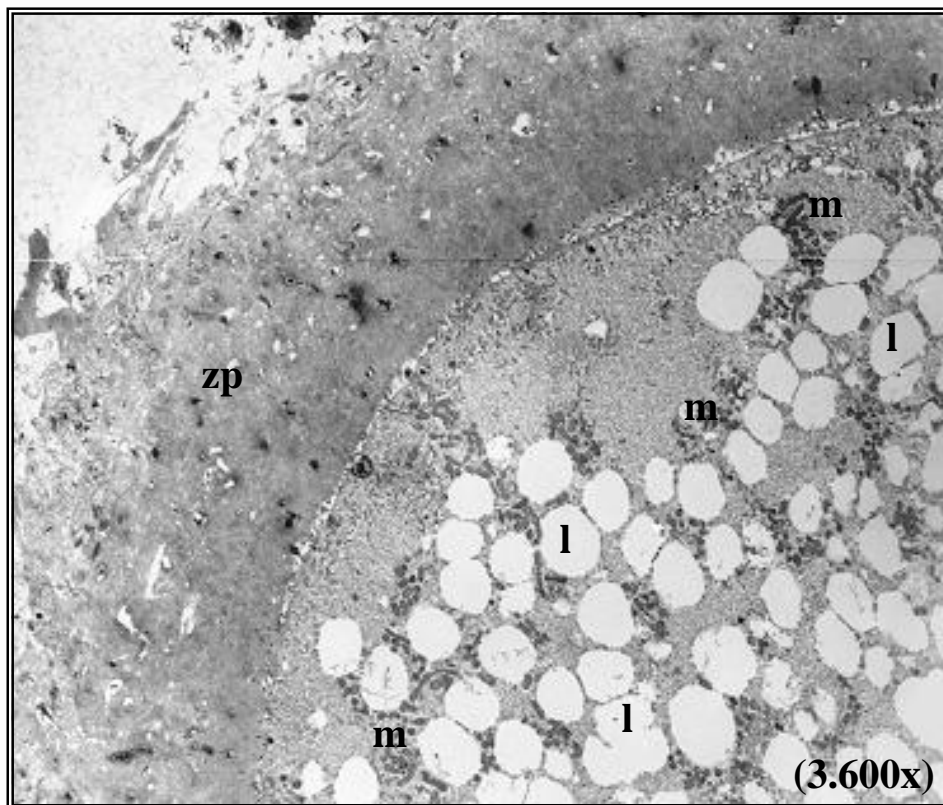
gc = grânulos corticais; ep = espaço perivitelinico

Figura 23: Detalhe da região cortical de uma oócito do grupo controle, mostrando mitocôndrias (m) associadas a gotas de lipídeo (l) e ao retículo endoplasmático liso (rel).



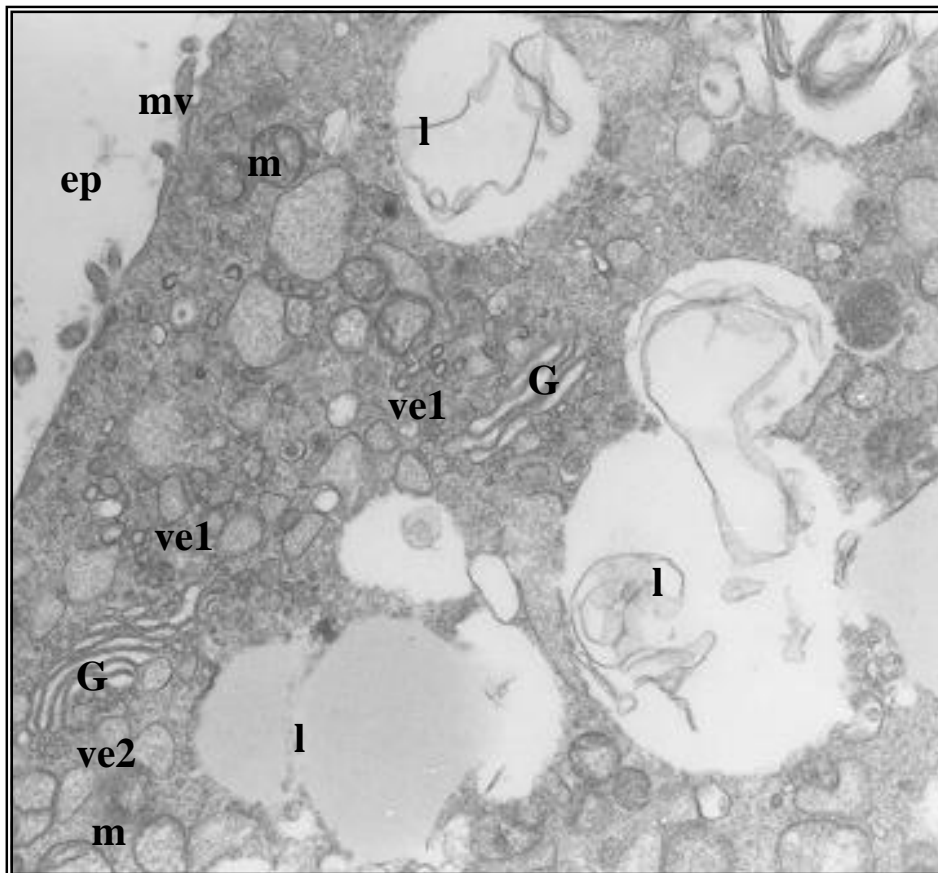
zp = zona pelúcida; mv = microvilosidades; m = mitocôndrias

Figura 24: Detalhe da região cortical de um oócito do grupo controle mostrando a distribuição dos grânulos corticais (gc).



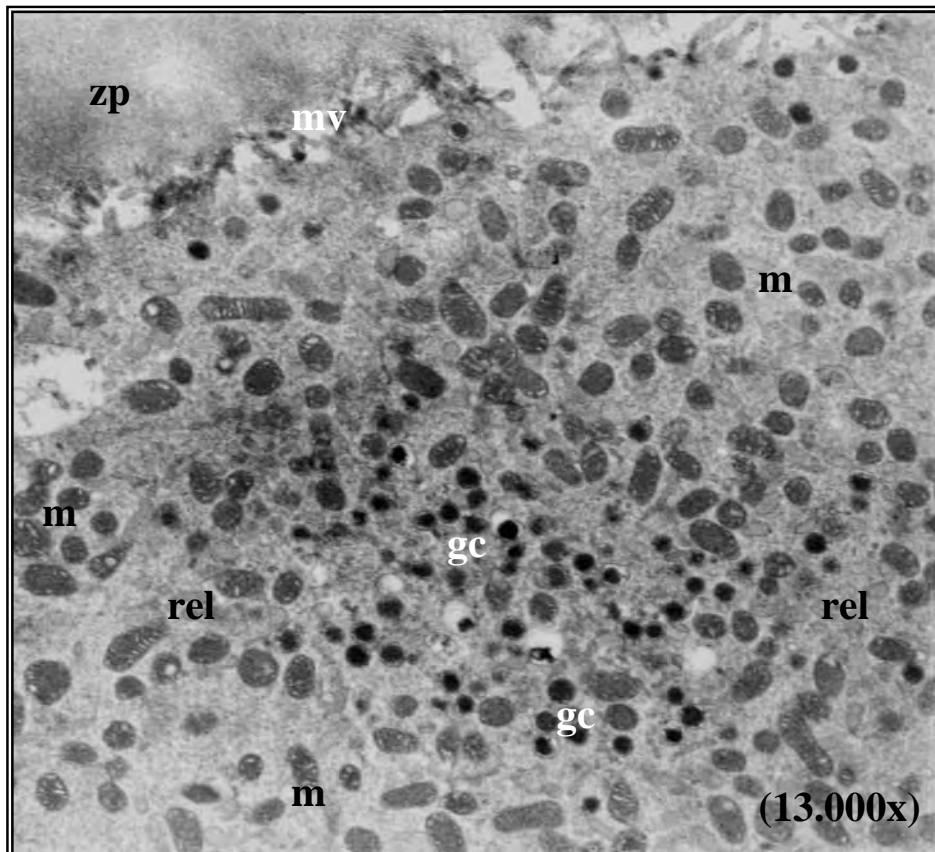
m = mitocôndrias; l = lipídeo; zp = zona pelúcida

Figura 25: Aspecto geral de um oócito superovulado de eqüino.



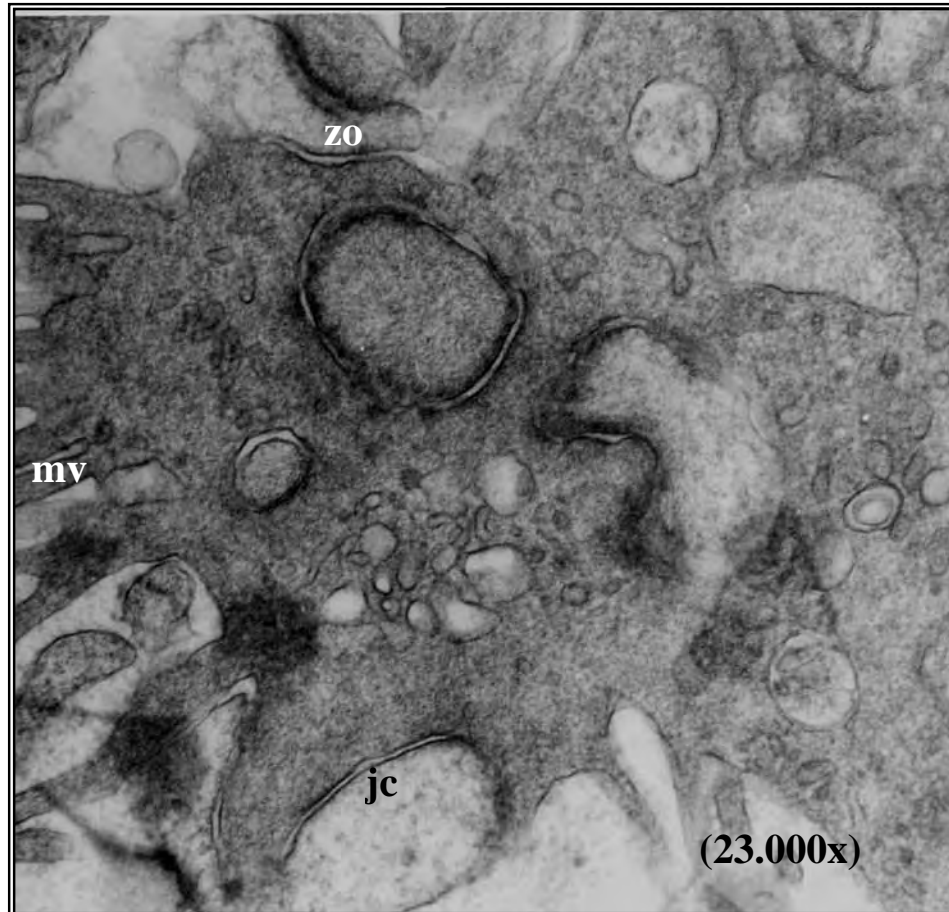
ep = espaço perivitelínico; mv = microvilosidades; m = mitocôndrias

Figura 26: Detalhe da região cortical de oócitos de equino superovulado, mostrando a presença de Golgi (G) bem desenvolvido e a metabolização de lipídeos (l). Notar a presença de vesículas recobertas (ve1) na face cis e vesículas lisas (ve2) na face trans do Golgi.



zp = zona pelúcida; **m** = mitocôndria; **mv** = microvilosidades; **rel** = retículo endoplasmático liso.

Figura 27: Grânulos corticais (gc) associados a mitocôndrias, distribuídos pelo citoplasma de oócitos superovulados de eqüinos.



jc = junção comunicante; zo = sônula de oclusão; mv = microvilosidades

Figura 28: Aspecto das junções celulares entre o oócito e as células da granulosa presentes nos oócitos superovulados.

4.5.2.2 Avaliação oocitária por meio da microscopia confocal

Os resultados da avaliação oocitária através da microscopia confocal demonstraram um maior número de oócitos em MI (40% - 11/27 oócitos) em relação a MII (15% - 04/27 oócitos) em éguas superovuladas, a despeito de não haver uma diferença estatística, o valor numérico em MI foi maior do que MII, o que indica um problema na maturação oocitária. Quanto ao alto número de oócitos não definidos (44% - 12/27 oócitos), podem ter ocorrido um problema na coloração e/ou na leitura confocal, visto que na microscopia eletrônica não foi observado um alto número de oócitos degenerados.

Tabela 11: Número e percentual de oócitos recuperados do oviduto de éguas do grupo controle e superovulado com extrato de pituitária eqüina.

GRUPOS	N ^o ÉGUAS	N ^o OÓCITOS	N ^o OÓC./MI	N ^o OÓC./MII	N ^o OÓC./ND.
SUPEROVULADO	13	27	11 (40%)	4 (15%)	12 (44%)

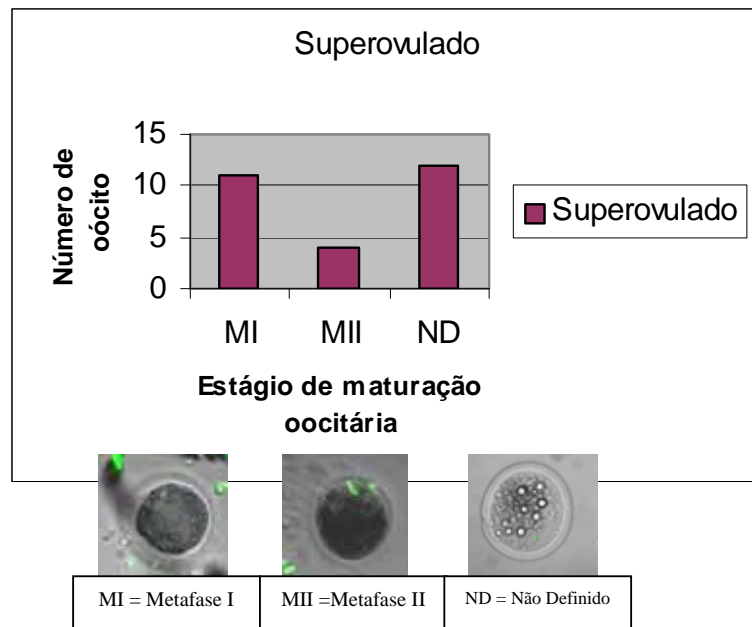


Figura 29: Número médio de oócitos recuperados em diferentes estágios de maturação do grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.

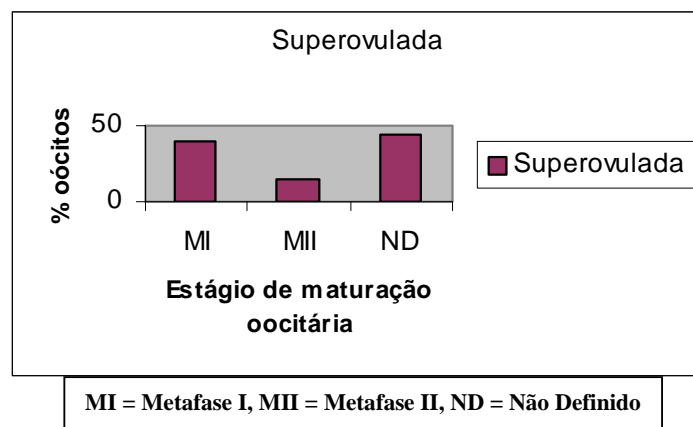
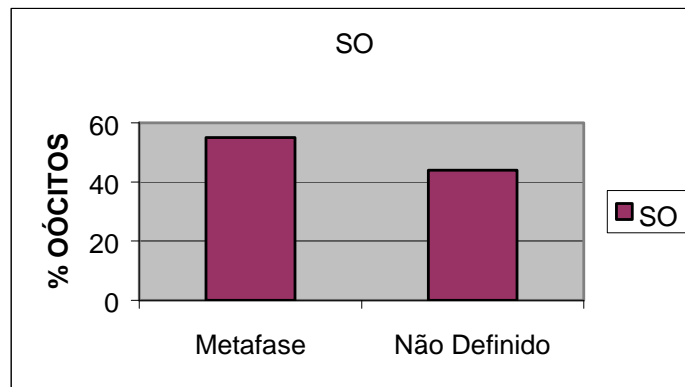


Figura 30: Percentual de oócitos recuperados em diferentes estágios de maturação grupo superovulado com extrato de pituitária eqüina.



SO = Grupo Superovulado

Figura 31: Percentual de oócitos em estágio de metafase e não definido em éguas superovulado com extrato de pituitária eqüina.

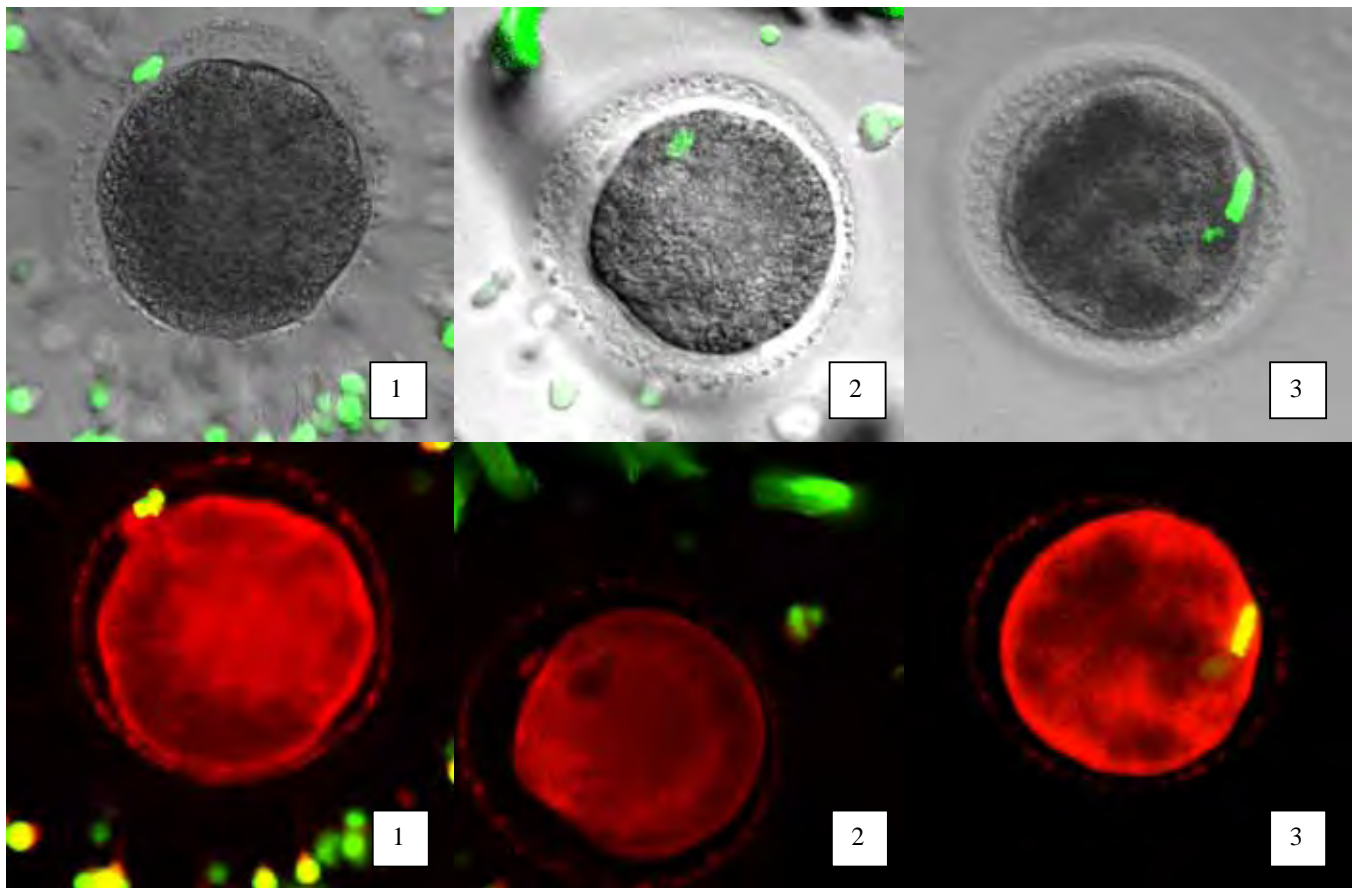


Figura 32: Oócitos avaliados através da microscopia confocal, apresentando o corpúsculo pola (1), placa metafásica I (2), placa metafásica II (3).

4.5.3 DISCUSSÃO

4.5.3.1 Maturação citoplasmática

A principal característica dos oócitos de eqüinos estudados, independente de seu estado de maturação foi a presença de uma grande quantidade de gotas de lipídeo. Nos oócitos de ambos os grupos estas estruturas foram vistas em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, apresentando conteúdo amorfo de densidade eletrônica média. De acordo com Flemming & Saacke (1972) e Kruip et al. (1983) esta associação sugere a formação de unidades metabólicas. A aparência do conteúdo presente nos oócitos do grupo controle, nos quais as gotas parecem vazias e a associação menos consistente com as mitocôndrias, parece indicar que o processo de maturação demanda a metabolização do conteúdo destas gotas. No entanto, o fato de no grupo de oócitos superovulados estas gotas apresentarem restos de membranas, indica a metabolização do material nelas contido, ou seja, imaturidade, uma vez que nos oócitos deste grupo a metabolização de lipídeos, provavelmente colesterol, ainda está ocorrendo. Embora não existam relatos de produção de esteróides por oócitos de eqüinos, é conhecida a capacidade do embrião de eqüino em produzir estrógeno em seus estágios iniciais do desenvolvimento (Ginther, 1992). É possível que o RNAm para as enzimas que controlam a produção de hormônios esteróides seja armazenado no ovócito nos seus estágios finais de maturação.

Durante a fase de crescimento dos oócitos de mamíferos, ocorre concomitantemente um aumento no número de mitocôndrias, bem como a modificação de sua morfologia. Neste estudo, não foram observadas diferenças com relação a morfologia das mitocôndrias dos oócitos analisados, mas a associação destes com gotas lipídicas parece menos freqüentes nos oócitos do grupo controle.

A presença de complexo de Golgi localizado na periferia dos ovócitos foi observada em ambos os grupos estudados. Entretanto, nos oócitos do grupo superovulado, o complexo de Golgi apresentou-se mais desenvolvido, constituído

por inúmeras lamelas dilatadas associadas a vesículas membranosas de elétrondensidade variável. Além disso, grânulos semelhantes aos grânulos corticais foram observados na proximidade desta organela. Nos oócitos do grupo controle, o complexo de Golgi, também presente na periferia, apareceu com tamanho reduzido indicando menor atividade, o que poderia ser explicado por já ter concluído a produção dos grânulos corticais. Estes achados estão de acordo com o observado por Hyttel et al. (1989) que observaram complexos de Golgi menos desenvolvidos em oócitos bovinos maduros.

Em eqüinos, Landim-Alvarenga & Alvarenga (2006), trabalhando com oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* por 24 a 36 horas, descreveu que, enquanto o oócito maturados *in vivo* apresentavam inúmeros grânulos corticais, com forma e tamanho homogêneo, localizados próximo a membrana vitelínica, após 24 a 36 horas de maturação *in vitro* os grânulos corticais apresentavam-se com tamanho e elétrondensidade variável e distribuídos aleatoriamente na região cortical do oócito, mas sem alinhamento. Estes achados estão de acordo com o observado neste experimento, em oócitos superovulados onde os grânulos corticais apresentavam conteúdo de elétrondensidade variável, tamanho heterogêneo e se encontravam dispostos na região cortical, mas não alinhados.

Nos oócitos obtidos de folículos superovulados foi observado um espaço perivitelínico preenchido por microvilosidades, e algumas regiões onde as células da granulosa se encontravam aderidas a membrana do ovócito através de Junções comunicantes (Hyttel et al., 1989). Estes achados indicam mais uma vez imaturidade citoplasmática incompleta. A conexão entre as células da granulosa e o ovócito tem sido observada por diferentes pesquisadores há várias décadas, estabelecendo-se a existência de uma íntima conexão e interação entre estes dois tipos celulares (Browder, 1984).

De acordo com Odor (1960), no folículo pre-ovulatório, os processos das células da granulosa começam a se retrair, e no momento da formação do 1º corpúsculo polar o espaço perivitelínico se encontra aumentado, não sendo mais observadas junções celulares entre as células somáticas e o oócito. De fato, no

grupo controle não foram observadas junções comunicantes entre as células da granulosa e o oócito. Em mamíferos, a dissociação progressiva das células do cúmulus do oócito ocorre em resposta ao estímulo gonadotrófico durante o período pré-ovulatório (Gilula et al., 1978). Aparentemente esta perda de contato é importante para a finalização da maturação citoplasmática e preparação para a fertilização Eppig & Downs (1987).

4.5.3.2 Maturação nuclear

A grande maioria dos trabalhos voltados ao estudo de agentes estimulantes da função ovariana, concluem que os tratamentos hormonais visando a superovulação leva a baixo número de embriões recuperados bem como um aumento de estruturas inviáveis em consequência de distúrbios no mecanismo de maturação oocitária (Monniac et al., 1983; Hyttel et al., 1991; Scoggin et al., 2002; Carmo, 2003).

Em nosso experimento encontramos um elevado percentual de oócitos no estágio de metáfase I, metáfase II e não definidos de 40% (11/27), 15% (04/27) e 44% (12/27) respectivamente. Estes valores são diferentes dos obtidos por Aguilar et al. (2002) em éguas jovens (3 a 8 anos) não superovuladas, onde observaram um percentual médio de oócitos recuperados do oviduto em MI de 19% (04/21), MII 52,4% (11/21) e cuja maturação nuclear não pode ser definida (ND) de 28,4% (06/21). Sendo também nossos resultados diferentes dos observados por Losinno (2006) quando avaliou a maturação nuclear de oócitos do oviduto obtido de folículos pós ovulados em 21 éguas jovens, onde o percentual foi de 19,0%; 52,3% e 28,7% respectivamente, para os estágios de MI e MII e de não definidos.

Aguilar et al. (2002) e Losinno (2006) relataram um maior número de oócitos ND em éguas velhas (53,3 e 53,4) do que em éguas jovens (28,4 e 28,7). Estes valores observados em éguas velhas são semelhante aos nossos achados em éguas (jovens) superovuladas (44%), demonstrando haver um problema na maturação oocitária, já que observamos também um maior percentual de oócitos em MI (40%) do que em MII (15%). Na maioria dos mamíferos, a ovulação ocorre

quando o oócito se encontra em MII e quando há formação do primeiro corpúsculo polar (Baker, 1982), com algumas exceções como no caso de cães (Thibault, 1993). Vale destacar que utilizamos o mesmo laboratório e técnicas utilizadas por Aguila et al. (2002) e Losinno (2006) para avaliação da microscopia confocal dos oócitos.

Hamilton & Day em 1945, ao reportarem os primeiros estudos sobre o estágio de maturação nuclear oocitária no oviduto de folículos pós ovulados em eqüinos, relataram não observar corpúsculo polar e concluirão que a égua ovula em Metáfase I (MI). Entretanto alguns anos depois este relato caiu em descrédito, onde Niekerk (1966) observou a presença de corpúsculo polar descrevendo que a éguas ovulam na maioria da vezes oócitos em estágio de Metáfase II (MII).

Posteriormente vários trabalhos demonstraram que 80% dos oócitos aspirados de folículos pré-ovulatórios de éguas se encontram em prófase II da meiose (Kirp et al., 1987; Palmer et al., 1991).

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

Carmo (2003) e Alvarenga et al. (2001) observaram grandes variações no tamanho bem como no estágio de desenvolvimento entre embriões recuperados de éguas superovuladas com EPE. Esta observação é um forte indicativo de que esteja ocorrendo a ovulação de oócitos em diferentes estágios de maturação, onde provavelmente os oócitos imaturos concluem a sua maturação no oviduto, apresentando assim um atraso no seu desenvolvimento em relação aos demais. Esta observação corroboram nossos achados, onde encontramos um elevado percentual de oócitos em metáfase I, as quais provavelmente terminam a maturação no oviduto após ocorrer a ovulação. O elevado percentual de estruturas não definidas é um indicativo que muitos oócitos são ovulados degenerados ou se degeneram durante o transito pelo oviduto.

Sabidamente em vacas quanto maior a resposta superovulatória pior a qualidade dos embriões recuperados, da mesma forma uma resposta exacerbada

ovariana reduz a proporção de folículos que ovularão. Provavelmente ambas as observações sejam conseqüência de uma redução na resposta das células da granulosa ao LH (Saumande & Chupin, 1986).

Um único trabalho foi encontrado na literatura onde se estudou através na microscopia óptica a maturação nuclear de oócitos de éguas superovuladas (Bézar et al., 1995). Neste trabalho as éguas foram tratadas com extrato de pituitária eqüina contendo uma maior quantidade de FSH ao LH. Estes autores não encontraram diferença entre éguas controle e tratadas com EPE no percentual de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II, tendo sido este percentual de 87% e 81% para os grupos controle e tratado respectivamente. Acreditamos que a maior taxa de recuperação de oócitos em metáfase II observado neste experimento estejam relacionados a baixa resposta superovulatória, onde estes autores obtiveram em média 2,3 ovulações por égua tratada. Reforçando mais uma vez nossa hipótese de que quanto menor a resposta ovariana à drogas que estimulem o crescimento de múltiplos folículos, melhor será a maturação folicular e oocitária, com conseqüente melhoria nos índices de recuperação de embriões.

Em função de não termos avaliado individualmente os oócitos por égua aspirada, não nos foi possível comparar a maturação oocitária de acordo com a resposta superovulatória.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permite concluir que:

- A superovulação interfere no transporte oocitário em éguas com um número maior de três ovulações, possivelmente pela dificuldade na migração do oócito para o oviduto em decorrência da formação de grande coágulo de sangue na fossa de ovulação.
- Há uma maior dificuldade na recuperação de oócitos de folículos aspirados em éguas superovuladas devido a dificuldade na manipulação ovariana e/ou imaturidade folicular e oocitária.
- Existe uma maior variação entre indivíduos nos níveis hormonais de estrogênio, testosterona e inibina no fluido folicular de éguas superovuladas.
- O tratamento superovulatório interfere na maturação oocitária, tanto nuclear como citoplasmática conforme indicado pelo baixo percentual de oócitos em metáfase II, bem como pelas características ultra-estruturais observadas.

6. CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Dentre os diferentes achados do presente trabalho o que mais nos inquietou e diferiu de observações de estudos realizados em outras espécies, foi a formação, nas primeiras 12 horas após ovulações, de um grande coágulo de sangue na fossa de ovulação das éguas com melhor resposta superovulatória. O entendimento dos fatores determinantes deste distúrbio é de suma importância para que se determinem medidas para evita-lo ou mesmo minimiza-lo. Devendo estes estudos, em nossa opinião, focar os fatores de coagulação intra-foliculares e também a vascularização folicular.

Até que se defina a melhor estratégia de controle deste distúrbio estudos voltados a determinação de protocolos que consistentemente induzam duplas e triplas ovulações nos parece ser o melhor caminho a ser seguido de imediato, na tentativa de recuperar um maior número de embriões de éguas doadoras ao longo da estação reprodutiva.

A análise conjunta de todos os experimentos realizados demonstra claramente que o tratamento com Extrato de Pituitária Eqüina visando superestimulação ovariana levou a uma série de alterações nos mecanismos de maturação folicular e oocitária, bem como na migração do óvulo para o oviduto.

Dentre estas foram mais expressivas as alterações no transporte de oócitos para o oviduto, principalmente nas éguas que apresentaram mais de três (3) ovulações. Observamos também nestas éguas com melhor resposta ovariana um maior acúmulo de sangue na fossa de ovulação.

Permitindo-nos concluir que estas duas observações estão inter-relacionadas, ou seja, o acúmulo de sangue coagulado provavelmente impede, em um determinado momento, a migração de alguns oócitos para o oviduto.

Observamos que o ambiente folicular também sofreu alterações como consequência do tratamento com EPE, tendo sido mais marcante a grande variação na capacidade esteroideogênica entre indivíduos. Os oócitos também mostraram alterações estruturais tanto na maturação citoplasmática como nuclear.

A associação destes distúrbios certamente responde ou pelo menos melhor elucidada dúvidas que existiam acerca das causas ou fatores determinantes da

baixa recuperação embrionária bem como da variação individual no que diz respeito a produção de embriões quando da superovulação de éguas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.30, p. 259 – 271, 1993.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.94, p.177 – 188, 1992.
- ADASHI, E.Y; RESNICK, C.E.; BRODIE, A.M.H.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, 117, 2313-2320, 1985.
- AGUILLAR, J.J.; LOSINNO, L.; KONCURAT, M.; MIRAGAYA, M.H. Nuclear cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocyte in young and aged mares. **Theriogenology**, v.58, p. 689-692, 2002.
- ALFURAIJI, M.M.; ATKINSON, T.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M. Superovulation in cattle using PMSG followed PMSG-monoclonal antibodies. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.99-109, 1993.
- ALLEN, W.R. **Embryo transfer in the horse**. In: Adams, C.E. (Ed): Mammalian egg transfer. Boca Raton, CRC Press, 1982. p. 135 – 154.
- ALVARENGA, M.A., MCCUE, P.M., SQUIRES, E.L., NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory. Response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. **Theriogenology**, v56, p.879-887, 2001.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recovery equine embryos. **Equine Vet. J. London**, v.15, p.111-112, 1993.
- ALVARENGA, M.A.; LIMA E SILVA, R.; LANDIM E ALVARENGA, F.C. Protein composition and concentration in equine follicular fluid collected by O.P.U. **SBTE**, v.28, p.185, 2000.

- ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superestimulation in mares treated with EPE twice daily. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, suppl. 27, p. 197, 1999.
- ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory. Response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-887, 2001.
- ALVIM, M.T.T.; MATOS, S.P.M.; SALIBA, W.P.; BELISÁRIO, H.; BRANDÃO, F.Z.; PALHARES, M.S.; SILVA FILHO, J.M. Effect of two commercial products (Pluset®VS Folltropin®) on the superovulatory response and the production of embryos in nelore cows. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Poto Alegre, v.28, p.189, 2000.
- ANDERSON, E.; ALBERTINI, D.F. Gap junction between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **J. Cell Biol.**, v.71, p.680-686, 1976.
- ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: **Fisiologia e manejo da reprodução eqüina**. 2^o ed, Recife, 1986, p. 57-63.
- ARMISTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7 – 24, 1993.
- ASSEY, R.J., HYTTEL, P., ROCHE, J.F., BOLAND, M. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. **Molecular Reproduction and Desenvopment**, v 39 (1), p. 8-16 , 2005.
- AUSTIN, C.R; SHORT, R.V. Germ cells and fertilization. In: **Reproduction in mamals**. Book 1, Germ cells and fertilization, 2 ed., editora Cambridge University Press, 1982, p.101.
- AYALON, D.; TSAFRIRI, A.; LINDNER, H.R.; CORDOVAT, T.; HARREL, A. Serum gonadotropin levels in pro-estrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v.31, p.51-58, 1972.
- BAILEY, V.E.; DOUGLAS, R.H. Induction of ovulation in seasonally- anovulatory mares with GnRH. **American Society Animal Science Meeting**. Abstr. p.133, 1977.

- BARROS, B.J.P.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation nelore cows with 250IU of follicle stimulating hormone, **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.25, p.175, 1997.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; ANDREUSSI, P.A.T. Superovulation and fixed-time artificial insemination. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, p.49-60, 2000.
- BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biol. of Reprod.**, v. 28, p. 235 – 247, 1983.
- BAVISTER, R.D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of Golden hamster eggs. **Gamete Res.**, v.23, p139 – 158, 1989.
- BECKERS, J.F.; DRION, P.V.; FIGUEIREDO, J.R.; GOFFINN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: *in vivo* grow and *in vitro* culture. **Reprod. Dom. Anim.** Berlin., v. 31, p. 543-548, 1996.
- BERGFELT, D.R. GASTAL, E.L., GINTHER, O.J. Response of estradiol end inhibin to experimentale reducede nuteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biol. Reprod.** , v.65, p.426-432, 2001.
- BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.38, p. 87 – 98, 1989.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Superovulation of cows with PMSG: variations in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortizsol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicjes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.15, p.37-52, 1987.
- BEZARD, J.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Preovulatory maturation of follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 261 – 271, 1995.
- Bézard, J.Aspects of *in vivo* and *in vitro* fertilization of the equine oocyte. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.25 (1), p. 36-61, 1997
- BO, G.A.; BIELANSKI, A.; PALASZ, A.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R. **Octavo curso de superovulación, colección y transferencia de embriones**. Cordoba: Instituto de reproducción animal Córdoba (IRAC), 2000, p.113.

- BO, G.A.; HOCKLEY, D.; TRIBULO, H.; JOFRE, F.; TRIBULO, R.; BUSSO, N.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Follitropin-V in the cow, **Theriogenology**, v.35, p.186, 1991.
- BO, G.A.; HOCKLEY, D.K.; NASSER, L.F.; AND MAPLETOFT. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of follitropin-V in beef cattle. **Theriogenology** v.42, p.963-975, 1994.
- BO, G.A.; MAETINEZ, M.; NASSER, L.F.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. Follicular dynamics in Bos-Indicus and Bos-Taurus beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: **10th Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, (Abstr.) v.2, p.221, 1993.
- BOGH, I. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration: a technique and its applications. PhD Thesis. **The Royal Veterinary and Agricultural University**, Copenhagen, Denmark, 2003.
- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v. 10, p. 175, 1978.
- BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Embryo production in vitro: problems and prospects. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F. **Embryonic development and manipulation in animal production**, p.195-206, 1992.
- BOUSQUET, D.; BRACKETT, B.G. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. **Theriogenology**, v. 17, p.198 – 213, 1982.
- Bracher, V., et al. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. **Equine Vet J.**, v.15 (Suppl), p.75-78, 1993.
- BRACKETT, B.G.; YOUNIS, A.I.; FAYER-HOSKEN, R.A. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocyte matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. **Fertil. Steril.**, v. 52, p. 319-324, 1989.
- BRANNSTROM, M. AND HELLBERG, G.P. Bradykinin potentiates LH-induced follicular rupture in the rat ovary perfused in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 4, p. 475 – 481, 1989.

- BRASELTON, W.E.Jr., MCSHAN, W.H. Purification and properties of follicle-estimating and luteinizing hormones from horse pituitare glands. **Arch. Biochem. Biophys.** V. 139, p.45-58, 1970.
- BROWDER, L.W. Oogenesis. In: **Deselopmental Biology**. Ed: Sauders college Publishing, p. 248-323, 1984.
- BRUCK, I., SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. **Theriogenology**, 47, 1157-1167, 1997.
- BRUCK, I.; LEHN-JENSEN, H. Multiple concepti after spontaneous multiple ovulation in a mare. In: **IV International Symposium on Equine Transfer and Other Advanced Technique**, Reims, France, 4, 1997. (ababstract)
- BRUCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound – guided technique. **Equine Veterinry Journal** (Supplement), v.24, p.58-59, 1992.
- BURATINI JR. J. Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando a ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de Progesterona e hormônio Luteinizante. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual Paulista UNESP – Botucatu, p. 27 – 39, 1997.
- BYSKOV, A.G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. **Physiol Revi.**, v. 66, n.1, p. 72 – 117, 1986.
- CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; BÓ, G.A. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in beef cattle treated with CIDR-B, estrogen and progesterone. **Theriogenology**, v.51, p.403, 1999.
- CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C.; MAULEON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fertil.**, v. 55, p. 27 – 36, 1979.
- CALDAS, M.C.S., CUNHA, F.Q., ROSA E SILVA, A.A.M. Presença do oxido nitrico no fluido folicular ovariano de éguas: correlação com concentrações de 17 β -estradiol e tamanho do folículo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, (supl.) v.27, n.1, p.222, 1999
- CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.25, p.71-86, 1986.

- CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; BAK, A.; GOTFREDSON, P.; HOLM, P. Preovulatory plasma estradiol-17 β concentrations and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. **Theriogenology**, Los Altos, v.34, p.251-258, 1990.
- CARBODEVILA, J.; TORQUATI, S. Factores que modifican la respuesta superovulatoria en bovinos, **Rev. Arg. Prod. Animal.**, v.11, n.1, p.57 – 78, 1991.
- CARMO, M.T. Comparação entre doses constantes e decrescente de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual Paulista UNESP – Botucatu, p.154, 2003.
- CARMO, M.T., LOSINNO, L., AGUILAR, J.J., ARAUJO, G.H.M., ALVARENGA, M.A. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares, **Equine Reproduction Science**. v.94, pg337-339, 2006.
- CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; LEÃO, E.S.C.; SIQUEIRA, E.S.C.; ALVARENGA, M.A. Superovulação em hamster utilizando extrato de pituitária equina com doses constantes e doses decrescentes. In: **5^o Amostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu**, anais, Botucatu (UNESP), p. 60, 2001.
- CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MACHADO, M.S.; MEDEIROS, A.S.L.; LEÃO, K.M.; GOMES, G.M.; CARVALHO, L.R.; ALVARENGA, M.A. In: Superovulatory response of mare treated twice daily with equine pituitary extract utilizing constant and decresiasing doses – Preliminares Results – **Annual meeting of Society for Theriogenology**, Proceedings, Colorado Springs, CO, USA, 2002a
- CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; ALVARENGA, M.A. Incidence of múltiple ovulations in Brazilian Jumping Horse mare and implications in embryo transfer programme. **15^o international congress on animal reproduction (ICAR)**, Abstract, v.2, p.406, 2004.
- CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de

- embriões.. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, pg. 252 – 254, 2002b
- CARMO, M.T; MACHADO, M.; ALVARENGA, M.A. Comparação da resposta superovulatória em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina em doses constantes e decrescentes. **Anais da XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)**. Supl. 31, p. 284-285, 2003.
- CARNEIRO, G.F., MUNRO, C.J., LEUTENEGGER, C.M., LORENZO, P.L., BALL, B.A, LIU, I.K.M. Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vitro maturation of equine oocytes during follicular growth. **Theriogenology**, v.58, p. 685-688, 2000.
- CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; HYDE, D.; ANDERSON, G.B.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Mol. Reprod. Devel.**, v. 63, p. 451-458, 2002.
- CARNEVALE, E.M. et al. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology** v.64, p. 519- 527, 2005
- CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Sci.** 82/83, pg. 617-624, 2004.
- CARNEVALE, E.M., MACLELLAN, M.A., COUTINHO DA SILVA, C.M., SCOGGIN, C.F., SQUIRES, E.L. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Animal reproducation Science**, 68, 305-314, 2001.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 209-214, 1995.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer oocytes inthe mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13 (6), p.331-333, 1993.

- CHANDRA, Y.R.; NARAYAN, P.G.; RAJIV, S.; SUMANT,V.; SUNDER,S.S.
Repeated superovulation in cattle using CIDR-B and porcine FSH.
Theriogenology, v.57, n.1, p. 772, 2002.
- CHUPIM, D.; COGNIE, Y.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.21, p.229, 1984.
- CHUPIM, D.; COGNIE, Y.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R.; SAUMANDE, J. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: ROCHE, J.F.; O'CALLAGHAN, D. (Eds). **Follicular growth and ovulation rate in farm animal**. Martinus Nijhoff: Hague, 1987, p.66 – 72.
- COCHRAN, R., et al. Live foal produced from sperm injected oocytes derived from pregnant mares.**J. Equine Vet. Sci.**, v.18 (11), p. 736-740, 1998.
- COOK, N.L, et al..Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes.**J.Equine Vet Sci.**, v. 12 (4), p. 204-207, 1992
- COOK, N.L, et al..Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. **Equine Vet. J.**, v.15 (Suppl), p. 71-74, 1993.
- COUTINHO DA SILVA, M..A. Oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection in horse. **SBTE**, v. 32, p. 55-64, 2004.
- CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Programming the oocyte for fertilization. In: BAVISTER, B.D.; CUMMING, J.; ROLDAN, E.R.S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, p. 35-50, 1990.
- CRAN, D.G.; MOOR, R.M.; HAY, M.F. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. **J. Reprod. Fertil**, v.59, p. 125-132, 1980.
- DAY, F.T. Clinical and experimental observation on reproduction in the mare. **J. Agric. Sci.**, v.30, p.244-261, 1940.
- DE SUTTER, P., DOZORTSEV, D., QIAN, C. ET AL. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v. 11, 595-597, 1996.
- DEANSLY, R.Y. Germ cell development and the meiotic prophase in the fetal horse ovary. **Journal Reproduction Fertility**, v. 23, p. 547 – 552, 1978.

- DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biol. Reprod.**, v.38, p.517-521, 1988.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; VAN TOL, H.T.M.; WILLENSE, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 10, p. 275 – 292, 1986.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; GIELEN, J.TH. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. **Theriogenology**, v.27, p.222, 1987.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; VOS, P.L.A.M.; DE LOOS, F.A.M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**, v.39, p.25-41, 1993.
- DIMMICK M.A, GIMENEZ T, SCHILAGER R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian v.s., Quarter Horse mares. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 31, p. 123 – 129, 1993.
- DIPPERT, K.D.; JASKO, G.E.; SEIDEL, JR.; SQUIRES, E.L. Fertilization rate in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v. 41, p. 1411-1423, 1994.
- DIPPERT, K.D.; RAY, B.S.; SQUIRES, E.L. Aspiration of the dominant follicle in mares and its effect on subsequent follicular development. **Animal Reproduction Science**, v.40, p.77-88, 1995.
- DIPPERT, K.J.; HOFFERER, S.; PALMER, E.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, Los Altos, v. 38, p. 695-710, 1992.
- DIRARD, M.A., RICHARD, F., MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- DONALDSON, L.E.; WARD, D.N. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. **Vet. Rec.** London, v.119, p.625-626, 1986.

- DOUGLAS, R.H.; NUTI, L.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, v.2, p.133-142, 1974.
- DOUGLAS, R.H.; Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, v.11, p.33-46, 1979.
- DOWNS, S.M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 65 – 79, 1993.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 55 – 72, 1991.
- DRIANCOURT, M.A.; GOUGEON, A.; ROYERE, D. et THIBAUT, C. La fonction ovarienne. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C. (ED.), **La Reproduction chez les Mammifères et L'homme**. Paris, 1991, p. 273 – 298.
- DRIANCOURT, M.A.; PALMER, E. Time of ovarian follicular recruitment in cyclic pony mares. **Theriogenology**, v. 21, p. 591-600, 1984.
- DUARTE, M.B. Incidência de ovulações duplas, gestações gemelares e eficácia da reprodução manual de gêmeos em éguas quarto de Milha. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Uberaba, 2003.
- ELSDEN, R.P.; HASLER, J.F.; SEIDEL, G.E.JR.; Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v. 06, p. 523-529, 1976.
- ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D.; SEIDEL, G.E.JR. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, v.9, p.1-26, 1978.
- ELVIN, J.A.; YAN, C.; MATZUK, M.M. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. **Mol. Cell. Endocrinol**, v. 159, p.1-5, 2000.
- ENDERS, A.C.; LIU, I.K.; BROWERS, J.; LANTZ, K.C.; SCHLAFKE, S.; SUAREZ, S. The ovulated ovum of the horse: Cytology of nonfertilized ova to pronuclear stage ova. **Biol. Reprod.**, v. 37, p. 452 – 466, 1987.
- EPPIG, J.J. AND O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. of Reprod.**, v. 54, p. 197 – 207, 1996.
- EPPIG, J.J. Growth and development of mammalian oocytes in vitro. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.116, p. 379 – 382, 1992.

- EPPIG, J.J.; DOWNS, S. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induce oocyte maturation. **Dev. Biol.**, v.119, p. 313-321, 1992.
- ERICKSON, G.F. An analysis of development and ovum maturation. Sem. **Reprod. Endocrinol.**, New York, v. 4, p. 233-254, 1986.
- ESPEY, L.L. Ovarian contractility and its relationships to ovulation: a review. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 73, 1978.
- ETESTONE, W.H.; BOER, H.A. FSH enhances developmental potential of bovine oocyte matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 39, p.216, 1993.
- FARINASSO, A.; BRANQUINHO, J.A.; RUMPF, R.; ALVARENGA, M.A. Utilização de baixa dose de extrato de pituitária equina para indução de ovulações múltiplas em éguas. **Anais da XIX reunião anual da SBTE**, supl. 33; p.135-138, 2005.
- FERNANDES, C.A. **Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal**. Universidade de Alfenas, 2000.
- FERNANDES, C.A.C.; SANTOS, I.C. Follitropin-v dose-response to superovulation on cattle heifers. **Arq. Fac. Vet. UFRG**, v.28, p.238, 2000.
- FERNANDES, M.; SANCHEZ, L.; ALVAREZ, F.S.; VAZQUEZ, C.; IGLESIAS, A. Superovulation in rubia gallega cows with a single subcutaneous injection of FSH. **Theriogenology**, v.39, p.217, 1993.
- FEVOLD, H.L. Extraction and standardization of pituitary follicle stimulating and luteinizing hormones. **Endocrinology**, v. 24, n^o 4, p. 435 – 446, 1939.
- FIGUEIREDO, J.R. Isolament, characterization et culture de follicules preantaux chez les bovins. 1995, p.113. **Tese (Doutorado)** Universete de Liege, Liege.
- FINDLAY, J.K.; XIAO, S.; SHUKOVSKI, L.; MICHEL, U. Novel peptides in ovarian physiology; Inibin, Activin and follistatin. In: E. Y. Adashi and P>C>K> Leung (Ed.) **The Ovary**. Raven Press, p 413-430, 1993.
- FLEMMING, W.N.; SAACKE, R.G. Fine strutire of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **J. Reprod. Fertil.**, v.29, p. 203-213, 1972.

- FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; FIGUEIREDO, J.B.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 39, n.3, p. 485-487, 1987.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 225 – 232, 1994.
- FORTUNE, J.E.; KIMMICH, T.L. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. **Equine Vet. J.**, London, v.15 (suppl), p.95-98, 1993.
- FRANCO, V.C.L. Fertilidade de éguas crioulas após aspiração folicular. **Programa de pós Graduação em Medicina Veterinária, UFSM**, Santa Maria-RS, Brasil, 2005.
- FRANZ, L.C.; MEIRA, C.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Effect of time and temperature during transport of ovaries on nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, (Abstract) v. 57, p. 718, 2002.
- FRITZ, M.A.; SPEROFF, L. The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. **Fertil. Steril.**, v. 38, p. 509 – 529, 1982.
- GERARD, N., MONGET, P. Intrafollicular insulin-like growth factor binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1508-1514, 1998.
- GERARD, N.; LOISEAU, S.; DUCHAMP, G.; SEGUIN, F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in mare using proton nuclear magnetic resonance (¹HNMR). **Reproduction**, v. 124, p. 241-248, 2002.
- GILULA, N.B.; EPSTEIN, M.L.; BEERS, W.H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. **J. Cell Biol.**, v.78, p.58-75, 1978.
- GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **J. Reprod. Fertil.**, v. 90, p. 311 – 320, 1990.

- GINTHER, O.J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos and type of embryos fixation in mares. **Journal Equine Veterinary Science.**, v. 7, p. 82 – 88, 1987.
- GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare.** Basic and applied aspects, 2^o ed. Cross Plains: Equiservices, 1992, 640p.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 105-111, 1993.
- GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223 – 230, 1989.
- GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Equine Vet. Sci.**, v. 9, p. 4 – 12, 1989.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, P.M.; FRICKE, J.R.; GIBBONS, L.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, Madison, v.55, p. 1187 – 1194, 1996.
- GINTHER, O.J; DOUGLAS, R.H. The outcome of twin pregnancies in mares. **Theriogenology**, v.18, p.231-244, 1982.
- GINTHER, O.P. Ultrasound imaging and reproductive events in the mare. **Equiservice**, 1986. p.377.
- GONG, J.G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhancer the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, Los Altos, v.45, p.611-622, 1996.
- GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas: Aplicações á Reprodução Animal.** São Paulo: Varela, 2002, p. 340.
- GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, v.33, p.519 , 1990.

- GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, v.33, p.519-529, 1990.
- GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Can. Vet. J.**, v.35, p.158-162, 1994.
- GORDON, I. Recovering the primary oocyte. In: Gordon, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: Raven Press, 1994. p. 71-82.
- GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **J. Zool.**, v. 2, p. 169-175, 1987a.
- GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. **J. Zool.**, v. 211, p. 157-168, 1987b.
- GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, N. Maturation-promoting factor (MFP) and mitogen activated protein Kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Mol. Hum. Reproduction.**, v. 4, p. 563-570, 1998.
- GOUDET, G.; BEZÁRD, J.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicular size and hormonal environment. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 232 – 245, 1997.
- GRAN, D.G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.38, p. 49-62, 1989.
- GRAY, B.W.; STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, M.G.; RIDDELL, K.P.; DAVENPORT, G.; WRIGHT, J.C. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.227, 1993.
- GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRUCK, I.; VIUFF, D.; BEZÁRD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. IN-VITRO production of equine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 299 – 307, 1995.

- GUILLOU F.; COMBARNOUS Y. Purification of equine gonadotrophins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochem. Biophys Acta*, v. 755, p. 229 – 236, 1983.
- HAFES, E.S.E Reproduction in farm animal. 5^a ed., Philadelphia. Lea & Febiger, 1987, 649p.
- HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal., São Paulo, Manole, 1995, 582p
- HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, v. 126, p.242-252, 1988.
- HAWKINS, D. L.; MACKAY, R. J.; MACKAY, S. L. D.; MOLDAWER, L. L. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediator by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66, p. 1-10, 1998.
- HAWLEY, L.D.; ENDERS, O.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, v.1, p.243-252, 1995.
- HENRY, M.; CORYN, M.; VANDEPLASSCHE, M. Multiple ovulation in the mare. *Zbl. Vet. Med.*, v. 29, p. 170 – 184, 1982.
- HERRLER, A.; EINSPANIER, R.; SCHAMS, D.; NIEMANN, H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbsT) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*, v.41, p.601-611, 1994.
- HINRICHS, K.; KENNEY, D.F.; KENNEY, R.M. Aspiration of oocyte mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*, v.34, p.107-112, 1990.
- HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function and peripheral plasma gonadotropin concentration in the mare. *Biology of Reproduction*, v.44, p.292-298, 1991.

- HIRSHFIELD, A.N. Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepuberal and mature rats. **Biol. Reprod.**, v. 32, p. 979 – 987, 1985.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Ver. Cytol.*, v. 124, p. 43 – 101, 1991.
- HIRSHFIELD, A.N. Heterogeneity of cell populations the contribute to the formation of primordial follicles in rats. **Biol. Reprod.**, v. 47, p. 466 – 472, 1992.
- HOFFER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **J. Reprod. Fertil.**, v. 44, p. 341-349, 1991.
- HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **J. Reprod. Fert.**, Suppl. n.44, p. 341-349, 1991.
- HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. In: Proc. **Ann. Conv. of Am. Assn of Equine Practitioners**, San Francisco, Proceeding, San Francisco, 1972, p. 119 - 148.
- HULSHOF, S.C.J. Bovine preantral follicles and their development in – vitro. 1995, p.108, **Yalelaan – Utrecht of Veterinary Medicine**, p. 108, 1995.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **J. Reprod Fertil**, v.76, p.645 – 656, 1989.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and spermtransport in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.35, p.91 – 108, 1991.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, Los Altos, v. 47, p. 23 – 32, 1997.
- IRELAND, J.J., Control of follicular growth na development. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. v. 34, p. 39 – 54, 1987.
- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: ROCHE, J.F.; O`CALLAGHAN, D.

- Follicular growth and ovulation rate in farm animals.** Boston: M. Nijhoff, 1987, p. 1-18.
- JANSON, P.O. Effects of luteinizing hormone on blood in the follicular rabbit ovary as measured by radioactive microspheres. **Acta Endocrinol.** v.79, p.122-123, 1975.
- JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors and the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*, Los Altos, v. 45, p. 889 – 895, 1996.
- JOHNSON,A.L.; BECKER, S.E. Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrous mare. **J. Equine Vet. Sci.** , v. 8, n^o 02, p. 130-134, 1988.
- KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reprod. Science**, v.48, p.137-157, 1997.
- KANITZ, W., et al. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biol. Reprod.Mono.**v. 1, p. 225-231, 1995.
- KASIRAJ, R.; MUTHA RAO, M.; RANGAREDDI, N.S.; MISRA, A.K. Superovulatory response in buffaloe following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. **Theriogenology**, v.37, p.234, 1992.
- KELLY,P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth ovulatory response and endocrine patterns. **Anim. Reprod. Sci.**, v.46, p. 1-14, 1997.
- KENNEDY, J.F.; DONAHUE, R.P. Human oocytes: maturation in chemically defined media. **Science**, v. 164, p. 1292-1293, 1969.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares. In: **annual convention of american association of equine practioner**, v.21, p. 327-336, 1975.
- KENNEY, R.M.; CONDON, W.; GARJAN, V.K.; CHANNING, C.P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their of viability or atresia. **J. Reprod fertil.**, v.27, 163-171, 1979.

- KNOWLES, R.G. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate **cyclase**. **Proc. Acad. Sci.**, 86(13): 5159-62, 1989.
- KOHRAN, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUIBAULT, L.A. Follicular status and superovulations in cattle: a field trial. **Theriogenology**, v.43, p. 252, 1995.
- KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Gamete Res.**, v.8, p.29-47, 1983.
- KUEHNER, L.F.; RIEGER, D.; WALTON, J.S.; ZHAO, X.; JOHNSON, W.H. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.40, p.1003-1013, 1993.
- LAMBERSON, W.R.; LAMBERTH, V.A. Repeatability of response to superovulation in Brangus cows. **Theriogenology**, v. 26, p. 643-649, 1986.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C. Produção *in vitro* de embriões eqüinos: Avanços e Limitações. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, supl. v.27, n.1, p.54-89, 1999.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PERES, K.R.; FERNANDES, E.S.C.; SIQUEIRA-PYLES, K.M.; LEÃO, M.A.; ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L. Ultrastructural analysis of embryos obtained from superovulated mares. **6TH International Symposium on Equine Embryo Transfer.** , p.31, 2004.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; RUBIN, M.B.; SILVA, C.A.M.; PONCHIROLI, C.B.; ALVES, D.F.; MACLELLAN, L.J. Effect of culture media on in vitro maturation of equine oocyte. **Theriogenology**, (Abstract) v. 57, p. 725, 2002.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A. Structural aspects of equine oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.23 (3-4), p. 513-524, 2006.
- LANGE, H.; REICHENBACH, H.D. Bovine superovulatory treatments: follicle stimulating hormone (FSH) preparations and superovulation treatment

- protocols as sources of variation in embryo transfer **practice**. supl. 25, p.127, 1997.
- LAPIN, D.R. AND GINTHER, O.J. Introduction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with na equine extract. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.44, p.834-842, 1977.
- LASTER, D.B. Disappearance of an uptake of (125I) fsh in the rat, rabbit, ewe and cow. **J. Reprod. Fertil.**, v.30, p.407-415, 1972.
- LINSELL, C.E.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of estrous cycle. **Theriogenology**, v.26, p.209-219, 1986.
- LIU, I.K.M.; LANTS, K.C.; SCHLAFKES, S.; BOWERS, J.M.; ENDERS, A.C. Clinical observations of oviductal masses in the mare. Proc. Ann. Conv. Amer. **Assoc. Equine Pract**, p.41-45, 1991.
- LOOS, de F.A.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMEN, S.J.; KRUIP, T.A.M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. **Theriogenology**, v. 35, p. 537-545, 1991.
- LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, M. Role of EGP, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.44, p.109-118, 1995.
- LOSINNO, L. Patrones Nucleares, Citoplasmáticos y Mitocondriales de ovocitos post-ovulatorios en yeguas de diferentes grupos etarios. **Tese Doutorado**, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, 2006.
- LOSINNO, L.; AGUILAR, J.J. AND LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. **Equine Embryo Transfer**, v. 03, p. 81 – 83, 2000.
- LOUTRADIS, D., DRAKAKIS, P., KALLIANIDIS, K., ET AL. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. **Fertil Steril.**, v. 72, 240-244, 1999.
- MACHADO, M.S.; ARAUJO, G.H.M.; ROSER, J.F.; ALVARENGA, M.A. Perfil hormonal de éguas superovuladas com FSH equino purificado. **Acta Scientiae Veterinariae** 33 (suplemento 1), pg. 194, 2005

- MANCIAUX, L.; PONSART, C.; GRISOUARD, D.; HUMBLLOT, P. Sources of variation in embryo production following superovulation in the Montbeliard breed. **Theriogenology**, v. 53, p. 502, 2000.
- MANTOVANI, R.; MARCOLIN, G.; SILVESTRELLI, L.; BITTANTE, G. Superovulatory response and subsequent reproductive performance. In: **Meeting of the european embryo transfer association**. Lyon, 10, 1994, p.214. Proceedings.
- MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for superovulation. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 16, p. 127 – 141, 1994.
- MAPLETOFT, R.J.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; DEL CAMPO, M.R. The effect of lh content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. **PROC. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.**, De Hague, v.1, p. 237-239, 1992.
- MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. **Embryo Transfer**, v. 11, p.15-24, 1993.
- MARI, G., BARBARA, M., ELEONORA, I. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, 88, 299-308, 2005.
- MASUI, Y.; MARKERT, C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. **J. Exp. Zool.**, v.177, p. 129 -146, 1971.
- MATOBA, S.; KAWATAL, K.; MASAKI, K.; KUDO, S.; SAITO, N. Results repeated superovulation in young holstein heifers using FSH and estradiol benzoate, and following fertility, **Theriogenology**, v.57, p.767, 2002.
- MCCUE, P.M. Superovulation. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.12, n.1, p.1-11, 1996.
- MCCUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASHLEY, B.L. Effect on ovulation rate of passive immunization of mares against inhibin. **Equine Vet. J.**, v.15 (suppl), p.103-106, 1993.
- MCCANN, S.M. et al. The role of nitric oxide in reproduction. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32(11): 1367-79, 1999.

- MCKINN, A.O.; WHEELER, M.B.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. **Equine Veterinary Science**, v.6, p.306-309, 1987.
- MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. Ultrasonography. In: McKinnon, A.O. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993, p. 211-220.
- MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. The estrous cycles. In: McKinnon, **Equine Reproduction**., Malvern: Lea & Febiger, 1993. p. 114 – 189.
- MCKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASSION, R.L. Increased ovulation rate in mares after immunization against recombinant bovine inhibin α -subunit. **Equine Vet. J.**, v.24, p.144-146, 1992.
- MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; COOK, V.M. Equine embryo transfer: A review. **Comp Cont Educ Pract Vet., Princeton Junction**, v.10, p. 343 – 355, 1988.
- MCNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; SMITH, P. Control of early ovarian follicular development. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, p. 3 – 16, 1999.
- MEDEIROS, A.S.L., SILVA JUNIOR, B.L., **CARMO, M.T.**, PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Utilização do extrato de pituitária equina para indução de ovulação em éguas. **XIX Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)**, v.33, pg.195, 2005.
- MEIRA, C., BURATINI, JR. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.125-140, 1998.
- MELO, C.M., PAPA, F.O., MEDEIROS, A.S.L., **CARMO, M.T.**, ALVARENGA, M.A. Efeito da desorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. **XIX Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)**, v.33, pg.194, 2005.
- MELO, D.S.; LEAL, L.S.; GIOSO, M.M.; COSTA, I.B.; MACHADO, M.S.; ASSAF, S.S.; FERNANDES, C.B.; OBA, E. Avaliação das concentrações de IGF-I em folículos de vacas nelore. **Acta Scientiae Veterinariae** 33 (suplemento 1), pg. 333, 2005

- MENTIJES, M. et al. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from Cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. **Biol Reprod Mono** v.1, p. 281-292, 1995.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5 ed. Porto Alegre: Sulina v.1, , 1982.
- MILLER, K.F.; BERG, S.L.; SHARP, D.C. Concentrations of circulating gonadotrophins during various reproductive states in mare. **Biol. Reprod.**, v.22, p.744-750, 1980.
- MOIRA, K.O. et al. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. **Fertil. Steril.**, 70(6): 1143-47, 1998.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p.55-81, 1983.
- MONNIAUX, D.; MARIANA, J.C.; COGMIÉ, Y.; RABAHI, F.; MONGET, P.; MERMILLOD, P.; BARIL, G.; TOMANEK, M.; PISSELET, C.; CHUPIN, D.; POULIN, N.; BREBION. P.; BOSC, M.; NICOLE, A.; FONTAINE, J.; DURAND, P. Controle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammiferes domestiques. **Contracept. Fertil. Sex.**, v. 21, p.403 – 407, 1993.
- MOOR, R.M.; KRUIP, TH.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. **Theriogenology**. Los Altos, v.21, p.103-116, 1984.
- MOOR, R.M.; OSBORN, J.C.; CROSBY, I.M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **J. Reprod. Fertil.** London, v.74, p.167-172, 1985.
- MOURA, J. C. A.; MERKT, H. A **ultra-sonografia na reprodução equina**. 2 ed., Salvador: Universitária America, 1996, p.162.
- Murad, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32(11): 1317-27, 1999.
- MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W.D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, Los Alto, v.21, p.117-125, 1984.
- MURRAY, A.W. The cell cycle as a cdc2 cycle. **Nature**, v. 342, p. 14 – 15, 1989.

- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J.**, 6(12): 3051-64, 1992.
- NEELY D.P.; KIU, I.K.M.; HILLMAN R.B. Endocrinologia Reproductiva y Fertilidad en La Yegua. **Reproduccion equina**, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 1989, p. 1-25.
- NIEMANN, H. Better results the superovulation of donor cows. **Tierzuchter**, v.43, p.34-35, 1991.
- NOGUEIRA M.F.G. Superovulação associada à inseminação artificial com tempo pré determinado em vacas da raça Nelore. 2001, p.67. **Dissertação de mestrado** apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v. 344, p. 503-508, 1990.
- NUTTINCK, F.; COLLETE, L.; MASSIP, A.; DESSY, F. Histologic and autoradiographic study of in vitro effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicle: preliminary investigation. **Theriogenology**, v.45, p.1235 – 1245, 1996.
- O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HITTEL, P.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition and superovulation on oocytes morphologic, follicula fluid composition end systemic hormone concentrations in ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v.118, p.303-313, 2000.
- ODOR, L. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. **J. Biophys Biochem**, v. 07, p. 567-574, 1960.
- OHNO, S. The Y-linked testis determining gene and HY plasma membrane antigen gene: are they one and the same? **Endocrine Reviews**, v. 6, p. 421 – 431, 1985.
- OIKAWA, T.; NUMABE, T.; KIKUCHI, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Repeated induction program of superovulation in cattle throughout one-year using a progesterone device and porcine (p) FSH. **Theriogenology**, v. 49, p. 382, 1998.

- ONUMA, H.; OHNAMI, Y. Retention of tubal eggs in mares. **J. Reprod. Fertil.** Colchester, suppl, 23, p. 507-511, 1975.
- ORLANDI,C.; BERGFELT,D.R.; WECHSLER,F.S.; NOGUEIRA,G.P.; PUOLI FILHO,J.N.P.; MEIRA,C. Resposta ovariana durante a superovulação precedida pela emergência da onda folicular induzida por aspiração dos folículos em éguas cíclicas. **Anais da XX reunião anual da SBTE**, supl. 34; p.278, 2006.
- PALMER, E., HAJMELI, G., DUCHAMPS, G. Gonadotrophin treatment increase ovulation rate but not embryo production from mares. **Equine Vet. J.** (suppl.) v. 15, p. 99-102, 1993.
- PALMER, E.; DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; KING, W.A.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K.J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.689-690, 1987.
- PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic ecography in equine gynecology, **Theriogenology**, Los Altos, v. 21, p. 471 – 483, 1980.
- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Revista Hippius, São Paulo, v. 62, p. 62-64, 1984.
- PARR, E.L. Rupture of ovarian follicles at ovulation. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 22, p. 1 – 22, 1975.
- PASCOE, R. R.; PASCOE, D.R.; WILSON, M.C. Influence of follicular status on twinning rate in mares. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl., v. 35, p. 183 - 189, 1987.
- PASTORELLO, M.; MEIRA, C.; FLEURY, J.J.; DUARTE, M.C.G. Transferência não cirúrgica de embriões em éguas de hipismo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS. Porto Alegre**, v. 24, p. 212, 1996.
- PERES, K.R. Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera. **Biblioteca digital da UNESP (www.biblioteca.unesp.com.br)** Cod.1997, 2004.
- PÉREZ, F.P. Avances en trasplantes de embriones y su repercusion en la produccion de alimentos para el hombre. **Anales de La Academia Nacional de Medicina de Madri**. v.113, p. 115 -149, 1996.

- PETERS, H. The development and maturation of the ovary. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, v. 16, p. 271-278, 1976.
- PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. Los Altos, v. 55, p. 193 – 210, 2001.
- PIERCE, J.G., PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.*, v. 50, p.465-495, 1981.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycles of the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 14, p. 219 – 231, 1987.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development. *Anim. Reprod. Sci.*, London, v.22, p.131-144, 1990.
- PIMENTEL, C.A.; TAROUCO, A. K. J.; HAMMES, A. M. Ovulações múltiplas em éguas abatidas em Pelotas. *A.R.S. Veterinária*, v.10, p. 253, 1994.
- PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: McDonald, L.E. & Pineda, M.H. (ed), **Veterinary endocrinology and reproduction**. Raven Press, Philadelphia, London, 1989, p.303-354.
- PINHEIRO-ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; VISINTIN, J.A.; SOARES, A.T. Resposta superovulatória em caprinos após repetidos tratamentos com gonadotrofina hipofisária suína. *A.R.S. Veterinária*, Jaboticabal, v.11, p.116, 1995.
- PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L; EILTS, B.E; SHORT, C.R; GODKE, R.A. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovulation in hCG-stimulated mares. *Theriogenology* 58, p. 1017- 1026, 2002.
- PRICE, A.C AND SMITH, L. Maturação oocitária, ovulação. **Tópicos Avançados em Reprodução**, FMRP-USP, p.64-121, 1997.
- RIERA, F.L.; ROLDÁN, J.E.; HINRICHS, K. Patterns of embryo recovery in mares with unilateral and bilateral double ovulations. *Equine Reproduction IX*. V. 94, P. 398-399, 2006
- ROBERTSON, J.E.; BAKER, R.D. Role of female Sex steroids as possible regulators of oocyte maturation. In: **Annual Meeting Of The Society For The Study of Reproduction, University Of California**, p.57, 1969.

- ROCHA FILHO, A.N.; LOPES, E.P.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Efeito de baixa dose de extrato de pituitária eqüina e FSH purificado eqüino nas taxas de ovulações e recuperação embrionária em eqüinos. **Anais da XIX reunião anual da SBTE**, supl. 33; p.196, 2005.
- RONDELL, P. Follicular pressure and distensibility. **Amer J.**, v.207, p.590-594, 1964.
- ROSAS, C.A.; ALBERIO, R.H.; BARANÃO, J.L.; AGUERO, A.; CHAVES, M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, v. 49, p. 1257-1264, 1998.
- ROSER, J.F.; AND HUGLES, J.P. Prolonged pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to fertile stallions. **J. Reprod. Fertil**, Suppl. 44, p.155-168, 1991.
- ROSSELLI, M., KELLER, P.J., DUBEY, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Hum. Reprod.** Update, 4, p. 3-24, 1998.
- ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fert. Steril.**, v. 59, p. 783 – 790, 1993.
- RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl. Anat.*, v. 24, p. 77 – 92, 1983.
- Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cell Mol Life Sci** 1997;53(7):576-582.
- SAGATA, N. Meiotic metaphasic arrest in animal science: its mechanisms and biological significance. **Cell Biol.**, v.6, p. 22-28, 1996.
- SANTOS FILHO, A.S.; OLIVEIRA, M.A.L. Superovulation of 5/8 girolando cows with different doses of FSHp, **Arq. Fac. Vet UFRGS**, v.26, p.365, 1998.
- SATHANANTHAN, A.H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of the human oocyte. **Microsc. Res. Tech**, v.27, p. 145-164, 1994.
- SAUMANDE J.; CHUPIN, D. Induction of superovulation in cyclic heifers. The inhibitory effect of large doses of PMSG. **Theriogenology**, v.25, p.233-247, 1986.

- SAUMANDE, J. Ovogenese et folliculogenese. **Rec. Med. Vet.**, Maisons, v.157, p. 29 – 38, 1981
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod Fertil.**, London, v.83, p.663 – 671, 1988.
- SCHAMS, D.; MENZER, CH.; SCHAL LENBERGER, E.; HOFFMAN, J.; HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: Sreenan J.M. (ed), **Control of Reproduction in the Cow**. Hagre: Martinus Nijhoff, The Hague, 1978, p.122-142.
- SCHELLANDER, K.; BRACKETT, B.G.; HISHINUMA, M.; ABASMAZNI, O, MORI, Y.; KANAGAWA, H. Preliminar study of buffalo sperm penetration into zona-free hamster egg after treatment with calcium ionophore A23187. **Japan J. Vet. Res.**, Sapporo, v.37, p.181 – 186, 1989.
- SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p. 151 – 164, 2002.
- SCOTT, H., PURCELL ET AL., Aspiration of oocyte transitional from transitional, cycling and pregnant mares, **Animal Reproduction Science**, 2006
- Seneda, M.M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001
- SETICH, P.L. Transcervical embryo transfer in performance mares. **Journal of the American Association.**, v. 195, p. 940 – 944, 1989, n.7.
- SIRAID, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

- SIROIS J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 37, p. 300, 1992.
- SIROIS, J.; BALL, B.A.; FORTUNE J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycles and after hemiovariectomy in mares. **Equine Vet. J.**, suppl. New market suffolk, v. 8, p. 43 – 48, 1989.
- SMITH, L.D. AND ECKER, R.E. The interation of steroids with Rana pipiens oocytes in the induction of maturation. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 25, p. 232 – 247, 1971.
- SMITH, P.W.S.; BRAW-TAL, R.; CORRIGAN, K.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carriers or non-carriers of the Fec^B gene. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 98, p. 41 – 54, 1994.
- SPICER, L.J.; GEISERT, R.D. Concentrations of insulin-like growth factor-1, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.37, p.749-760, 1992.
- SQUIRES, E.L., CARNEVALE, E.M., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E. Embryo tecnologies in the horse. **Theriogenology**, 59, pg. 151-170, 2003.
- SQUIRES, E.L., MCCUE, P.M., VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91 – 104, 1999.
- SQUIRES, E.L.; MCCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; MCKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, Los Altos, v. 28, p. 609 – 613, 1987b.
- SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O, CARNEVALE, E.M.; MORRIS, R.P.; NETT, T.M. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. Cochester, v. 35, p. 399 – 403, 1987a.
- SQUIRES, E.L.; SEIDEL JR, G,E, Superovulation in colletion and transfer of equine embryos. **Anim, Reprod. Biotecnol. Lab. Bull.** n.8, p.32-8, 1995.

- SQUIRES, E.L; GARCIA, M.G; GINTHER, O.J; VOSS, J.L; SEIDEL, G.E.JR.
Comparasion of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.26, p.661-670, 1986.
- STABENFELDT, G.H.;HUGHES J.P.; EVANS J.W. Ovarian activity during the estrous cycles of the mare. **Endocrinology**., Baltimore, v. 90, p. 1379 – 1383, 1972.
- SUN, F.Z.; MOOR, R.M. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. **Development**, v. 111, p. 171-180, 1991.
- TAIEB, F.; THIBIER, C.; JESSUS, C. On cycling oocytes and eggs. **Molec. Reprod. Develop**, v. 48, p. 396-411, 1997.
- TISDALL, D.J.; WATANABE, K.; HUDSON, N.L.; SMITH, P.; MCNATTY, K.P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Mol. Endocrinol.* Bristol, v. 15, p. 273 – 281, 1995.
- TONETTA, S.A., DIZEREGA, G.S. Intraogonadal regulation of follicular maturation. **Endoc Ver**, v.10, p.205-229, 1989.
- TOTEY, S.M.; GURPREET, S.; TALWAR, G.P. Superovulatory response in lactating Bos Indicus X Bos Taurus cows primed with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. **Theriogenology**, Los Altos, v.31, p.268, 1989.
- TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M; ARRUDA,R.P.; COSTA NETO,J.B.F. Spontaneous multiple ovulations end pregnancies after embryo transfer in a mare Brasileiro de Hipismo Breed (Equestrian Sports Horse). **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Supl., Porto Alegre, v.25, n.1, p.315, 1997.
- TSAFRIRI, A.; ADASHI, E. The physiology of reproduction. In: **Local nonsteroidal regulators of ovarian function**. New York: Raven Press, cap. 15, p. 817-861, 1994.
- UI, M.; SHIMONAKA, M.; SHIMONAKI, S.; LING, N. Na insulin like growth factor binding protein in ovarian follicular fluid blocks FSH stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 125, p.912, 1989.
- URWIN, V.E.; ALLEN, W.R. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and progesterone concentrations in the blood of Thoroughbred mares exhibiting

- singles and twin ovulations. **Equine Vet. J.** London, v. 15, p. 325 – 329, 1983.
- VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine follicles and their environment in vivo. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 55, p. 1003 – 1011, 1996.
- VANDERWALL, D.K.; Ealy embryonic development and evaluation of equine embryo viability. *Vet. Clin. North Am.*: **Equine Pract.** Philadelphia, v. 12, n.1, p. 61 – 83, 1996.
- VELDHUIS, J.D.; GWYNNE, J.T. Insulin like growth factor type 1 (somatomedin C) stimulates high density lipoprotein (HDL) metabolism and HDL supported progesterone biosynthesis by swine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, v.124, p. 3069, 1989.
- VOGELSANG, M.M., et al. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology** 29, 1007-1018, 1988.
- VOGELSANG, M.M.; KRAEMER, D.C.; POTTER, G.D. et al. Fine structure of the follicular oocyte of the horse. **J. Reprod. Fertil.**, Supl: 35, p. 157-167, 1987.
- WARSAWSKY, L.F.; PARKER, W.G.; FIRST, N.L.; GINTHER, O.J. Gross changes of internal genitalia during the estrous cycle in the mare. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 33, p. 19 – 26, 1972.
- WATSON, E.D.; HINRICHS, K. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mares after administration of hCG. **J. Reprod. Fertil.** London, v. 84; p. 557-561, 1988.
- WILLIS, P.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Fine structure of equine oocytes matured in vitro for 15 hours. **Mol. Reprod. Dev.**, v.37, p. 87-92, 1994.
- WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v. 21, p. 461-469, 1984.
- WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Ovarian response, pregnancy rate, and incidence of multiple fetuses in mares treated with an equine pituitary extract. **J. Reprod. Fertil.**, v. 32, p.167-172, 1982.

- WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Recent studies relating to the collection of multiple embryos in mares. **Theriogenology**, v.19, p.101-108, 1983.
- WOODS, G.L.; SCRABA, S.T. AND GINTHER, O.J. Prospects for induction of multiple ovulation and collection of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.17, p.61-72, 1982.
- WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacologic manipulation of fertility, **Vet. Clin. North Am.**, v.8, n.1, p.57 – 89, 1992.
- XIA, P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. **Hum. Reprod.** 12: 1750-1755, 1997.
- XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 951 – 957, 1995.
- YAMAUCHI, N.; SASADA, H.; SOLOY, E.; DOMINKO, T.; KIKUCHI, K.; NAGAI, T. Effect of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, p. 153-162, 1999.
- YUAN, W.; LUCY, M.C.; SMITH, M.F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biol. Reprod.**, v. 5, p. 1045 – 1054, 1996.
- YUN, Y.W., YU, F.H., YUEN B.H., MOON, Y.S. Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on follicular steroid contents and oocyte maturation in rate. **Molecular Reproduction and Development**, v.23 (3), pg.289-298, 2005.
- ZAMBONI, L.; MASTROIANNI, Jr. L. Electron microscopic studies on rabbit ova II. The penetrated tubal ovum. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 14, p. 118-132, 1996.

Tabela 12: Resposta superovulatória e número de óocitos recuperados de folículos aspirados de éguas tratadas com extrato de pituitária equina.

TRATAMENTO		SUPEROVULADO (ASPIRADO)										
<i>Éguas</i>	16 (19)	29b	46	54	60	100 (233)	112	140	256b	387	Jady	Colina
<i>Dias de tratamento</i>	7	6	7	8	6,5	6,5	7	7	8,5	7	9	6,5
<i>Intervalo da administração do hCG á aspiração (h)</i>	30	32	28	30	29	32	28	30	30	34	32	30
<i>Número de folículos no início do trat.</i>	4	5	3	3	5	6	5	6	4	3	4	3
<i>05-10mm</i>												
<i>11-15mm</i>	4	3	3	4	3	6	6	4	4	5	4	6
<i>16-20mm</i>	3	5	5	5	5	5	6	3	4	2	4	6
<i>21-25mm</i>	1	0	1	2	0	4	5	3	0	2	1	5
<i>Número de OE</i>	1	2	3	5	4	4	7	3	3	1	2	6
<i>OD</i>	3	2	4	4	2	6	8	2	2	2	2	5
<i>Diâmetro do fol. aspirado (mm)</i>	42	2x42	2x40; 39	2X38; 2X40; 41	40; 2X42; 45	3X42; 44	3X38; 40; 3X43	40; 42; 54	2X38; 40	44	40; 44	2X40; 2X41; 43; 45
<i>OD</i>	40; 2x42	40; 42	2x38; 2x40	39; 2X40; 42	2X42	38; 2X42; 3X44;	38; 3X41; 2X42; 2X45	2X44	40; 42	2X40	2X44	3X38; 2X40;
<i>Número de OE</i>	1	2	1	3	2	2	6	2	1	1	1	5
<i>OD</i>	3	1	2	4	1	2	4	2	2	2	2	5
<i>Número de óocitos recuperados</i>	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1	0
<i>OD</i>	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	1	0
<i>Classificação das células da granulosa (liq. Fol.)</i>	C	E	E	E	E	C	38C; 3X41; 2X42; 2X45E	E	C	E	C	E
<i>OD</i>	E	C	E	F39; 2x40-C, 42E	E	C	E	E	C	E	E	2X38C; 1x38E 2X40E
<i>Classificação das células do cumulus e da Corona radiata do óocito</i>	2	3	3	3	3	2	-	-	-	-	3	-
<i>OE</i>	-	3	2	2	3	-	-	-	-	2; 3	2	-
<i>OD</i>												
<i>Classificação morfológica e do grau de maturação nuclear do óocito</i>	MII GI	Não avaliado	MI GI	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	-	-	-	-	Não avaliado	-
<i>OE</i>	-	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	-	-	-	-	MI / MII	Não avaliado	-
<i>OD</i>										MI / MII	Não avaliado	-

1. Células do Cumulus Compacta + Corona Radiata Compacta (Imaturo), 2.Células do Cumulus Expandido + Corona Radiata Compacta (Início da maturação), 3. Células do Cumulus Expandida + Corona Radiata Expandida(maturo), E. Células da Granulosa Expandida, C. Células da Granulosa Compacta.

Tabela 13: Número de oócitos recuperados de folículos aspirados de éguas do grupo controle.

TRATAMENTO		CONTROLE (ASPIRADO)													
		10	29	30	35 ^A	35B	46	54	58	101	212	263	Esmeralda		
<i>Éguas</i>		10	29	30	35 ^A	35B	46	54	58	101	212	263	Esmeralda		
<i>Dias de tratamento</i>		11	10	10	11	12	10	9	9	10	9	11	10		
<i>Intervalo da administração do hCG á aspiração (h)</i>		30	30	30	30	28	32	30	31	30	28	32	30		
<i>Número, de folículos no início do trat.</i>	05-10mm	3	5	2	5	5	3	5	6	8	6	4	9		
	11-15mm	4	4	5	5	4	5	3	6	7	4	4	5		
	16-20mm	4	3	3	5	4	2	6	5	6	5	5	4		
	21-25mm	0	1	3	0	2	2	2	3	1	1	3	1	0	
<i>Número de fol. ≥35mm</i>	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0		
<i>Diâmetro do fol. aspirado</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
<i>Diâmetro do fol. aspirado (mm)</i>	-	-	42	40	-	39	39	38	39	-	-	41	-		
<i>Número de oócitos recuperados</i>	39	41	-	-	42	-	-	-	-	43	45	-	40		
<i>Número de Fol. aspirados</i>	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	-		
<i>Número de oócitos recuperados</i>	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1		
<i>Classificação das células da granulosa (liq. Fol.)</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
<i>Classificação das células do cumulus e da Corona radiata do oócito</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
<i>Classificação das células da granulosa (liq. Fol.)</i>	-	-	E	E	-	-	-	C	C	-	-	E	C		
<i>Classificação das células do cumulus e da Corona radiata do oócito</i>	C	E	E	-	E	E	E	-	-	E	E	-	-		
<i>Classificação morfológica e do grau de maturação nuclear do oócito</i>	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-		
<i>Classificação morfológica e do grau de maturação nuclear do oócito</i>	-	3	-	-	3	-	-	-	-	2	3	-	2		
<i>Classificação morfológica e do grau de maturação nuclear do oócito</i>	-	-	Não avaliado	MI GI	-	-	-	-	-	-	-	Não avaliado	-		
<i>Classificação morfológica e do grau de maturação nuclear do oócito</i>	-	MI GII	-	-	MI GI	-	-	-	-	Não avaliado	MI GI	-	Não avaliado		

2. Células do Cumulus Compacta + Corona Radiata Compacta (Imaturo), 2.Células do Cumulus Expandido + Corona Radiata Compacta(Início da maturação),
 3. Células do Cumulus Expandida + Corona Radiata Expandida(maturo), E. Células da Granulosa Expandida, C. Células da Granulosa Compacta.

Tabela 14: Resposta superovulatória e número de óocitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina.

TRATAMENTO		SUPEROVULAÇÃO (ÓOCITOS RECUPERADOS DO OVIDUTO)															
ÉGUAS	08	11	12	13	15	05	311	307	309	312	314	318	319				
Dias de tratamento	9	5	5	10	8	6	7,5	9	7	9,5	6,5	9,5	6				
Intervalo do início do tratamento á I ovulacao (dias)	9	7	5,5	10,5	8,5	8	9	10,5	9	10,5	7	11	8				
Intervalo da administração do hCG á I ovulacao (h)	36	48	n.hCG	n.hCG	n.hCG	24	24	Nao hCG	36	36	-12	24	36				
Intervalo da I ovulacao a ultima (h)	12	0	0	0	0	12	12	0	0	0	24	12	12				
Intervalo da I ovulacao ao sacrificio(h)	18	8	10	12	12	17	18	8	6	10	24	12	10				
Número de foliculos no início do trat.	05-10mm	1	2	2	6	5	2	8	5	6	9	6	6				
	11-15mm	5	0	4	0	5	2	3	4	4	7	2	2				
	16-20mm	1	1	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0				
	21-25mm	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0				
Número de fol. ≥35mm	OE	2	1	0	0	3	2	2	5	4	2	4	7				
	OD	4	0	0	0	4	2	2	4	2	5	4	4				
Diámetro do fol. Ovulado (mm)	OE	2F35	40	28	33	-	35,35	36,36	35;2x36; 2x37	39,38, 35	35,32	3 x 40	3x45,3 x42,35				
	OD	3F33,3 6	-	25	33	2F40, 2F42	37	35,35	2x35; 2x38	35	35, 37	2x42, 40,38	0,42				
Número de ovulacoes	OE	2	0	1	1	0	2	2	4	3	2	4	7				
	OD	4	1	1	1	2	1	2	5	1	2	4	4				
Número de óocitos viáveis recuperados do ovid.	Oviduto esquerdo	2	0	1	1	0	2	2	2	3	2	1	7				
	Oviduto Direito	2	1	1	1	1	1	0	2	1	0	4	2				
Número de óocitos degenerados recuperados do ovid.	Oviduto esquerdo	-	-	-	-	-	0	0	2	1	0	0	3				
	Oviduto Direito	-	1	-	2	-	0	0	2	0	0	0	0				
Número de foliculos nao ovulados ≥30mm	OE	-	1	-	-	3	0	0	1	1	0	0	0				
	OD	-	-	-	-	1	0	0	0	0	3 (1 fol. Normal, 2 fol. Hemor.)	0	0				
Número de óocitos recuperados de foliculos nao ovulados. ≥30mm	-	1	-	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0				

I. Células do Cumulus Compacta + Corona Radiata Compacta (Imaturo), 2. Células do Cumulus Expandido + Corona Radiata Compacta (Início da maturação)

Células do Cumulus Expandida + Corona Radiata Expandida (maturo), E. Células da Granulosa Expandida, C. Células da Granulosa Compacta.

Tabela 15: Número de oócitos recuperados do oviduto de éguas tratadas com solução fisiológica (controle)

TRATAMENTO		CONTROLE (OÓCITOS RECUPERADOS DO OVIDUTO)										
ÉGUAS		01	02	03	07	10	14	313	315	320		
Dias de tratamento		15	11	5	14	8	4	11	10	11		
Intervalo do início do tratamento á I ovulacao (dias)		17	12,5	7	15	9	6	13	11,5	13		
Intervalo da administracao do hCG á I ovulacao (h)		38	36	36	n.hCG	n.hCG	48	48	36	48		
Intervalo da I ovulacao a ultima (h)		0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Intervalo da I ovulacao ao sacrificio(h)		6	7	8	12	12	8	6	6	7		
Número, de folículos no início do trat.	05-10mm	4	6	6	3	6	3	4	2	3		
	11-15mm	1	2	0	1	0	0	1	2	2		
	16-20mm	1	1	0	0	0	0	0	2	0		
	21-25mm	0	0	1	1	0	1	1	0	1		
Número de fol. ≥35mm	2	0	1	1	1	1	0	1	0	0		
Diâmetro do fol. Ovulado (mm)	OD	0	1	0	0	0	1	0	2	1		
	OE	37; 38	-	41	50	42	-	42	-	-		
Número de ovulacoes	OE	-	42	-	-	-	40	-	38; 42	44		
	OD	2	0	1	1	1	0	1	1	0		
Número de oócitos viáveis recuperados do ovid.	Oviduto esquerdo	0	1	0	0	0	1	0	1	1		
	Oviduto Direito	2	0	0	1	1	0	1	1	0		
Número de oócitos degenerados recuperados do ovid.	Oviduto esquerdo	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	Oviduto Direito	0	0	0	1	0	0	0	0	1		
Número de folículos nao ovulados ≥30mm	OE	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Número de oócitos recuperados de folículos nao ovulados. ≥30mm		0	0	0	0	0	0	0	0	0		

1. Células do Cumulus Compacta + Corona Radiata Compacta (Imaturo), 2. Células do Cumulus Expandido + Corona Radiata Compacta (Início da maturação)

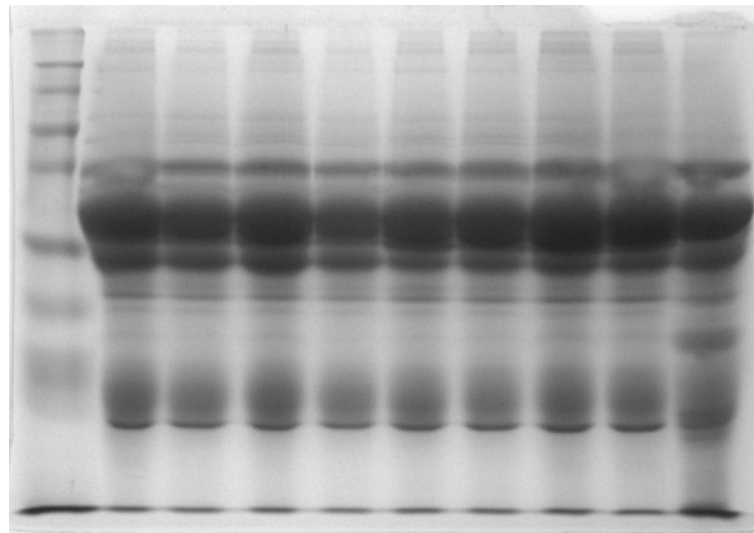
3. Células do Cumulus Expandida + Corona Radiata Expandida(maturo), E. Células da Granulosa Expandida, C. Células da Granulosa Compacta.

Tabela 16: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas encontradas nos diferentes folículos das águas do Grupo Superovulado.

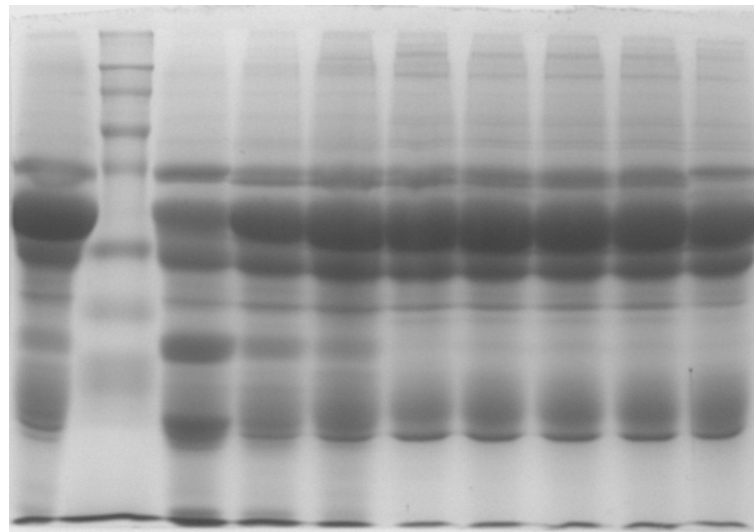
ÉGUA	BANDAS (KDa)																															
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30		
FOL	352,8	327,8	294,7	255,0	232,6	159,3	129,2	117,0	102,1	100,4	93,2	74,2	69,5	69,0	55,1	56,0	47,0	40,3	38,0	34,7	32,9	31,2	28,1	26,7	24,1	22,3	20,2	17,6	15,7	14,9		
16	1	—	20,4	23,3	—	37,7	44,9	45,2	45,0	36,2	—	90,6	82,9	88,4	—	606,1	—	330,6	78,9	83,9	62,4	59,7	—	309,2	65,7	—	—	—	—	68,5		
16	2	—	13,9	19,0	—	27,0	—	48,3	32,3	33,8	—	92,9	61,8	86,8	—	567,2	—	286,6	81,4	54,1	66,7	52,6	—	217,1	65,6	—	—	—	—	55,6		
16	3	—	20,3	15,9	—	25,8	—	60,0	30,4	44,3	—	98,6	63,6	77,7	—	660,7	—	288,0	68,7	79,0	49,1	65,8	—	304,3	87,6	—	—	—	—	68,1		
16	4	—	13,4	12,2	—	15,8	—	37,6	51,3	24,8	—	94,9	44,2	56,7	—	555,9	—	263,6	49,5	87,6	61,4	52,6	—	270,7	68,1	—	—	—	—	57,9		
60	1	—	19,0	18,4	—	26,1	33,5	58,8	60,5	39,5	—	70,9	109,0	—	756,5	—	192,6	65,6	67,2	65,0	82,4	—	318,7	101,9	—	—	—	—	—	66,4		
256 B	1	—	20,3	24,0	—	35,3	—	60,0	49,7	38,4	—	105,8	106,8	—	785,1	—	246,9	66,2	101,4	67,3	59,5	—	311,0	111,4	—	—	—	—	—	74,0		
256 B	2	—	30,4	35,0	—	39,5	—	77,7	82,6	56,6	—	94,4	150,0	—	912,4	—	250,2	101,0	70,2	67,9	91,9	—	324,6	116,0	—	—	—	—	—	84,1		
256 B	3	—	27,6	33,0	—	49,8	—	76,3	59,8	62,5	—	114,5	121,9	—	876,8	—	247,6	66,0	101,6	74,1	142,7	—	382,2	109,6	—	—	—	—	—	85,3		
46A	1	—	—	—	—	—	—	70,6	61,5	51,3	—	101,3	137,2	—	632,6	—	334,8	147,0	99,9	89,2	247,2	—	—	419,3	98,4	106,0	—	—	—	178,1		
46A	2	—	—	—	—	52,6	39,9	48,8	—	40,6	—	38,1	138,6	83,2	—	706,8	—	319,3	63,0	112,7	56,8	166,7	71,6	69,7	130,8	62,3	62,5	38,0	37,5	30,6	80,3	
46A	3	—	—	—	—	47,3	43,2	41,1	—	31,8	—	38,2	174,3	26,7	—	428,4	—	300,6	95,3	110,2	65,2	340,5	101,4	142,0	294,3	70,8	64,0	—	58,9	61,6	120,1	
JADE	1	—	—	—	—	31,3	25,0	46,5	36,8	—	43,4	—	60,9	114,8	31,6	—	658,9	—	338,8	88,4	122,5	67,6	170,1	0,0	104,1	178,4	104,4	75,0	—	58,1	44,0	90,9
JADE	2	—	—	—	—	73,3	51,3	78,8	—	95,6	—	72,4	117,5	125,0	—	783,0	—	413,5	171,2	98,9	198,3	133,1	150,7	234,1	117,3	37,6	62,2	63,3	56,1	62,7	—	
JADE	3	35,4	36,2	—	—	68,9	63,7	65,0	47,3	65,9	—	71,1	105,7	147,3	—	838,1	—	340,5	106,3	81,5	118,6	108,8	112,3	134,3	170,9	151,5	—	—	—	—	55,9	
387	1	—	41,1	—	—	58,1	43,7	60,6	37,6	92,6	—	38,9	192,2	97,8	—	669,9	231,6	289,5	110,7	65,5	102,2	161,5	—	—	467,1	162,6	—	—	—	—	65,0	
387	2	23,6	36,0	35,8	—	50,7	53,6	77,9	47,6	84,9	—	42,6	156,6	105,2	—	869,8	—	342,5	80,5	103,7	96,1	120,4	—	—	465,7	149,0	—	—	—	—	66,0	
387	3	27,7	31,6	—	—	62,6	45,0	39,6	50,2	46,7	—	45,8	171,9	91,7	—	836,0	—	341,2	90,2	112,0	95,9	115,5	—	—	494,1	151,0	—	—	—	—	76,1	
140	1	—	25,9	34,1	—	46,8	67,3	47,8	48,2	72,9	—	53,1	150,3	47,7	107,9	682,4	—	314,6	100,9	76,9	104,2	117,3	75,6	107,1	346,5	122,8	—	—	—	—	69,1	
140	2	11,3	—	20,0	—	54,8	42,8	54,5	—	45,1	—	28,1	130,8	79,8	—	499,9	—	211,0	63,8	43,1	45,7	44,1	—	—	332,2	105,8	—	—	—	—	39,5	
140	3	18,0	—	27,3	—	58,6	53,3	74,6	—	46,4	—	52,7	91,1	134,3	—	627,6	—	261,7	62,7	63,1	60,2	68,6	—	—	438,2	125,3	—	—	—	—	80,9	
140	4	23,2	—	30,1	—	66,9	63,3	69,8	—	77,5	—	58,3	221,2	70,0	—	738,1	—	231,1	68,0	79,5	56,0	63,6	—	—	455,1	93,0	—	—	—	—	63,5	
112	1	17,9	—	27,0	—	36,4	39,6	75,3	—	49,2	29,0	27,7	173,8	—	—	666,4	—	198,0	60,3	66,0	39,9	59,0	—	—	368,9	119,1	—	—	—	—	48,0	
112	2	28,3	—	36,7	—	65,3	58,5	88,9	—	51,3	40,3	39,1	217,3	—	—	780,8	—	225,4	71,8	84,4	60,7	75,1	—	—	440,3	121,8	—	—	—	—	56,4	
112	3	24,5	—	24,5	—	59,2	48,0	87,6	—	29,5	42,6	30,4	193,3	—	—	705,0	—	221,2	73,1	77,5	59,7	86,8	—	—	392,3	105,0	—	—	—	—	52,2	
112	4	21,8	—	35,8	—	72,3	65,1	79,7	—	24,1	39,6	33,2	251,3	119,2	—	581,6	—	238,1	63,4	88,6	66,9	67,0	—	—	381,3	89,8	—	—	—	—	67,7	
54	1	30,2	—	30,6	—	80,3	72,5	99,8	—	47,1	29,4	63,5	168,1	170,3	—	613,3	—	216,6	56,7	86,0	76,6	93,5	—	—	373,9	122,3	—	—	—	—	77,9	
54	2	29,1	—	38,2	—	73,3	59,8	77,5	—	54,2	51,8	51,2	198,3	153,6	—	556,4	—	233,0	62,5	73,3	73,5	94,5	—	—	388,6	88,5	—	—	—	—	76,8	
54	3	—	—	25,4	—	60,9	59,1	27,5	36,7	81,8	—	38,7	182,6	146,5	—	571,6	—	209,5	58,8	74,0	49,4	56,7	75,7	84,9	236,2	85,3	47,1	21,8	7,4	—	54,0	
54	4	—	—	25,5	—	69,4	43,5	39,4	27,8	51,3	—	33,6	183,8	132,8	—	580,1	—	220,1	62,7	74,3	46,9	66,1	52,1	96,4	292,1	77,4	43,1	30,0	25,0	—	49,3	
COLINA	1	—	—	—	—	38,1	35,9	46,1	63,1	52,6	42,0	61,5	288,5	—	—	1088,3	—	313,2	30,7	57,8	63,8	70,9	97,3	231,5	—	136,0	—	—	—	—	44,0	
COLINA	2	—	—	—	—	66,8	38,4	58,8	60,2	95,5	65,4	78,0	—	—	—	1357,4	—	394,7	60,5	91,4	83,1	86,9	154,1	350,1	—	138,5	—	—	—	—	54,5	
COLINA	3	—	—	—	—	68,6	47,1	54,8	86,6	91,7	110,8	49,7	—	—	—	1394,4	—	389,8	59,0	100,9	87,1	77,1	162,4	375,4	—	161,3	—	—	—	—	61,5	
COLINA	4	—	—	—	—	47,0	32,5	64,3	61,7	56,0	68,6	49,9	—	—	—	1095,9	—	320,9	64,5	75,3	78,9	91,0	162,5	262,2	—	136,2	—	—	—	—	52,7	
100	1	—	—	—	—	34,6	—	87,4	53,4	—	82,8	54,4	—	—	—	948,4	—	337,4	58,9	55,8	60,0	36,1	58,3	432,3	—	141,6	—	—	—	—	38,2	
100	2	—	—	—	—	31,1	—	42,6	42,4	—	87,1	62,2	—	—	—	945,9	—	248,8	49,3	58,1	34,6	28,5	48,9	340,8	—	97,3	—	—	—	—	34,2	
29B	1	—	—	—	—	46,5	—	56,2	56,0	—	100,5	100,5	—	—	—	1048,7	—	313,0	57,7	75,0	40,3	40,1	71,8	383,5	—	133,2	—	—	—	—	32,7	
29B	2	—	—	—	—	45,5	—	48,7	46,0	—	116,3	52,9	—	—	—	989,1	—	305,8	60,1	73,4	50,9	24,0	64,1	386,2	—	166,9	—	—	—	—	31,5	
29B	3	—	—	—	—	52,4	—	51,2	41,9	—	96,1	30,0	—	—	—	936,3	—	370,7	60,6	75,5	39,7	35,4	57,8	384,1	—	138,3	—	—	—	—	39,4	

Tabela 17: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas encontradas no folículo das águas do Grupo Controle.

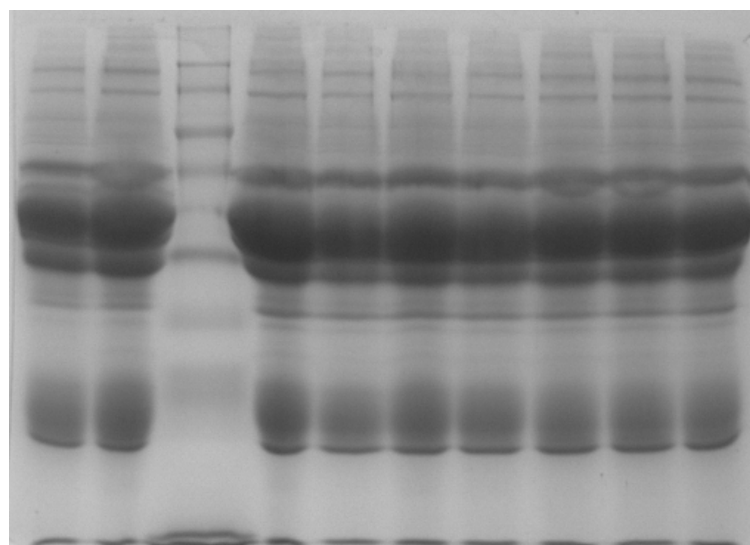
ÉGUA	FOL	BANDAS (KDa)																													
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
46B	1	—	—	25,5	—	43,0	35,1	27,9	32,2	60,2	—	23,3	150,9	136,8	—	501,1	—	199,2	52,3	63,2	50,9	46,0	38,5	88,4	255,6	58,1	37,3	25,2	26,5	—	64,4
263	1	—	—	34,9	—	71,4	53,5	44,8	39,4	65,0	—	33,0	167,5	107,1	—	620,0	—	211,5	66,4	66,7	56,8	64,0	59,2	146,7	252,0	80,8	41,3	31,9	32,1	—	55,5
212	1	—	—	25,3	—	55,6	41,7	30,7	34,0	64,8	—	30,0	157,0	117,6	—	515,7	—	200,3	56,0	61,8	52,4	55,9	—	174,3	230,4	87,8	56,7	—	—	—	44,3
ESMERALDA	1	—	—	36,8	—	62,6	57,8	50,7	44,1	64,2	—	68,1	209,9	128,4	—	606,1	—	220,0	64,5	81,2	59,0	71,0	78,9	104,6	275,0	101,0	56,1	38,0	41,7	—	58,8
29	1	—	—	46,2	—	76,3	61,9	53,4	47,9	97,6	—	40,0	216,2	172,0	—	587,6	—	184,2	73,6	67,5	50,6	84,7	76,8	107,8	284,6	104,0	70,2	45,6	46,3	—	62,4
35A	1	—	—	63,4	—	82,9	65,0	45,6	50,2	59,5	—	65,5	227,4	116,6	—	675,0	—	230,3	75,2	75,4	63,0	82,5	75,6	134,5	277,4	115,5	73,8	54,1	56,8	—	64,2
30	1	—	—	51,9	—	95,4	66,5	54,3	44,8	100,0	—	46,0	241,1	164,3	—	634,9	—	229,8	60,4	85,2	55,5	76,4	123,8	148,1	238,9	119,3	77,2	62,2	65,8	—	61,7
10	1	—	—	59,4	38,1	61,3	86,5	66,9	47,5	51,2	—	45,0	319,5	—	—	1222,4	—	330,2	64,1	106,3	77,1	97,1	121,9	274,5	—	157,8	—	71,6	36,8	—	57,5
58	1	—	—	27,0	21,7	45,5	49,6	52,5	31,5	91,4	—	39,6	251,7	—	—	1089,4	—	280,3	56,7	68,9	50,9	58,0	87,0	234,2	—	103,2	—	33,8	15,7	—	42,7
54	1	—	—	41,5	34,9	58,8	56,8	54,6	40,2	69,8	—	27,5	280,9	—	—	1103,5	—	306,3	71,5	49,1	53,4	66,8	97,6	237,5	—	106,1	—	25,7	18,5	—	35,9
35B	1	—	—	29,0	31,4	36,0	43,6	47,9	51,6	71,6	—	29,2	213,1	—	—	1018,8	—	291,3	62,6	60,2	47,8	60,9	124,1	259,7	—	91,3	—	24,3	15,2	—	35,5
101	1	—	—	35,5	21,3	47,1	46,2	47,5	37,2	65,1	—	37,1	236,9	—	—	1044,6	—	315,0	59,3	60,6	53,0	68,5	108,4	249,7	—	96,2	—	34,2	23,6	—	35,6



P 1 2 3 4 5 6 7 8 9



10 P 11 12 13 14 15 16 17 18



19 20 P 21 22 23 24 25 26 27

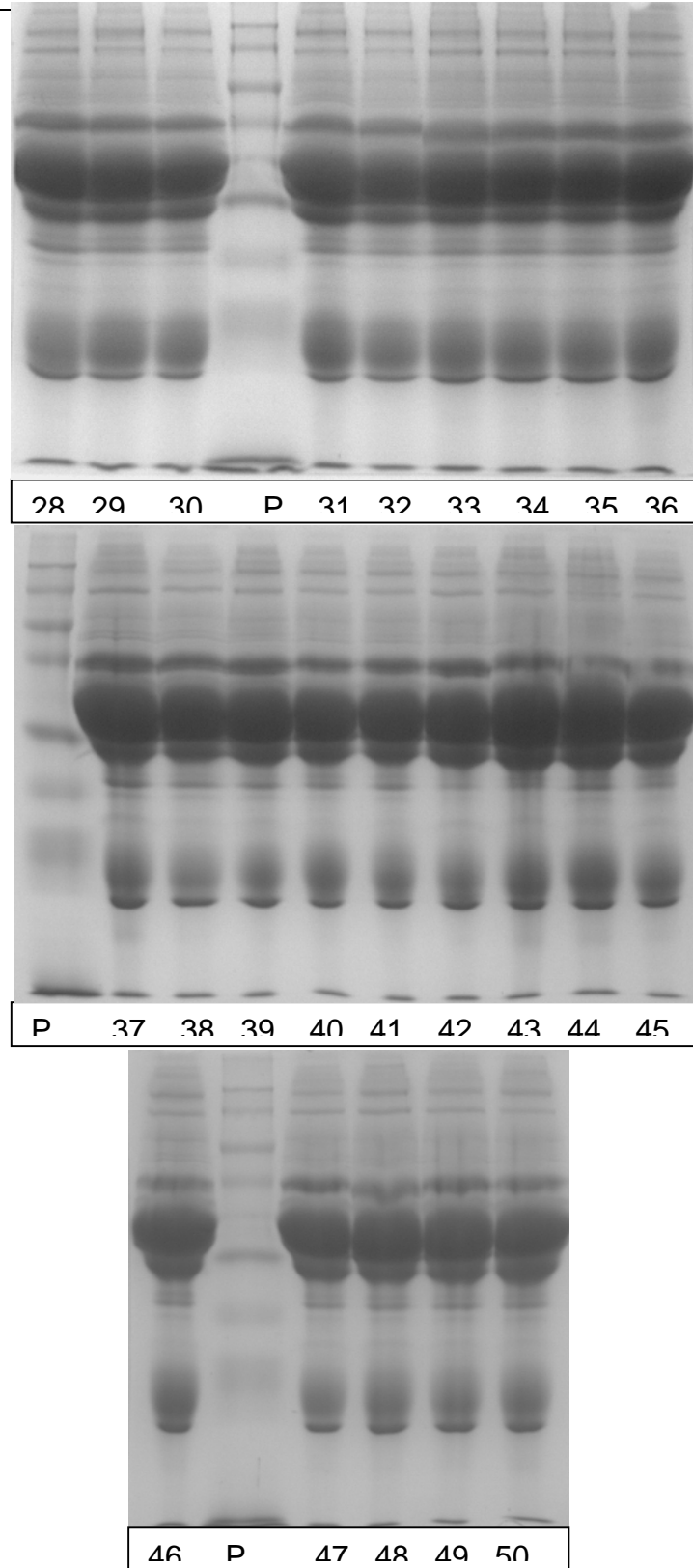


Figura 33: Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 13% de concentração no gel separador, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do líquido folicular de éguas superovulada e controle. Canaleta P, Marcador de Peso Molecular (Full molecular weight range, 10 a 250 kDa, Amersham Biosciences).