Karen Regina Peres

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.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal

Orientadora: Profª Adj. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Co-orientador: Profº Adj. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu – SP
2004



Dedicatória

Com certeza eu tenho muito a agradecer a inúmeras pessoas, que colaboraram com a minha formação profissional, porém, eu dedico este momento àquelas que não apenas estiveram presentes durante este período, mas que estiveram comigo durante toda a minha vida

Ó Deus-Pai, que dais existência a minha vida, obrigada pelas oportunidades, pelas conquistas e também pelas derrotas, que me fizeram exteriorizar uma capacidade que eu não julgava possuir.

Meus amados pais, Antonio e Geni, dedico-lhes este trabalho porque a vocês eu devo toda a minha integridade como ser humano. Sei que vocês têm por filosofia que a melhor coisa que os pais podem deixar para os filhos é o estudo, mas vocês me deixaram muito mais; me ensinaram a ser honesta, a lutar e a jamais permitir que alguma pressão ou dificuldade fira a nobreza de meu caráter.

Minha irmã Kelly, você que também é uma lutadora neste mundo cheio de tropeços, a você eu dedico meu esforço.

Meu namorado Adriano, você em pouco tempo já me ensinou muita coisa, com certeza você me faz enxergar melhor a vida e me ajuda a ser uma pessoa melhor.

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



Agradecimentos

Agradeço à Professora Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga e ao Professor Marco Antonio Alvarenga pela amizade, paciência, incentivo e pelos conhecimentos transmitidos durante os últimos dois anos, que me proporcionaram a conquista do título de mestre.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP- Campus de Botucatu, que me acolheu nos últimos oito anos, e a todos os seus docentes pela minha formação profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

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

Aos amigos e colegas Cláudia, Elen, Carla, Patrícia, Bia, Karen, Milena, Letícia, Gustavo (Bigu).

Ao professor Frederico Ozanam Papa pela colaboração.

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

À professora Sheila Zambello de Pinho pela colaboração na realização das análises estatísticas.

Aos professores Sony Dimas Bicudo e Cezinande de Meira pela confiança, oportunidade e conhecimentos adquiridos durante o estágio de docência.

Ao professor José Nicolau Puolli Filho pelo apoio.

Ao funcionário do Setor de Eqüideocultura, Benedito Fogaça (Dito), pela fundamental ajuda e companheirismo.

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

À Denise e Maria da pós-graduação, pela assistência e simpatia.

"Só quem arrisca a ir o mais longe possível poderá descobrir até onde é capaz de ir".

T. S. Eliot



Resumo

PERES, K.R. Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera. Botucatu, 2004. Dissertação (Mestrado) – Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

Foi avaliado o uso do FSH eqüino (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 25 mm e nenhum corpo lúteo presente). Após este período, conforme as éguas apresentam pelo menos um folículo maior ou igual a 25 mm, elas foram distribuídas alternadamente em um dos dois grupos: 1) grupo controle – não tratado; 2) grupo tratado com 12,5 mg de eFSH, duas vezes ao dia, até que a maioria dos folículos maiores que 30 mm alcançassem 35 mm. A atividade folicular de todas as éguas foi acompanhada. Quando a maior parte dos folículos das éguas tratadas e o folículo das éguas do grupo controle adquiriram um tamanho pré-ovulatório (≥ 35 mm), foram administradas 2.500 UI 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. O período médio de tratamento foi de 4,79 ± 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.

Palavras-chave: Sazonalidade Reprodutiva; Égua; FSH eqüino; Superovulação; Embrião.



Abstract

PERES, K.R. Evaluation of equine follicle stimulating hormone (eFSH) aiming to hasten the reproductive season and superovular mares in the spring transitional phase. Botucatu, 2004. Dissertation (Mastership) – Animal Reproduction – College of Veterinary and Zootecnia - University of São Paulo State "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

Equine FSH (eFSH) was evaluate for inducing follicular development and ovulation in transitional mares. Twenty-eight mares, from three to fifteen years of age, were examined during the months of August and September 2003 with ultrasound for two weeks prior to the start of the experiment to determine transitional characteristics (no larger follicles 25 mm and no corpora lutea present). After this period, as mare obtained a follicle larger or equal to 25 mm, they were assigned to one of two groups: 1) control group – untreated; 2) treated group with 12.5 mg eFSH, two times per day, until at least half of all follicles larger than 30 mm had reached 35 mm. The follicular activity of all mares were accompanied. When most of the follicles of the treated mares and a single follicle of control mares acquired a preovulatory size (≥ 35 mm), 2.500 IU hCG were administered, intravenously to induce ovulation. From this moment, the mares were inseminated with fresh semen, every other day, until ovulation. Ultrasound exams continued until ovulation detection and the embryo recovery was performed seven to eight days after ovulation. The mares of treated group reached the first preovulatory follicle and ovulated before untreated mares (6.57 vs 18 days). However, they took more time to the second ovulation (22.36 vs 10.92) after the embryo recovery and luteolitic administration. The mean period of treatment were 4.79 ± 1.07 days and 85.71% of mares had multiple ovulations. The number of ovulation (5.57 vs 1.0) and embryos (2.0 vs 0.69) per mare were higher for treated mares than control mares. However, the number of embryos per ovulation was similar in both groups (0.44 vs 0.69). The pattern of follicular growth were also different between groups. Eighty-nine percent the embryos from the superovulated mares, were viable after a initial analysis, considering that three embryos full degenerate were recovery. The mares with multiple ovulations in the treated group had a expressive rise of progesterone, in comparison with single ovulation mares. In conclusion, the treatment with eFSH was effective to hasten the onset of the breeding season and promote multiple ovulations resulting in the recovery of viable embryos.

***Key-words*:** Seasonal reproductive; Mare; Equine FSH; Superovulation; Embryo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Intervalo em dias (média ± desvio padrão) entre o 1º folículo ≥ 25 mm até o desenvolvimento do 1º folículo ≥ 35 mm e até a ocorrência da 1ª ovulação, e, intervalo (média ± desvio padrão) entre a coleta de embrião e administração de $PGF_2\alpha$ e a 2ª ovulação, para as éguas submetidas ou não ao tratamento com eFSH. 66

Figura 2 - Imagem ultra - sonográfica dos ovários esquerdo e direito de uma égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (4º dia de tratamento). 68

Figura 3 - Imagem ultra - sonográfica dos ovários esquerdo e direito de uma égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (6º dia de tratamento). 68

Figura 4 – Número médio de embriões e de estruturas (embriões + oócitos) recuperadas, por égua e por ovulação, para animais submetidos ou não ao tratamento com eFSH..... 69

Figura 5 - Relação da recuperação embrionária e de estruturas, por égua e por ovulação: dados referentes aos animais que responderam ao protocolo superestimulatório com eFSH. 71

Figura 6- Taxa de crescimento folicular médio (mm/dia) observada nos animais do grupo controle e tratamento. 75

Figura 7 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação no grupo controle (os números da legenda identificam o número das éguas)..... 75

Figura 8 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 18). 76

Figura 9 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 27). 76

Figura 10 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 31). 77

Figura 11 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 33). 77

Figura 12 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 36). 78

Figura 13 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 39). 78

Figura 14 - Crescimento folicular médio observado no grupo controle não-tratado e no grupo tratado com eFSH. 79

Figura 15 – Taxa de recuperação embrionária (D7), de acordo com o grau de desenvolvimento dos embriões, em éguas do grupo controle e do grupo tratado com eFSH. 80

Figura 16 – Blastocisto (BlG1) oriundo de ovulação única - grupo controle (égua 898). 81

Figura 17 – Blastocisto expandido (BxG1) oriundo de ovulaçao única – grupo controle (égua 38). 81

Figura 18- Embriões oriundos de égua submetida ao tratamento superovulatório com eFSH (égua 163)..... 82

Figura 19 - Embriões e oócito oriundos de uma égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (égua 18)..... 82

Figura 20 - Blastocisto corado com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo - grupo controle.... 84

Figura 21 - Blastocisto expandido corado com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo – grupo controle..... 84

Figura 22 - Blastocisto (BlG2) corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo, proveniente de tratamento superovulatório com eFSH (égua18)..... 85

Figura 23 - Blastocisto (BlG1) obtido por tratamento superovulatório com eFSH e corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo (égua 39). 85

Figura 24 - Blastocisto expandido (BxG1) corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo oriundo de processo superovulatório com eFSH (égua 39). 86

Figura 25 - Blastocisto expandido (BxG1) corado com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo proveniente de tratamento superovulatório com eFSH (égua 33)..... 86

Figura 26 - Embrião degenerado corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo proveniente de tratamento superovulatório com eFSH (égua 36)..... 87

Figura 27 - Correlação entre o número de ovulações e a concentração sérica de progesterona (D7-8) em éguas não-tratadas (controle) e tratadas com eFSH no período de transição de primavera..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalo em dias (média ± desvio padrão) entre o 1º folículo ≥ 25 mm até o desenvolvimento do 1º folículo ≥ 35 mm e até a ocorrência da 1ª ovulação, e, intervalo (média ± desvio padrão) entre a coleta de embrião e administração de $PGF_2\alpha$ e a 2ª ovulação, para as éguas submetidas ou não ao tratamento com eFSH. 65

Tabela 2 - Período de tratamento (dias), resposta ovulatória (número de ovulações/égua e porcentagem de éguas com múltiplas ovulações) e recuperação de embriões e/ou oócitos, em éguas submetidas ao tratamento com eFSH, em comparação ao grupo controle não-tratado, durante a fase de transição de primavera. 67

Tabela 3 - Período de tratamento (dias) e taxa de recuperação embrionária e de estruturas (embrião + oócito) de animais que responderam ou não ao tratamento superestimulatório com eFSH (média ± desvio padrão). 70

Tabela 4 - Resposta superovulatória (período de tratamento, número médio e total de ovulações) e recuperação de embriões e estruturas (embriões + oócitos) obtida de éguas tratadas com eFSH, durante o período de transição de primavera, que responderam de maneira moderada ou intensa. 71

Tabela 5 - Correlação entre o número de folículos de 10-14,9; 15-19,9; 20-24,9 e 25-29,9 mm no início do tratamento com eFSH e o número de ovulações. 72

Tabela 6 - Diâmetro médio (μm) de embriões coletados no D7, conforme o seu estágio de desenvolvimento. 80

Tabela 7 - Efeito do número de ovulações sobre a concentração sérica de progesterona determinada no dia (D7-8) da recuperação embrionária em éguas não-tratadas (controle) e tratadas com eFSH no período de transição de primavera. 88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Observação da ocorrência de ovulação, nos animais tratados com eFSH, relacionado com o diâmetro folicular observado no dia da aplicação do hCG. 72

Quadro 2 - Crescimento folicular médio (mm/dia) observado nos animais do grupo controle e tratamento. 74

Quadro 3 - Distribuição dos embriões coletados do grupo controle e tratamento conforme o seu grau de qualidade. 83

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF = Fator Básico de Crescimento Fibroblástico

Bi = Blastocisto inicial

Bl = Blastocisto

BMP-15 = "bone morphogenetic protein – 15"

BMP-6 = "bone morphogenetic protein – 6"

Bx = Blastocisto expandido

cdk1 = Kinase 1 ciclina dependente

COC = Complexo Cumulus Ooforus

DNA = Ácido Desoxiribonucleico

DPBS = Solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco

E.P.E. = Extrato de Pituitária Eqüino

eCG = Gonadotrofina Coriônica Eqüina

eFSH = Hormônio Folículo Estimulante Eqüino

EGF = Fator de Crescimento Epidermal

et al. = colaboradores

feFSH = Fração enriquecida do Hormônio Folículo Estimulante

FGF = Fator de Crescimento Fibroblástico

FHRU = Fevold-Hisaw rat-units

FIV = Fertilização *in vitro*

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

FSH-P = Hormônio Folículo Estimulante de origem porcina (suína)

GDF-9 = Fator de Crescimento e Diferenciação - tipo 9

GH = Hormônio do Crescimento ou Somatotrofina

GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

hCG = Gonadotrofina Coriônica Humana

hMG = Gonadotrofina da Menopausa humana

ICSI = Injeção espermática intra-citoplasmática

IGF = Fator de Crescimento semelhante à insulina

IGFBP = Proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina

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

IP = Iodeto de Propídeo

kg = kilograma (10^3)

KL = ligante kit

LH = Hormônio Luteinizante

LIF = fator inibidor de leucemia

MHz = megahertz (10^6)

MIV = Maturação *in vitro*

mm = milímetros

Mo = Mórula

mOsm = miliosmóis

NGF = fator de crescimento neural

PGE_2 = Prostaglandina E_2

$PGF_{2\alpha}$ = Prostaglandina $F_{2\alpha}$

PMSG = Gonadotrofina Sérica da Égua Prenhe

TGF-β = Fator Transformador de Crescimento tipo β

TRH = Hormônio Liberador de Tireotrofina

TSH = Hormônio Estimulante da Tireóide

UI = Unidades Internacionais

VEGF = Fator de Crescimento Endotelial Vascular

mg = miligramas (10^{-3})

ml = mililitro (10^{-3})

μg = microgramas (10^{-6})

μm = micrometros (10^{-6})

ng = nanograma (10^{-9})

pg = picogramas (10^{-12})

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

α - alfa

β - beta

$\geq$ - maior ou igual

$\pm$ - mais ou menos

® - marca registrada

< - menor

> - maior

^{o}C - graus Celsius

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES 8

LISTA DE TABELAS 10

LISTA DE QUADROS 11

LISTA DE ABREVIATURAS 12

LISTA DE SÍMBOLOS 15

INTRODUÇÃO 18

REVISÃO DE LITERATURA 21

1. SAZONALIDADE REPRODUTIVA 22

2. DINÂMICA FOLICULAR DURANTE AS DIFERENTES FASES DE ATIVIDADE REPRODUTIVA 24

2.1. Fase Ovulatória 24

2.2. Fase Anovulatória 29

3. MÉTODOS DE ANTECIPAÇÃO DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA 33

3.1. Fotoperíodo artificial 33

3.2. Progestágenos 34

3.3. Antagonistas da Dopamina 35

3.4. Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) 36

3.5. Extrato de Pituitária Eqüina (E.P.E.) 38

3.6. Hormônio Folículo Estimulante Eqüino (eFSH) 38

3.7. Outros tratamentos 39

4. SUPEROVULAÇÃO NA ESPÉCIE EQÜINA 39

4.1. Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG) 40

4.2. Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) 40

4.3. Imunização contra a Inibina 42

4.4. Hormônio Folículo Estimulante Suíno (FSHp) 43

4.5. Extrato de Pituitária Eqüina (E.P.E.) 44

4.6. Hormônio Folículo Estimulante - eqüino (eFSH) 52

OBJETIVOS 55

MATERIAL E MÉTODO 57

1. ANIMAIS 58
   1.1. Seleção e Manejo das Éguas 58
   1.2. Garanhão 58
2. FASE EXPERIMENTAL 59
   2.1. Grupo Controle 59
   2.2. Grupo Tratamento 60
   2.3. Método de recuperação embrionária 60
   2.4. Avaliação e classificação embrionária 61
   2.5. Análise da viabilidade embrionária 61
   2.6. Determinação sangüínea de progesterona 62
   2.7. Manejo após a coleta de embriões 62
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA 63

RESULTADOS 64

1. ANTECIPAÇÃO DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA 65
2. SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA 67
3. ASPECTOS DA DINÂMICA FOLICULAR 72
4. CLASSIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO EMBRIONÁRIA 79
5. DETERMINAÇÃO SÉRICA DA PROGESTERONA 88

DISCUSSÃO 89

CONCLUSÕES 104

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

APÊNDICES 127

Introdução

O uso da Transferência de Embriões e o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de embriões tem aumentado nas últimas duas décadas em todo o mundo. E, devido ao crescente número de adesões à técnica por parte de várias associações, hoje o Brasil é o país que mais realiza esta biotecnologia no mundo, ultrapassando inclusive os Estados Unidos. Além das vantagens exaustivamente citadas como a produção de embriões a partir de éguas idosas, subférteis e em atividade, entre outras, a transferência de embriões pode ser uma técnica importante também para espécies ameaçadas de extinção. Contudo, o garanhão ainda está em vantagem, pois, enquanto o sêmen de um garanhão valioso pode ser utilizado para cobrir várias éguas por ano, produzindo vários potros, poucos produtos podem ser obtidos a partir de uma mesma égua, primeiro devido às restrições das próprias associações e, segundo, devido as limitações reprodutivas da fêmea.

Sabe-se que logo após o nascimento, os ovários de uma fêmea eqüina contêm milhares de folículos, entretanto, poucos se desenvolvem, maturam e ovulam durante a vida reprodutiva. Os demais, permanecem em quiescência e, por um mecanismo ainda desconhecido, são recrutados em grupos para iniciar o desenvolvimento. Do grupo de folículos que iniciam a emergência da onda, um deles é selecionado, torna-se dominante e continua se desenvolvendo, enquanto os outros regridem e tornam-se atrésicos. Estima-se que aproximadamente 99% dos folículos ovarianos entram em atresia (Webb et al., 1999).

Além disso, a maioria das éguas não ciclam durante o inverno e passam por uma fase de transição antes de se estabeler a estação reprodutiva fisiológica. A fase transicional é caracterizada por progressivas ondas de atividade folicular que se desenvolvem e entram em atresia. Eventualmente uma onda folicular possuirá um folículo dominante que continuará o seu desenvolvimento e irá culminar em ovulação. A partir da primeira ovulação, as éguas geralmente continuam a ovular em intervalos de aproximadamente 21 dias.

Desta forma, além do fato de ocorrer apenas uma única ovulação por ciclo, a existência de uma estação reprodutiva compromete ainda mais o aproveitamento do potencial reprodutivo da espécie. Adicionalmente, o estabelecimento de uma data de nascimento arbitrária, por parte de algumas associações, que utiliza o 1º de janeiro (Hemisfério Norte) e o 1º de agosto (Hemisfério Sul) como datas de aniversário oficiais, o que favorece os potros nascidos no final do inverno e no início da primavera, tem trazido prejuízo e inconformidade por parte do criador. Com isto, tem-se estimulado o desenvolvimento de procedimentos para encurtar ou eliminar o período de transição, antecipando, desta forma, a estação reprodutiva.

Já em relação aos folículos que fisiologicamente se tornariam atrésicos, um aproveitamento mais racional pode ser obtido através da superestimulação ovariana com

hormônios gonadotróficos ou com outros métodos de neutralização da dominância folicular, que promovam a superovulação.

O procedimento de superovulação também é indicado para diminuir os custos com os programas de transferência de embrião. Após a lavagem uterina, geralmente 50 a 70% das éguas produzem um embrião, implicando em maiores gastos com a manutenção de receptoras que permanecem vazias. A indução de múltiplas ovulações promove uma maior taxa de recuperação embrionária, o que possibilita a transferência cada vez mais precoce dos embriões para as receptoras, diminui o número de visitas do veterinário e permite a redução do número de manipulações e intervenções da égua. O estabelecimento de protocolos superovulatórios, que incrementem o número de embriões disponíveis, também proporcionam um aumento na comercialização de embriões e propulsionam os estudos sobre a transferência intrafalopianas de gametas (GIFT), a injeção espermática intracitoplasmática (ICSI), a fertilização *in vitro* (FIV) e a criopreservação de oócitos e de embriões.

Vários protocolos superestimulatórios já foram testados, avaliando o momento para o início do tratamento, o tipo de gonadotrofina, a duração do tratamento e a dose utilizada, sendo que os resultados mais consistentes, até hoje, foram obtidos com o extrato de pituitária eqüina (E.P.E.) e com o Hormônio Folículo Estimulante eqüino purificado (eFSH) administrados duas vezes ao dia, apesar de ainda produzirem um pequeno número de embriões. Outros estudos também demonstraram a eficiência do E.P.E. e do eFSH em promover múltiplas ovulações durante a fase de transição de primavera. Em um recente estudo da Universidade do Colorado (Niswender et al., 2004) os autores conseguiram induzir e promover múltiplas ovulações com o eFSH, contudo, não avaliaram a capacidade de fertilização destes folículos e, conseqüentemente, a taxa de recuperação embrionária.

Deste modo, o desenvolvimento de protocolos para antecipar a estação reprodutiva, aumentar o número de ovulações e, conseqüentemente, aumentar a produção de embriões, é de extrema valia para maximizar o potencial reprodutivo da espécie. Diante disto, este trabalho foi realizado com o intuito de se adicionar maiores informações sobre a manipulação da fisiologia reprodutiva da égua, contribuindo com a intensificação, cada vez mais precoce, da demanda de embriões. Também, teve por objetivo avaliar a capacidade de se produzir embriões viáveis durante o primeiro ciclo do ano. Desta forma, este trabalho visou antecipar o início da atividade reprodutiva e produzir embriões precocemente. E, considerando-se o âmbito geral, pretendeu-se instituir um protocolo que promova benefícios econômicos.

Revisão de Literatura

1. SAZONALIDADE REPRODUTIVA

A literatura classifica a espécie eqüina como poliéstrica estacional, pois sua atividade reprodutiva sofre influência da luminosidade. As éguas se reproduzem no período do ano que oferece um melhor suplemento nutricional e as melhores condições de sobrevivência para os potros, ou seja, a incidência de ovulações é mínima ou ausente durante o inverno, aumenta transicionalmente durante a primavera, é máxima durante o verão, e diminui transicionalmente durante o outono. Assim, há uma associação natural entre o comprimento do dia e a sazonalidade reprodutiva (Ginther, 1992).

A luz é o maior modulador da estação reprodutiva, mas outros fatores podem interferir, como a idade (Wesson & Ginther, 1981; Fitzgerald & McManus, 2000) e a condição nutricional (Kubiak et al., 1987; Carnevale et al., 1996; Fitzgerald & McManus, 2000; Gentry et al., 2002a).

Éguas jovens com dois a cinco anos, apresentam uma estação ovulatória significativamente mais curta do que éguas com seis a quinze anos, o que foi atribuído a um declínio antecipado da ocorrência das ovulações durante a transição de outono (Wesson & Ginther, 1981; Fitzgerald & McManus, 2000). Da mesma forma, éguas mais velhas, com mais de quinze anos, também apresentam uma estação reprodutiva mais curta, porém neste caso, esta deve-se a uma menor ocorrência de ovulações durante os dois primeiros meses da primavera.

Com relação ao estado nutricional, foi demonstrado que éguas que estão em boa condição corporal, em geral, iniciam a estação reprodutiva mais precocemente do que éguas com baixo escore corporal. Além disso, éguas em condições corporais ruins, que recebem uma suplementação alimentar, têm a primeira ovulação da estação mais precocemente do que éguas magras sem suplementação (Kubiak et al., 1987).

A glândula pineal está envolvida na mediação das modificações que ocorrem com o fotoperíodo. A informação luminosa é transmitida a partir das células da retina do olho via nervo óptico, ao núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo anterior. A resposta deste núcleo é transmitida, via núcleo paraventricular, ao gânglio cervical superior, através de fibras do sistema nervoso autônomo e, então, finalmente à glândula pineal. A glândula pineal, por sua vez, produz o hormônio melatonina, que desempenha um papel crítico na modificação da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Stabenfeldt & Edqvist, 1996).

Durante a estimulação luminosa, a função da glândula pineal é inibida, mas, durante a escuridão, as fibras pós-ganglionares do gânglio cervical superior liberam um

neurotransmissor, a norepinefrina, para a glândula pineal, estimulando muitos aspectos do metabolismo pineal. O aumento da atividade da glândula pineal está associado com a diminuição da atividade ovariana e vice-versa (Ginther, 1992).

O hipotálamo, que é o local de produção do GnRH, faz parte do controle da sazonalidade reprodutiva em éguas. A produção de GnRH no hipotálamo é diferente durante as estações ovulatória e anovulatória, sendo que os níveis de GnRH aumentam durante o retorno da estação ovulatória (Silvia et al., 1986). O tratamento com luz artificial também tende a aumentar o conteúdo hipotalâmico de GnRH e, conseqüentemente, as concentrações circulantes de LH e de FSH (Cleaver et al.,1990).

A pituitária anterior controla a atividade ovariana através dos níveis circulantes de gonadotrofinas. Os níveis de LH são máximos durante o verão e mínimos durante o inverno. A produção mensal de FSH é constante, mas, ocorre uma associação entre a sua concentração e o grau de atividade folicular durante a estação não ovulatória (Turner et al., 1979).

No período de transição de primavera, inicia-se um aumento da síntese e da secreção de GnRH, que estimula a liberação de FSH e de LH. No entanto, a liberação de LH que leva à primeira ovulação do ano, também requer uma contribuição do ovário. O estímulo final para a liberação do LH é o desenvolvimento da competência estereidogênica dos folículos, que resulta em um aumento significativo das concentrações periférica e intra-folicular de estrógeno (Sharp, 1988; Sharp et al., 1991).

Desta forma, a retomada da atividade reprodutiva tem focado primeiramente a secreção de GnRH e das gonadotrofinas (Robinson et al., 1995). Entretanto, um outro hormônio, a prolactina, também tem demonstrado ter uma função gonadotrófica em mamíferos (Wise & Maurer, 1994; Lebedeva et al., 1998; Fitzgerald & McManus, 2000).

O trabalho de Fitzgerald & McManus (2000) demonstrou haver uma queda dos níveis de prolactina nos meses de inverno. Em éguas tratadas com melatonina exógena, houve uma atenuação do aumento sazonal da prolactina que ocorre durante os meses da primavera; esta interferência ocorreu apenas durante a primavera, provavelmente porque deve ter ocorrido uma refratariedade ao tratamento com a melatonina.

Fitzgerald & McManus (2000), além disso, também demonstraram existir uma relação entre a alta concentração de leptina e uma grande proporção de éguas exibindo atividade reprodutiva durante os meses de inverno; ou seja, as ovulações cessam apenas quando ocorre uma queda nas secreções endógenas de leptina. E as concentrações de leptina, por sua vez, refletem a quantidade de gordura corporal (Houseknecht et al., 1998).

2. DINÂMICA FOLICULAR DURANTE AS DIFERENTES FASES DE ATIVIDADE REPRODUTIVA

2.1. Fase Ovulatória

Em espécies monovulatórias, o desenvolvimento folicular pode ser dividido em três estágios subseqüentes: 1) início do crescimento do folículo primordial; 2) recrutamento e crescimento de outros folículos; 3) seleção do folículo dominante e atresia dos folículos subordinados.

Quando as oogônias iniciam seu desenvolvimento, tornam-se circundadas por células precursoras da granulosa, conhecidas também por células foliculares, e neste momento, inicia-se o processo da foliculogênese. Os folículos primordiais são caracterizados pela presença do oócito envolto por uma única camada de células foliculares achatadas (Braw-Tal & Yossefi, 1997), e se apresentam em maior quantidade no ovário. Exames histológicos de ovários de éguas em atividade cíclica, revelaram a presença de aproximadamente 36.000 folículos primordiais e 100 folículos em desenvolvimento (Driancourt & Palmer, 1984).

O desenvolvimento folicular é caracterizado pela diferenciação e proliferação das células da granulosa. A formação de múltiplas camadas de células foliculares cúbicas indica a transformação de folículo primário em secundário. Acompanhando este processo está a formação da zona pelúcida ao redor do oócito. Folículos primários e secundários são também identificados como folículos pré-antrais (Hafez & Hafez, 2000).

Os mecanismos que levam à ativação dos folículos primários e que regulam o desenvolvimento folicular até a fase pré-antral, não estão completamente elucidados, contudo, acumulam-se evidências que o desenvolvimento folicular pré-antral e o início da fase antral ocorrem independentemente de ação gonadotrófica. Polipeptídeos intra-ovarianos estão envolvidos na proliferação e na diferenciação celular, atuando através de um mecanismo de controle autócrino ou parácrino. Entre eles, os fatores de crescimento epidermal (EGF), fibroblástico (bFGF), semelhante à insulina (IGF), de crescimento neural (NGF), o transformador fator-β (TGF-β), a inibina, a ativina, o ligante kit (KL), o fator inibidor de leucemia (LIF) e os fatores de crescimento hematopoiéticos (citocinas), são vistos como os fatores que regulam o desenvolvimento folicular na fase pré-antral e início da fase antral (Findlay, 1994; Monniaux et al., 1997; Van den Hurk et al., 1997; Van den Hurk & Zhao, 2003). Além destes, acredita-se que o fator nove (9) de crescimento e diferenciação (GDF-9)

e as "bone morphogenetic protein 15 e 6" (BMP-15 e BMP-6), que são expressos pelo oócito, podem ser mediadores no crescimento do folículo pré-antral (Elvin et al., 2000; Fortune, 2003). Os fatores de transcrição WT-1 e SF-1 também podem estar envolvidos no recrutamento de folículos primordiais e subsequente crescimento de folículos iniciais (Van den Hurk & Zhao, 2003).

Em uma recente revisão realizada por Fortune (2003) apontou-se que o FSH tem um efeito positivo durante a fase de crescimento dos folículos primários, em primatas; durante a fase de transição de folículo primário para secundário, em roedores; e durante a fase de desenvolvimento do folículo secundário em primatas, vacas e roedores. Em relação ao LH, mostrou-se um efeito positivo apenas em roedores.

Os esteróides também podem afetar positivamente o desenvolvimento de folículos secundários e em alguns casos, até folículos primários são responsivos (Hulshof et al., 1995).

Em éguas, os folículos desenvolvem o antro quando atingem aproximadamente 300μm de diâmetro. Associado a este processo, uma bainha de células, conhecidas como células da teca, forma-se ao redor das células da granulosa. As células da teca formam duas sub-camadas: a teca externa, constituída quase que totalmente por tecido conjuntivo; e a teca interna, que é a camada vascular. Enquanto isto, ocorre nova proliferação de células da granulosa, e estas, se organizam em múltiplas camadas ao redor do oócito, formando o "cumulus oophorus". Estes eventos indicam a transição do folículo secundário para terciário (Kenney et al., 1979).

Com a formação do antro folicular, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas para o seu desenvolvimento, o que é evidente pela expressão de receptores de FSH pelas células da granulosa e de receptores de LH pelas células da teca (Webb et al., 1999). Vários destes folículos crescem em sincronia, estabelecendo uma onda de crescimento folicular.

Ginther (1993 e 2000) definiu as ondas foliculares como ondas maiores e ondas menores. As ondas maiores são caracterizadas pelo desenvolvimento inicial de um grupo de folículos que cresce rapidamente até que apenas um folículo, ou ocasionalmente dois, torna-se dominante sobre os outros. Estas, são divididas em ondas primárias e secundárias, de acordo com o momento de sua emergência. Quando a emergência ocorre durante o cio ou no início do diestro, ela é chamada de onda folicular secundária que dá origem a um folículo dominante no diestro, que pode regredir ou, mais raramente, ovular. A emergência da onda folicular na metade do diestro é chamada de onda folicular primária, e produz um folículo dominante, que

irá ovular durante o estro. As ondas que não apresentam folículos dominantes são classificadas como ondas menores.

Os ciclos estrais que apresentam duas ondas foliculares, ou seja, que apresentam ondas primárias e secundárias, representam menos que 30% dos ciclos (Sirois et al., 1989; Buratini, 1997).

A concentração média de FSH, associada com a onda de FSH, aumenta concomitantemente com a emergência de uma onda folicular primária na metade do ciclo (Bergfelt & Ginther, 1993; Gastal et al., 1997), e o pico de produção de FSH, ocorre quando o futuro folículo dominante tem aproximadamente 13 mm de diâmetro. Após o pico, as concentrações de FSH começam a declinar, alcançando níveis basais dias mais tarde (Bergfelt, 1998). Este declínio está associado, de forma temporal, com a divergência folicular (Gastal et al., 1997).

A divergência é caracterizada pelo crescimento contínuo do maior folículo tornando-se o folículo dominante, e pela redução ou bloqueio do crescimento dos demais folículos, tornando-os subordinados. Em espécies monovulatórias, o termo seleção folicular também é utilizado, e é referido como o crescimento preferencial e ovulação de um único folículo (dominante) com regressão do grupo remanescente de folículos (subordinados) (Bergfelt, 1998; Ginther, 2000).

De acordo com o modelo de crescimento de dois folículos maiores delineado por Gastal et al. (1997), o folículo dominante surge aproximadamente um dia antes do folículo subordinado, mantendo seu diâmetro superior até a divergência folicular, contudo, com uma taxa de crescimento similar. A divergência no crescimento, entre o folículo dominante e o maior folículo subordinado, acontece aproximadamente seis dias após a emergência do folículo dominante e neste momento, o folículo dominante e o subordinado apresentam 22-23 e 19-20 mm de diâmetro, respectivamente.

Por causa do diâmetro avantajado do maior folículo, Bergfelt (1998) relatou que a seleção ocorre ou se inicia antes da detecção ultra-sonográfica da emergência dos folículos, assim, o momento exato da seleção não pode ser definido, visto que outros fatores podem determinar qual dos folículos se tornará sensível a uma onda de FSH. Também é salientado que o folículo não dominante conserva sua capacidade para iniciar a dominância até após a divergência, pois quando se realiza a ablação do folículo dominante, o segundo maior folículo inicia sua dominância (Bergfelt, 1998). Além disso, iniciando-se o tratamento com FSH precocemente, ocorre o desenvolvimento da dominância por vários folículos, demonstrando a capacidade de pré-divergência dos folículos (Squires et al., 1986).

O estímulo necessário para o recrutamento folicular, ou seja, para a continuidade do crescimento folicular, depende de uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH. Possivelmente, durante este recrutamento, o futuro folículo dominante, cujo estágio de desenvolvimento está melhor sincronizado com o estímulo gonadotrófico, diferencia-se dos demais folículos e adquire a capacidade de refratariedade aos níveis decrescentes de FSH, desencadeados por ele próprio e por supressores do desenvolvimento dos folículos subordinados (Fortune, 1994).

Enquanto o aumento nas concentrações de FSH coincide com a emergência de ondas maiores e menores, a redução dos níveis de FSH coincide com o desvio nas taxas de crescimento entre o futuro folículo dominante e os folículos subordinados da onda maior. O desvio também é precedido pelo aumento nas concentrações de LH (Bergfelt, 1998; Gastal et al., 2000).

Desta forma, o futuro folículo dominante deve desenvolver duas habilidades: 1) habilidade para suprimir os níveis circulantes de FSH, para diminuir as concentrações requeridas pelos outros folículos e, 2) habilidade para utilizar as baixas concentrações de FSH para promover o seu crescimento e desenvolvimento (Ginther, 2000).

Acredita-se que a regressão dos folículos menores ocorre devido a um efeito direto dos fatores inibitórios secretados pelo folículo dominante. Bergfelt & Ginther (1986) propuseram que as secreções de estradiol e de inibina pelo folículo dominante, seriam as responsáveis pela redução nos níveis circulantes de FSH, que se tornariam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados. Ginther et al. (2000) confirmaram esta teoria, detectando níveis mais altos de estradiol e de inibina no segundo maior folículo em relação ao terceiro, após a ablação do folículo dominante.

De acordo com Monniaux et al. (1997), existe a participação decisiva de fatores de crescimento no processo de seleção e de diferenciação do folículo dominante. Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs) são considerados os fatores locais mais importantes nesta fase. Foi demonstrado que ocorre um aumento na biodisponibilidade dos IGFs no fluido folicular dos folículos dominantes, durante a fase terminal de seu desenvolvimento. Provavelmente, no momento da queda dos níveis de FSH, essa maior biodisponibilidade de IGFs, cause uma maior sensibilidade das células da granulosa do folículo dominante e uma potencialização das ações do FSH. Ginther et al. (2000) também detectaram um aumento intrafolicular do IGF-I no folículo destinado à dominância.

Outro fator fundamental na seleção folicular é a alteração da dependência gonadotrófica do folículo dominante. Bodensteiner et al. (1996) relataram a presença de receptores de LH nas células da granulosa de folículos dominantes, antes da divergência folicular; por isso, sugerem existir uma participação do LH no mecanismo de seleção.

De acordo com Webb et al. (1999), após ocorrer a divergência e a seleção do folículo dominante, os folículos subordinados sofrem atresia. A atresia é um processo irreversível, que ocorre por morte celular através de apoptose, e que ocorre em aproximadamente 99% de todos os folículos em espécies monovulatórias.

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

Segundo Pierson e Ginther (1987), quando os folículos subordinados iniciam o seu declínio, o folículo dominante começa a crescer rapidamente, a uma taxa de três a cinco milímetros (mm) por dia. O controle ultra-sonográfico do folículo dominante pré-ovulatório demonstrou um aumento no volume do antro e um espessamento da parede folicular (Townson & Ginther, 1989). Em eqüinos, o folículo pré-ovulatório alcança um diâmetro superior a 35mm, e a parede pode apresentar 6 mm de espessura. Além disso, há um aumento nas concentrações intra-foliculares de estrógenos, andrógenos e de inibina (Pierson & Ginther, 1987). Há também um expressivo aumento no número de receptores de LH nas células da granulosa, tornando o folículo responsivo ao LH pituitário (Webb et al., 1999).

Em muitas espécies, a ovulação ocorre após o pico de LH. Em éguas, a ovulação ocorre após uma constante e lenta elevação na concentração de LH (Ginther, 1987). Ainda sob a ação do estímulo de LH, o folículo rompe-se e o oócito é expelido, sendo captado pelas fímbrias e liberado no oviduto para a possível ocorrência da fertilização. Inicialmente, ocorre uma hemorragia após a ruptura folicular, determinando a formação do corpo hemorrágico, posteriormente, as células da granulosa e da teca sofrem luteinização para formar o corpo lúteo. A partir deste momento, inicia-se a fase luteal (Hafez & Hafez, 2000).

A combinação dos eventos, que levam à ovulação do folículo dominante, é um processo dinâmico. Um melhor entendimento dos processos que levam ao recrutamento, seleção e dominância são pré-requisitos para o estabelecimento de um método que promova uma resposta superovulatória em éguas.

2.2. Fase Anovulatória

Ginther (1992) divide a fase anovulatória em três etapas: retrocesso, inatividade e ressurgimento, que são profundamente influenciadas pelo fotoperíodo.

A fase de retrocesso é definida como uma redução gradual da atividade ovariana para uma condição de inatividade. Esta fase é caracterizada pela falha na ovulação de grandes folículos em um tempo esperado, e muitas vezes é referida como transição de outono. Durante a fase de inatividade, não há desenvolvimento de folículos acima de 10 ou 15 mm de diâmetro. Já a fase de ressurgimento é definida como um retorno gradual da estação ovulatória, sendo normalmente referida como período de transição de primavera. Muitos autores utilizam o termo transição final para éguas que desenvolvem grandes folículos (maiores que 25 mm), mas, que ainda não entraram na estação ovulatória.

2.2.1. Fase de Ressurgimento ou de Transição de Primavera

Estudos indicaram que o número médio de folículos menores que 20 mm começa a diminuir no início da primavera, enquanto ocorre um rápido aumento no número de folículos maiores (Ginther, 1992). Durante a fase final do período de transição de primavera, os folículos alcançam diâmetros similares aos de folículos pré-ovulatórios, porém, regridem. Vários folículos dominantes continuam a emergir até que um é favorecido e ovula, iniciando desta forma, a fase ovulatória.

Um prolongado período, de aproximadamente 30 dias, de considerável atividade folicular precede a primeira ovulação. Durante este período, os folículos que chegam a ovulação, são maiores do que aqueles que irão ovular na fase final (Turner et al., 1979).

Em um estudo realizado por Ginther (1990), os folículos de 13 éguas foram monitorados por ultra-sonografia durante o período de transição. Sete éguas apresentaram de uma a três ondas anovulatórias, com folículos dominantes de até 38mm. Os folículos dominantes apresentaram fases de crescimento, estática e regressão; sendo que, não ocorreu a emergência de uma nova onda até que o folículo dominante atingiu a sua fase estática. Após a emergência da nova onda, o folículo dominante da onda anterior regride. O comprimento do intervalo, entre as sucessivas ondas da fase de transição, foi de 10,8 ± 2,2 dias. As seis éguas restantes, não apresentaram um padrão óbvio de atividade folicular, com a ausência de ondas anovulatórias distintas. Nestes animais, o primeiro folículo dominante a se desenvolver foi o que culminou em ovulação. Assim, aproximadamente 50% das éguas apresentaram um

proeminente período transicional, com ondas foliculares anovulatórias distintas, enquanto as éguas remanescentes não.

O primeiro folículo ovulatório, decorrente da fase final de transição, alcança o diâmetro de 20 mm antes (dia –15) do que o segundo folículo ovulatório (dia –10), já da estação ovulatória. O primeiro folículo ovulatório cresce mais lentamente que o segundo (2,6 x 3,6 mm por dia), mas alcança um diâmetro maior no dia que antecede a ovulação (51 x 44 mm). O intervalo compreendido entre a parada do crescimento do maior folículo subordinado até a ovulação do dominante, foi mais longo durante a fase de transição (média de 9,5 dias) do que durante o primeiro intervalo inter-ovulatório (média de 6,8 dias).

As concentrações circulantes de LH permanecem mínimas durante o anestro e durante a maior parte do período de transição de primavera, aumentando rapidamente nos últimos seis ou sete dias que antecedem a ovulação (Freedman et al., 1979; Sharp et al., 1979; Fitzgerald et al. 1987a). O crescimento do folículo dominante que culminará em ovulação está associado com o aumento nas concentrações de LH, e a freqüência máxima de pulsos e o início da estação reprodutiva parecem ocorrer mais cedo em éguas que são submetidas a um abrupto aumento artificial do comprimento do dia (Fitzgerald et al., 1987a).

Durante a fase de inatividade ovariana, a freqüência dos pulsos de LH é de aproximadamente um por dia, aumentando para cerca de seis pulsos por dia durante o período transicional (Fitzgerald et al., 1987a; Safir et al., 1987), e para até um pulso por hora, quando o folículo ovulatório está presente (Alexander et al., 1990).

Bour et al. (1985) relataram ser possível induzir a ovulação durante a fase de transição, quando os folículos apresentavam 20 mm no início do tratamento com hCG; visto que, sete de oito éguas ovularam após um período médio, de tratamento diário, de nove dias. Entretanto, quando o tratamento foi iniciado durante a fase de inatividade, quando os folículos eram menores que 15mm, apenas uma das sete éguas chegou à ovulação.

As ondas de crescimento folicular ocorrem durante a segunda metade do período de anestro e durante os períodos de menor atividade folicular, estimuladas pelas ondas de FSH. Contudo, o crescimento dos folículos para um diâmetro maior ou igual a 21 mm, no início da fase de transição, não foi atribuído a mudanças nas características das ondas de FSH (Donadeu & Ginther, 2002).

O FSH tem um papel no desenvolvimento folicular, mas outros fatores estão envolvidos durante a fase de transição. Os pulsos de LH ocorrem simultaneamente com os pulsos de FSH durante a fase de transição, mas o LH não aumenta para promover a ovulação se não for acompanhado por uma queda dos níveis de FSH (Alexander et al., 1990; Hines et

al., 1991). O declínio nos níveis de FSH começa em média aos 16 dias antes da ovulação, e é seguido pelo declínio no número de grandes folículos e pelo rápido aumento do LH durante o período de crescimento final do folículo selecionado para a ovulação (Hines et al., 1991). Durante o declínio do FSH, o folículo selecionado continua o seu crescimento e a circulação total de inibina aumenta, indicando uma supressão do FSH pela inibina, o que leva a uma inibição do crescimento dos demais folículos (Donadeu & Ginther, 2002).

Alguns estudos também evidenciam que opióides endógenos podem estar envolvidos na regulação sazonal de secreções pulsáteis de gonadotrofinas (Aurich et al., 1994; Besognet et al., 1996).

A quantidade de LH na pituitária durante o inverno é de apenas 15% em relação à quantidade encontrada no verão (Hart et al., 1984), por isso os trabalhos postulam que o LH responde de forma limitada a administração de GnRH exógeno durante a fase transicional (Nequin et al., 1989; Ginther, 1992). Hart et al. (1984) coletaram a região hipotalâmica e a pituitária de éguas em cinco diferentes intervalos do ano e verificaram que as concentrações de LH na pituitária anterior variaram significativamente ($p<0,001$) de acordo com a estação, sendo igual a 15,5 ± 2,7 μg LH/mg de pituitária durante a estação de monta, 9,7 ± 2,4 μg LH/mg durante a transição de outono, 2,3 ± 0,5 μg LH/mg durante o anestro, 2,7 ± 0,4 μg LH/mg durante a transição de primavera e 11,7 ± 1,5 μg LH/mg de pituitária durante a estação de monta seguinte.

Já a liberação de FSH é mais complexa. Durante o inverno, a secreção de FSH é baixa provavelmente em resposta aos baixos níveis de GnRH; porém, com uma injeção de GnRH é liberado muito mais FSH do que LH, porque o conteúdo de FSH na pituitária e o número de receptores de GnRH permanecem altos até durante o inverno (Ginther, 1992). Ainda, a dinâmica do FSH não depende exclusivamente do GnRH; quando éguas são imunizadas contra GnRH, as concentrações de LH são suprimidas para níveis não detectáveis, mas, as concentrações de FSH são apenas parcialmente suprimidas; ou seja, a produção e a secreção de LH é inteiramente dependente do GnRH, enquanto a secreção de FSH é afetado apenas parcialmente (Garza et al., 1986).

Da mesma forma que as gonadotrofinas, as concentrações de estradiol também são mínimas durante a fase de inatividade e durante o início da fase de transição de primavera (Oxender et al., 1977), aumentando em dez vezes no final da transição ou 16 a 73 dias antes da demonstração de cio (Hillman & Loy, 1975).

O estudo realizado por Bogh et al. (2000) demonstrou que éguas em transição desenvolvem folículos com capacidade de biosíntese de progesterona e de estradiol. Eles realizaram quatro aspirações foliculares com intervalos de três a quatro dias, que foram iniciadas no final da fase de anestro (dia 7 de fevereiro – Hemisfério Norte). As concentrações foliculares de progesterona foram em média de 7ng/ml na primeira aspiração e aumentou significativamente com as aspirações posteriores para até 21 ng/ml, nível comparado ao encontrado em éguas cíclicas. E, as concentrações plasmáticas de progesterona variaram de 0,2 a 0,7 ng/ml. Similarmente, a concentração folicular de estrógeno aumentou em seis vezes entre a primeira e a quarta aspiração, e as concentrações plasmáticas de estrógeno variaram de 5,5 a 35,1 pg/ml, não sendo alteradas com o tempo. Estes dados indicam que a capacidade estereidogênica das células da granulosa aumenta dentro de três dias após a primeira aspiração realizada durante a transição, possivelmente causada por uma onda endógena de gonadotrofina em resposta a aspiração folicular.

Entretanto, o aumento nas concentrações foliculares de esteróides com a realização das aspirações, não foi refletido nas concentrações periféricas de progesterona e de estradiol, que permaneceram a níveis abaixo de 1ng/ml e ao redor de 17pg/ml, respectivamente (Bogh et al., 2000). Isto confirma observações anteriores de que a progesterona não é detectável, a nível sérico, em éguas durante a fase de transição (Oxender et al., 1977).

Desta forma, os grandes folículos transicionais são esteroidogenicamente incompetentes. Células da granulosa de folículos transicionais em cultivo produzem menores concentrações de estradiol do que as células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (Davis & Sharp, 1991), e a concentração de estradiol e de progesterona no fluido folicular, também são menores nos folículos transicionais em relação aos folículos pré-ovulatórios (Watson & Al-zi'abi, 2002).

Watson e Al-zi'abi (2002) demonstraram que existe uma diferença clara na morfologia e na vascularização entre os grandes folículos coletados durante a fase de transição de primavera, e os folículos pré-ovulatórios da estação reprodutiva. Há um aumento da vascularização nos folículos pré-ovulatórios comparados aos folículos transicionais, como resultado do aumento do número e do tamanho dos vasos, e/ou aumento da tortuosidade dos vasos. Além disso, os folículos transicionais apresentam pequena quantidade do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que é importante para promover a angiogênese, enquanto o VEGF aparece abundantemente nos folículos pré-ovulatórios.

Adicionalmente, a primeira ovulação do ano também é afetada pela condição corporal (Gentry et al., 2002a) e pela idade das éguas (Vanderwall & Woods, 1990). Éguas com baixo escore corporal apresentam menores valores de leptina, prolactina e de IGF-1 plasmático, o que determina um profundo período de anestro (Gentry et al., 2002a). Éguas idosas (> 19 anos) ovulam duas semanas mais tarde do que éguas com menos de 13 anos, e demoram mais ciclos para conceber (Vanderwall & Woods, 1990).

A dieta também pode afetar o início da estação em éguas idosas. Segundo um experimento conduzido por Carnevale et al. (1996), éguas velhas que consumiram uma dieta de alta digestibilidade (ração para animais idosos), ovularam duas semanas mais cedo do que éguas velhas que consumiram aveia. Contudo, a alimentação não interferiu no momento da ovulação de éguas jovens.

3. MÉTODOS DE ANTECIPAÇÃO DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA

Técnicas para antecipar, encurtar ou eliminar o período transicional incluem o fotoperíodo artificial (Scraba & Ginther, 1985), o uso de progestágenos (Lofstedt, 1988), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Johnson, 1986; Hyland et al., 1987), antagonistas da dopamina (Besognet et al., 1996, 1997; Daels et al., 2000; Brendemuehl & Cross, 2000) e o extrato de pituitária eqüina (Coy et al., 1999).

3.1. Fotoperíodo artificial

Em 1940 (Burkhardt, 1946) foi realizado o primeiro experimento com exposição de éguas pôneis a luz artificial. Este iniciou-se no dia primeiro de janeiro na Inglaterra, e induziu o estro em quatro de oito éguas durante os meses de fevereiro e março. A outra metade das éguas ovulou em abril (correspondente ao mês de outubro no hemisfério sul).

Em 1975, Kooistra & Ginther observaram que o aumento gradual do fotoperíodo não é essencial para estimular o início da estação reprodutiva, visto que éguas expostas a 24 horas de luz diária ovularam mais tarde do que aquelas expostas a 16 horas de luz. Também relataram que o intervalo para a primeira ovulação foi significativamente mais curto para as éguas com alguma atividade ovariana (folículos > 15 mm) no início do tratamento com luz (média de 149 dias) do que para éguas com ovários inativos (média de 176 dias).

Scraba & Ginther (1985) utilizaram lâmpadas incandescentes de 200 watts em vários experimentos e determinaram que um período mínimo de seis semanas é requerido para a efetividade do tratamento.

Ginther (1992) reuniu algumas conclusões em relação ao tratamento com o fotoperíodo artificial: 1) um tratamento com 15 ou 16 horas de luz, natural mais artificial, é igualmente efetivo para antecipar a estação reprodutiva; 2) os trabalhos efetuados no hemisfério norte tiveram melhor resposta quando foram iniciados em cinco de dezembro (equivalente ao mês de junho no hemisfério sul), mas não apresentaram nenhuma vantagem quando foram iniciados antes desta data; isto é, percebe-se uma resposta menos efetiva quando o tratamento é iniciado antes do solstício de inverno; 3) em média, o tratamento com luz resulta em 75 dias de antecipação da ovulação; 4) o início do tratamento após o dia cinco de dezembro (hemisfério norte) resulta em uma progressiva diminuição da vantagem; 5) após um período médio de dois meses do início do tratamento inicia-se a atividade folicular, e apenas após aproximadamente três meses, ocorre a ovulação.

Éguas com melhor condição corporal e que se encontram estabuladas, ou seja, que necessitam de uma menor demanda de energia, que recebem melhores cuidados e que estão expostas a temperaturas mais altas, que é importante nos casos de inverno rigoroso, quando associado ao aumento da luz artificial, aparentemente entram na estação ovulatória mais cedo (Oxender et al., 1977; Ginther, 1992).

3.2. Progestágenos

Palmer (1979) utilizou um programa de luz seguido por um regime de 10 dias com progestágeno. A primeira ovulação da estação foi antecipada, porém o progestágeno não pareceu adicionar nenhum efeito ao tratamento.

Em 1981, Turner et al. testaram a capacidade do altrenogest, um progestágeno sintético de uso oral, em estimular o início da estação ovulatória. O tratamento realizado durante 15 dias não suprimiu e não estimulou o desenvolvimento de folículos pequenos, mas, suprimiu o desenvolvimento de folículos maiores que 20 mm de diâmetro. Portanto, o progestágeno não acelera o inicio da estação ovulatória, mas é um instrumento útil para ser utilizado no período transicional, quando se deseja suprimir o estro e sincronizar a primeira ovulação do ano. Contudo, outros trabalhos enfatizam que o altrenogest acelera a primeira ovulação do ano (Allen et al., 1980; Webel & Squires, 1982; Lofstedt, 1988). O norgestomet, utilizado para controle do estro em ruminantes, também foi testado em éguas, mas nos trabalhos iniciais não suprimiu o estro efetivamente (Wiepz et al., 1988).

No Brasil, Almeida et al. (2001) testaram o implante de norgestomet (Crestar®), (com a administração de norgestomet e valerato de estradiol no primeiro dia do tratamento), e

o tratamento, via oral, com altrenogest ou com o acetato de melengestrol (MGA) em éguas crioulas durante os meses de setembro e outubro de 1998. O período de tratamento com os progestágenos foi de nove dias. Aproximadamente 86% das éguas tratadas com o norgestomet ou com o altrenogest e 43% das éguas tratadas com o MGA demostraram sinais de estro. Os dois primeiros tratamentos também mostraram-se eficazes para sincronizar o estro, sendo que o sistema norgestomet revelou tendência de maior grau de sincronização em relação ao altrenogest. Além disso, o intervalo para a ovulação após o término do tratamento e administração de um luteolítico foi menor para as éguas tratadas com o norgestomet (9,8 ± 1,06 dias) e com o altrenogest (8,6 ± 1,32 dias) em comparação àquelas tratadas com o acetato de melengestrol (11,20 ± 1,93 dias) ($p<0,05$).

Posteriormente, Costa et al. (2003) também testaram o sistema norgestomet - valerato de estradiol (Crestar®) em éguas Quarto-de-Milha que estavam em anestro ou diestro prolongado. O protocolo hormonal suprimiu o crescimento folicular em 94,12% (16/17) das éguas durante o tratamento, porém, apenas 41,18% (7/17) apresentaram desenvolvimento significativo após a administração da prostaglandina $F_{2\alpha}$. Destas sete éguas, apenas quatro exteriorizaram sinais de estro e somente duas destas, desenvolveram um folículo com diâmetro superior a 30 mm e ovularam.

3.3. Antagonistas da Dopamina

Estudos sobre o papel da dopamina no controle da reprodução em éguas ou garanhões indicam que a dopamina deve estar envolvida no controle da atividade reprodutiva em cavalos. As concentrações de dopamina no fluido cerebroespinhal são mais altas em éguas durante o anestro do que durante a estação ovulatória e estão inversamente relacionadas com as concentrações de LH (Melrose et al., 1990).

A dopamina tem um papel na regularização da secreção de prolactina em muitas espécies, incluindo a eqüina, (Besognet et al., 1997); e a prolactina, por sua vez, tem um efeito estimulatório direto, possivelmente sobre os ovários (Nequin et al., 1993).

A dopamina exerce uma inibição tônica sobre a atividade reprodutiva durante a estação anovulatória. Nequin et al. (1993) observaram que o aumento artificial na concentração endógena de prolactina durante o anestro, através do bloqueio dos receptores da dopamina ou pela administração exógena de prolactina, resultou em um rápido aumento no crescimento folicular.

Besognet et al. (1997) usando dois antagonistas da dopamina, sulpiride ou domperidone, uma vez ao dia, adiantaram o início da atividade reprodutiva em éguas em anestro. As características da secreção de FSH e de LH indicam que o tratamento com sulpiride aumenta a freqüência dos pulsos de FSH e de LH em éguas em anestro. O sulpiride atravessa a barreira hematoencefálica e, então, pode potencialmente afetar a secreção hipotalâmica e hipofisária, assim como a função ovariana. Nos experimentos de Daels et al. (2000), entretanto, o tratamento com sulpiride não teve efeito sobre a secreção de FSH.

Daels et al. (2000) tratou éguas em anestro com 0,5 mg/kg de sulpiride, duas vezes ao dia, associado a um fotoperíodo artificial, e observou um intervalo para a primeira ovulação mais curto nas éguas que foram tratadas com sulpiride (14,8 ± 1,9 dias), do que nas éguas que apenas foram expostas ao fotoperíodo artificial (34,3 ± 5,5 dias). As éguas tratadas com sulpiride também apresentaram maiores concentrações de prolactina, que pode ter um papel no início do desenvolvimento folicular e na ovulação. Segundo Daels et al. (2000) a prolactina deve aumentar a sensibilidade dos folículos aos níveis de FSH e de LH circulantes, ou deve atuar estimulando o recrutamento inicial, ou ainda, estimular o desenvolvimento de folículos antrais.

Brendemuehl & Cross (2000) testaram o domperidone, que é um antagonista específico do receptor D da dopamina, e que ao contrário do sulpiride, não atravessa a barreira hematoencefálica. Oito éguas em anestro foram tratadas, a partir do dia 15 de janeiro (Hemisfério Norte). Elas ovularam mais precocemente do que as éguas não tratadas, levando em média 27 dias para ovularem (51 ± 8,2^{o} dia do ano), enquanto as éguas não tratadas ovularam no 129 ± 13,6^{o} dia do ano. Além disso, a administração de domperidone resultou em níveis plasmáticos mais altos de prolactina, de LH e de estrógeno; todavia, não houve diferença nas concentrações de FSH entre as éguas tratadas e não tratadas.

Os resultados de Daels et al. (2000) e de Brendemuehl & Cross (2000), que não observaram um aumento de FSH após a administração de antagonistas da dopamina, suportam a hipótese de que a prolactina pode ter um efeito direto sobre o ovário.

3.4. Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)

Ginther & Wentworth em 1974, realizaram o primeiro estudo envolvendo uma administração diária de GnRH em éguas que estavam na fase anovulatória, e que resultou em um aumento transitório do LH; já a infusão constante, resultou em uma liberação contínua de LH (Garcia & Ginther, 1975).

A hipófise também responde ao GnRH exógeno, aumentando a liberação de FSH. Uma única injeção em éguas durante a estação anovulatória, causa um aumento comparável aos níveis que ocorrem no seu pico, durante o ciclo estral (Evans & Irvine, 1976).

Evans & Irvine (1977) também testaram um protocolo de administrações repetidas de GnRH em intervalos de 10 dias, associado a administração de progesterona, e conseguiram induzir a ovulação em cinco éguas (100% dos animais) que estavam na fase final da estação anovulatória.

Muitos trabalhos tem utilizado vários tipos de regimes de administração repetida ou contínua de GnRH e de seus agonistas, que são eficientes em induzir a ovulação em éguas durante a estação anovulatória, sendo que, a porcentagem de éguas que responde, aumenta de acordo com a época do ano ou de acordo com o diâmetro folicular no início do tratamento (Evans & Irvine, 1979; Johnson, 1986, 1987; Allen et al., 1987; Fitzgerald et al., 1987b; Hyland et al., 1987; Palmer & Quellier, 1988).

Os trabalhos de Johnson (Johnson, 1986, 1987; Johnson & Becker, 1988), não apenas demonstraram que o GnRH liberado em pulsos, estimula os folículos e induz a ovulação em nove a 12 dias, até em éguas na fase inativa, mas, também concluíram que a administração de altas doses de análogo de GnRH pode induzir múltiplas ovulações.

Nem todas as éguas que apresentam folículos pequenos no início do tratamento respondem, e algumas das que respondem, retornam ao estado de anestro após o tratamento. Hyland et al. (1987), em um primeiro experimento, trataram éguas que estavam em anestro profundo, com mini-bombas osmóticas de GnRH durante 28 dias; apenas três das dez éguas tratadas com 50ng/kg de GnRH por hora, ovularam, e, sete das dez, tratadas com 100 ng/kg por hora. Em um segundo experimento, eles realizaram o tratamento de éguas que estavam em anestro superficial com 100 ng/kg/hora. As éguas tratadas ovularam mais cedo do que as éguas não tratadas (em média, 18,62 dias contra 41,96 dias, após o início do tratamento), e também conceberam mais cedo.

Ginther & Bergfelt (1990) conseguiram que 57% das éguas, em anestro, ovulassem num período de até 21 dias com a administração a cada 12 horas de 200μg de um análogo do GnRH. Nestes animais, o maior diâmetro folicular observado no início do tratamento, foi de 17 mm. Em um segundo experimento, concluíram que ocorre um aumento da incidência das ovulações, conforme o diâmetro do maior folículo no início do tratamento. Éguas com folículos pequenos tem uma resposta menor, e estão mais propensas a retornar ao estado de anestro após o tratamento.

Mais recentemente, Gentry et al. (2002b) trataram durante 28 dias, éguas que não estavam ciclando, com um análogo do GnRH. Eles também concluíram que a administração diária do análogo do GnRH leva a um aumento imediato das concentrações plasmáticas de LH e de FSH, e que esta resposta aumenta com o tempo, indicando uma estimulação da produção e da estocagem de gonadotrofinas.

3.5. Extrato de Pituitária Eqüina (E.P.E.)

Induções da ovulação também foram alcançadas com o extrato de pituitária eqüina (E.P.E). Douglas et al. (1974) foram os primeiros a utilizarem o preparado gonadotrófico, conseguindo induzir a ovulação em 87% das éguas pôneis que estavam em anestro. O sucesso foi confirmado posteriormente por Lapin & Ginther (1977) e por Woods & Ginther (1982), em pôneis e éguas, respectivamente.

Woods & Ginther (1982) conseguiram induzir a ovulação em 95% das éguas que apresentavam, no início do tratamento, um folículo maior ou igual a 25 mm. Porém, o extrato de pituitária foi menos efetivo, ou seja, necessitou-se de um maior número de dias para a ovulação e um número menor de éguas ovulou, quando os folículos eram menores do que 25 mm no início do tratamento.

Hofferer et al. (1991) relataram ter tratado éguas em anestro (P_4 < 2ng/ml) com uma dose diária de 25mg de E.P.E., sendo que, após 17,8 dias, em média, as éguas ovularam.

Coy et al. (1999) compararam o estímulo do desenvolvimento folicular, obtido com a administração do Extrato de Pituitária Eqüina (E.P.E.), entre éguas em anestro profundo e em transição. Neste trabalho, o E.P.E. induziu a ovulação em apenas dois dos nove animais que estavam em anestro; porém, oito das nove éguas tratadas no período transicional (folículo ≥ 25mm) ovularam num período médio de 11,8 ± 5 dias após o início do tratamento.

3.6. Hormônio Folículo Estimulante Eqüino (eFSH)

Recentemente, pesquisadores da Universidade do Colorado (Niswender et al., 2004) foram os pioneiros a testar a habilidade do FSH eqüino purificado em promover o desenvolvimento folicular e a ovulação em éguas durante o período transicional. O tratamento com 12,5 mg de eFSH® (Bioniche – Canadá), a cada 12 horas, foi eficiente em promover a ovulação em 80% (8/10) das éguas após 5,2 ± 1,3 dias de tratamento em média. Essas oito

éguas ovularam significativamente mais cedo (7,6 ± 2,4 dias) do que as éguas do grupo controle (39,5 ± 17,2 dias).

3.7. Outros tratamentos

Gentry et al. (2002b) testaram o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) em éguas na fase anovulatória, em conjunto ou não, com um análogo do GnRH. As éguas tratadas com o TRH apresentaram níveis mais altos de prolactina e do hormônio estimulante da tireóide (TSH), porém, não houve efeito benéfico em se adicionar o TRH ao tratamento com o análogo do GnRH.

4. SUPEROVULAÇÃO NA ESPÉCIE EQÜINA

A manutenção de receptoras que esperam por um embrião, encarece os programas de transferência de embriões; assim, a indução de múltiplas ovulações é um método considerável para a diminuição dos custos, através do aumento do número de embriões recuperados por doadora.

A superestimulação ovariana também possibilita que um número maior de folículos possa ser aspirado, para a finalidade de procedimentos de Fertilização *in vitro* (FIV), transferência de oócitos, transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) e ainda a experimentação. Adicionalmente, sugere-se que seja possível aumentar a taxa de prenhez de éguas e/ou de garanhões subférteis, pois, pela indução de múltiplas ovulações aumenta-se a chance da ocorrência de uma fertilização. Além disso, o sêmen congelado eqüino que geralmente apresenta uma baixa fertilidade, poderia ser utilizado em parceria a um processo superovulatório, o que hipoteticamente melhoraria as taxas de prenhez (McCue, 1996; Squires, et al., 2003).

Apesar de classificarmos a espécie eqüina como monovulatória, relatos de ovulações múltiplas espontâneas, em determinadas raças, não são raros. Ginther (1986,1992) em suas revisões observou uma incidência de 15 a 25% para a raça Puro Sangue Inglês, 13 a 15% para animais de trote, 24% para as raças de tração, 8 a 10% para éguas Quarto-de-Milha e 8% para Appaloosa. Losinno et al. (2000) relataram a ocorrência de 38% de ovulações múltiplas em éguas da raça Pólo Argentino; e Carmo et al. (2002) após observarem 829 ciclos de éguas da raça Brasileiro de Hipismo, relataram que em 53% dos ciclos ocorreram duplas ou triplas ovulações.

Squires et al. (1987a) também estudaram a ocorrência de múltiplas ovulações espontâneas, e observaram que duplas ovulações ocorrem em um único ovário com a mesma freqüência que ocorrem em ovários opostos. Contudo, um maior número ($p<0,05$) de embriões gêmeos foi recuperado quando as ovulações ocorreram dos dois ovários, em comparação às ovulações duplas unilaterais.

A indução de múltiplas ovulações na espécie bovina por meio da administração de gonadotrofinas, como a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e o hormônio folículo estimulante (FSH), os quais são os mais utilizados, resultam em média numa recuperação embrionária dez vezes maior do que no caso de uma ovulação única. A gonadotrofina da menopausa humana (hMG) e o extrato de pituitária homólogo ou de outras espécies como a suína, ovina e eqüina, também são utilizados (Noakes, 1997).

Para a espécie eqüina, vários protocolos foram estudados com o objetivo de se induzir múltiplas ovulações. A administração de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), GnRH, imunização contra inibina, FSH de origem suína e o extrato de pituitária eqüina (E.P.E.) já foram testados (Irvine, 1981; Squires et al., 1986; McCue, 1996). Em estudos mais recentes foi utilizado com sucesso o FSH eqüino purificado (Alvarenga et al., 2003; Machado et al., 2003).

4.1. Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG)

Em 1940, Day foi o primeiro a reportar o insucesso do uso da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), antigamente denominada de gonadotrofina sérica da égua prenhe (PMSG), na tentativa de se estimular o crescimento folicular e a ovulação em éguas na estação anovulatória.

Vários estudos mostraram que o eCG, até em altas doses, não tem efeito sobre o desenvolvimento folicular ou ovulação na égua (Allen, 1982; Ginther, 1992). E isto foi atribuído a limitada ligação do eCG aos receptores de FSH ovarianos (Stewart & Allen, 1979).

4.2. Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH)

Tem sido reportado que a administração de GnRH induz o crescimento e a ovulação de múltiplos folículos em éguas em anestro sazonal, com taxas de ovulação relatadas de acordo com a dose administrada (Allen et al., 1987; Johnson, 1986,1987; Johnson & Becker, 1988; Ginther & Bergfelt, 1990). Contudo, a administração de GnRH em éguas

ciclando não foi efetiva para a indução de múltiplas ovulações (Irvine, 1981; Squires et al., 1989). McCue (1996) acredita que esta falha do GnRH durante a estação ovulatória deve-se a retroalimentação ("feedback") negativa ocasionada pela inibina secretada pelos folículos. A inibina impede a liberação do FSH pituitário, e conseqüentemente, acaba bloqueando o crescimento de pequenos folículos da onda folicular.

Uma única injeção do hormônio liberador de gonadotrofina em éguas na estação anovulatória ou ovulatória causa um aumento transicional nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante (LH) (Ginther & Wentworth, 1974); e uma infusão constante resulta em uma liberação contínua de LH (Garcia & Ginther, 1975). O hormônio folículo estimulante (FSH) também responde à administração exógena de GnRH. Uma única injeção em éguas em anestro causa um aumento comparável aos níveis alcançados durante o pico no ciclo estral (Evans & Irvine, 1976).

Evans & Irvine (1977) induziram a ovulação em cinco das cinco éguas que estavam no final da estação anovulatória, utilizando três injeções de GnRH por dia, com um intervalo de dez dias. A administração repetida ou prolongada de GnRH ou de seus análogos também foi utilizada para induzir a ovulação durante a estação anovulatória (Evans & Irvine, 1979; Johnson, 1986, 1987; Allen et al., 1987; Fitzgerald et al., 1987b; Hyland et al., 1987; Palmer & Quellier, 1988).

Johnson (1986, 1987) e Palmer & Quellier (1988) utilizaram um sistema de liberação pulsátil através de bombas de infusão; Hyland et al. (1987) e Palmer & Quellier (1988) testaram minibombas osmóticas para um liberação constante de GnRH natural. Já para os análogos, os sistemas de liberação testados que foram eficientes incluem os implantes de baixa liberação (Allen et al., 1987) e as injeções a cada 12 horas (Fitzgerald et al., 1987b).

As taxas de ovulação relatadas por Johnson & Becker (1988) foram de 1,3 ± 0,2, 2,9 ± 0,5, e 3,5 ± 0,9, com a administração de 2, 20 e 100μg de GnRH por hora, respectivamente. Neste estudo foram utilizadas éguas em anestro, e o GnRH foi administrado através de uma bomba de liberação por um período médio de 11,4 dias.

Em outro estudo, éguas em anestro receberam 100, 200 ou 400μg de um análogo de GnRH, a cada 12 h, e exibiram taxas de múltipla ovulação de 24%, 32%, e 37%, respectivamente, sendo que o efeito da dose não foi significativo. Neste trabalho também se observou que, quando o tratamento foi iniciado quando o maior folículo apresentava um diâmetro igual ou superior a 25 mm, as taxas de múltipla ovulação foram mais altas ($p < 0,01$), de 64%, em comparação àquelas obtidas quando o tratamento iniciou-se quando o

maior folículo tinha um diâmetro inferior a 25 mm (25%). Das múltiplas ovulações obtidas, 85% foram duplas e 15% triplas (Ginther & Bergfelt, 1990).

4.3. Imunização contra a Inibina

A inibina é um hormônio gonadal não esteróide, solúvel em água, que regula a secreção do FSH através do "feedback negativo" (McCue, 1996), com pouca ou nenhuma ação sobre a secreção de LH (Ginther, 1992). É um hormônio glicoproteico que consiste de duas subunidades dissimilares, alpha (α) e beta (β) (Burger & Igarashi, 1988). A principal fonte de inibina é o folículo dominante, que através da inibição da secreção de FSH, promove a supressão dos folículos menores (Irvine, 1981).

Com base neste conhecimento, foi suposto que a neutralização da inibina permitiria que as concentrações de FSH se mantivessem elevadas durante o período de seleção folicular e preveniria a regressão ou atresia dos folículos pequenos, resultando em múltiplas ovulações (McCue, 1996).

As tentativas iniciais de imunização ativa contra a inibina em bovinos e ovinos usaram uma proteína (antígeno) que foi parcialmente purificada do fluido folicular (Henderson et al., 1984; Cummins et al., 1986; Price et al., 1987). Após o isolamento e a determinação da seqüência de aminoácidos da inibina, os estudos subseqüentes utilizaram fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade α da inibina como antígeno (McCue, 1996).

McCue et al. (1992) e McKinnon et al. (1992) foram os primeiros a imunizarem éguas ciclando contra a subunidade alfa (α) da inibina, conseguindo um aumento nas taxas de ovulação, de 2,8 e 2,3, respectivamente.

No trabalho de McKinnon et al. (1992), foram imunizadas cinco éguas com uma subunidade α recombinante bovina, realizando-se duas aplicações com 35 dias de intervalo entre elas, e a taxa média de ovulação aumentou de 1,18 para 1,86 após a primeira injeção, e para 2,29 após a injeção de reforço; enquanto que as éguas controle tiveram uma taxa de ovulação igual a 1,2. Já McCue et al. (1992) imunizaram seis éguas que estavam ciclando com cinco aplicações, com intervalos de três semanas; para isso, utilizaram um fragmento sintético da subunidade α da inibina suína. As éguas imunizadas ovularam significativamente um número maior de folículos por ciclo estral (2,8) do que as éguas não imunizadas (1,1). As taxas de recuperação embrionária (D7) também tenderam a ser maiores para as éguas imunizadas ($1,6 \pm 0,5$) em relação às não imunizadas ($0,7 \pm 0,2$), enquanto que a porcentagem

de recuperação embrionária por ovulação foi similar para ambos os grupos, 58% e 57%, respectivamente.

Uma desvantagem em relação ao uso da imunização ativa contra a inibina em éguas é a necessidade de se realizar várias inoculações (McCue, 1996). Adicionalmente, a imunização ativa contra a inibina não é eficaz e nem apropriada para todas as éguas (Squires & Seidel, 1995). Outro importante empecilho são as reações adversas que variam de um suave edema a um abscesso, e que ocorrem ocasionalmente no local da imunização, mas, que são inaceitáveis para doadoras de alto valor. O efeito a longo prazo da imunização ativa contra a inibina, sobre a função ovariana, também não é conhecido (McCue, 1996).

A primeira tentativa de imunização passiva em éguas, foi proposta por McCue et al. (1993), utilizando plasma hiperimune contra inibina. Neste experimento, cinco éguas foram tratadas com dois litros de plasma de éguas normais ovariectomizadas, e dez éguas receberam dois litros de plasma anti-inibina. O tratamento foi realizado no décimo dia após a ovulação e resultou em um modesto aumento na taxa de ovulação (1,6 versus 1,0) do grupo tratado com o plasma hiperimune. Este estudo demonstrou que a imunização passiva de éguas com o plasma anti-inibina pode induzir a múltipla ovulação, e então eliminar a necessidade do tratamento diário com gonadotrofinas ou das prolongadas séries de inoculação ativa contra a inibina. Infelizmente, a taxa de ovulação após a imunização passiva de éguas contra a inibina foi menor do que após a imunização ativa. Além disso, uma égua que recebeu o plasma anti inibina desenvolveu urticária imediatamente após a administração do plasma, e outra égua morreu após 44 dias da imunização passiva.

Ao contrário, Nambo et al. (1998) demonstraram que a imunização passiva contra inibina poderia controlar a secreção de FSH e a taxa de ovulação em éguas. Quando as éguas foram tratadas com anticorpo contra inibina, a taxa de ovulação foi significativamente maior para os animais que receberam 100 ou 200 ml de soro anti-inibina, via endovenosa, no 12^{o} dia pós-ovulação, quando comparado ao grupo controle (3,75 e 4,5 versus 1,25), respectivamente. Entretanto, também foram observados efeitos colaterais nos animais tratados.

4.4. Hormônio Folículo Estimulante Suíno (FSHp)

Os primeiros relatos da utilização do FSH para a indução de múltiplas ovulações em éguas se referem ao uso do FSH de origem porcina, devido a sua grande disponibilidade. Porém, os resultados com a administração do FSH-P, duas vezes ao dia, foram insatisfatórios, além do tratamento ser oneroso devido à necessidade de doses elevadas (Squires et al., 1986).

A administração do FSH suíno, duas vezes ao dia, a partir do final do diestro até a ovulação resulta em uma taxa de ovulação de 1,2 (Fortune & Kimmich, 1993) a 1,7 folículos por ciclo (Irvine, 1981). Veselinovic et al. (1994) obtiveram valores intermediários de 1,5 ovulações por ciclo. Squires et al. (1986) utilizando 150 mg de FSH-P, conseguiram em média 1,6 ovulações por égua. Resultado semelhante foi obtido por Sirois et al. (1992).

Na série de experimentos realizados por Fortune & Kimmich (1993), em que o FSH-P (Folltropin®) foi aplicado duas vezes por dia, em doses de 0, 2, 4, 8, 16 ou 32 mg por injeção, a partir do sexto dia após a ovulação, as taxas de ovulação foram de 1,2 para os grupos que receberam zero e dois miligramas, 1,0 para o grupo que recebeu 4 mg, 1,8 para o que recebeu oito miligramas e 1,5 para os grupos que receberam 16 e 32 mg.

As doses de FSH-P administradas para as éguas são aproximadamente 70 vezes a dose normalmente utilizada para bovinos no intuito de promover múltiplas ovulações. E como observado, a resposta obtida com éguas é muito menor daquelas reportadas para vacas. Os ovários das éguas então parecem serem pouco sensíveis ao FSH suíno. Portanto, o uso do FSH-P tem aplicação prática limitada na reprodução eqüina devido a sua baixa eficácia e alto custo (McCue, 1996).

4.5. Extrato de Pituitária Eqüina (E.P.E.)

O E.P.E. tem sido o preparado mais utilizado em estudos sobre a indução de múltiplas ovulações em éguas. O E.P.E. é um preparado parcial de gonadotrofina eqüina que induz consistentemente ovulações múltiplas em éguas.

O extrato de pituitária eqüina, utilizado nos estudos iniciais de superovulação em éguas, foi um preparado cru de gonadotrofinas feito de glândulas pituitárias eqüinas, usando a técnica reportada por Braselton & McShan (1970). Atualmente, a maior parte dos trabalhos utiliza um E.P.E. obtido pelo método reportado por Guillou & Combarnous (1983), em que as pituitárias eqüinas são homogeinizadas e as gonadotrofinas são extraídas através de uma solução de 40% de álcool etílico (etanol) e 6% de acetato de amônia. As gonadotrofinas são então precipitadas pela elevação da concentração de etanol a 80%, a uma temperatura de –20 ^{o}C. Depois elas são dissolvidas em tampão fosfato, dializadas e liofilizadas. Por esta técnica são extraídas aproximadamente três a seis gramas de E.P.E. por quilograma de pituitária eqüina. Este extrato contém aproximadamente 6 a 10% de LH eqüino puro, 2 a 4% de FSH e 90% de outros componentes (relação LH:FSH de aproximadamente 4:1). Carmo (2003),

contudo, após processamento do E.P.E. conforme descrito por Guillou & Combarnous (1983), verificou uma relação LH:FSH igual a 3:2.

A princípio a atividade gonadotrófica da dose foi estimada por uma amostra de ovários de ratas superestimuladas com E.P.E., que foram pesadas e expressadas em Fevold-Hisaw rat-units (FHRU) (Fevold, 1939). A partir da década de 90, os trabalhos referem a dose em miligramas, mas, as constantes variações dos níveis de FSH e de LH presentes no preparado dificultam a padronização da dose.

O primeiro relato de êxito após o uso do E.P.E. para a superovulação de éguas foi pronunciado por Douglas et al. em 1974. Eles trataram éguas pôneis em anestro com duas injeções diárias de E.P.E. durante 14 dias, conseguindo induzir a ovulação em aproximadamente 87% (25/29) dos animais e múltiplas ovulações (≥ 2) em 58%.

Em experimentos subseqüentes realizados no mesmo laboratório da Universidade de Wisconsin, Lapin & Ginther (1977) reportaram pela primeira vez a estimulação de múltiplas ovulações em éguas durante a estação reprodutiva fisiológica. Utilizaram sete éguas pôneis em fase final de diestro e sete outras, dos dias um a seis do estro. As taxas médias de ovulação para as éguas nas fases de diestro e de estro foram respectivamente, de 2,8 e 1,7. Neste trabalho também foi verificado que o uso do hCG no final do tratamento com E.P.E. reduziu significativamente o intervalo do início do tratamento à ovulação.

Douglas em 1979 tratou éguas ciclando com sete injeções de 750 Fevold-Hisaw rat-units (FHRU) de extrato de pituitária eqüina durante os dias 14 a 20, obtendo uma taxa de ovulação igual a 2,3 e resposta superovulatória em 75% das éguas. Neste trabalho foram recuperados embriões de 55,6% das éguas tratadas, contudo, houve apenas 35% de recuperação embrionária por ovulação, no grupo tratado.

A resposta ovulatória ao tratamento com E.P.E. parece estar relacionada ao tamanho folicular no início da administração do extrato. Woods & Ginther (1982) observaram que as éguas, em anestro, com folículos menores que 25 mm no início do tratamento, tiveram uma resposta menos efetiva na indução da ovulação. No ano seguinte, os mesmos autores (Woods & Ginther, 1983a), trabalhando também com éguas em anestro sazonal, verificaram uma maior efetividade do E.P.E. em induzir a ovulação quando um folículo maior (30-35 mm) estava presente no início do tratamento.

Em éguas ciclando, a superovulação é mais eficiente quando a população folicular no início do tratamento com E.P.E. é de um tamanho relativamente uniforme e o maior folículo possui menos do que 25 mm de diâmetro (Woods & Ginther, 1985; Pierson & Ginther, 1990; Dippert et al., 1992).

Woods & Ginther (1985) através da administração diária de 750 unidades de E.P.E. a partir do 15º dia pós-ovulação, observaram que no 21º dia o número médio de folículos menores que 20 mm havia diminuído ($p<0,01$), enquanto que, o número médio dos folículos maiores havia aumentado significativamente ($p<0,01$) de 1,5 para 5,1 folículos por égua. Também concluíram que aparentemente o número de folículos maiores que dez milímetros, no 15º dia, pode representar os folículos que potencialmente irão ovular. Estes autores ainda averiguaram que a diferença entre o maior e o segundo maior folículo é menor nas éguas que apresentaram múltiplas ovulações do que naquelas tratadas que tiveram ovulações únicas ($2,8 \pm 0,6$ versus $7,7 \pm 1,5$); o que foi confirmado por Squires et al. (1986).

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

Métodos para regularizar a atividade folicular e suprimir o desenvolvimento folicular antes do início do tratamento com E.P.E. incluem o uso de progesterona e estradiol (Pierson & Ginther, 1990; Hofferer et al., 1991) e análogos do GnRH (Dippert et al., 1992; Scoggin et al., 2002).

Alguns estudos também têm comparado as taxas de ovulação resultante de tratamentos com E.P.E. em diferentes momentos durante o ciclo estral. Woods & Ginther (1983b) reportaram que o tratamento nos dias 15 a 19 do ciclo resultou em uma mais alta taxa de ovulação ($2,9 \pm 0,5$ versus $1,3 \pm 0,2$) e com uma grande porcentagem de éguas exibindo múltipla ovulação (85,7% versus 28,7%), do que o tratamento realizado nos dias 19 a 23. Estes autores, além de observarem nas éguas superestimuladas com E.P.E., um maior sincronismo das ovulações, também verificaram taxas de ovulação maiores para as éguas que receberam hCG.

Dippert et al. (1992) reportaram que quando o tratamento de 25 mg diários de E.P.E. foi realizado no início do diestro (dia cinco) com administração de prostaglandina nos dois primeiros dias do tratamento, houve aumentou do desenvolvimento folicular e da taxa de ovulação, comparado ao tratamento iniciado no dia 12 após a ovulação (2,9 versus 1,1).

Relacionado ao uso do hCG para a sincronização da ovulação em éguas submetidas a tratamento superovulatório, após os relatos de Lapin & Ginther (1977) e de Woods & Ginther (1983b), a utilização do hCG passou a ser uma prática comum.

Além das taxas de ovulação já revisadas, outros trabalhos descrevem as taxas de ovulação alcançadas com aplicações diárias de 750 FHRU: 4,6 ± 0,5 (Woods & Ginther, 1984), 3,4 ± 0,3 (Woods & Ginther, 1985) e 2,2 ovulações por égua (Squires et al., 1986).

Posteriormente, alguns dos trabalhos que utilizaram uma aplicação diária de 25 mg de E.P.E. relatam as seguintes taxas de ovulação: 2,2 ± 0,2 (Hofferer et al., 1991), 2,9 (Dippert et al., 1992), 3,6 ± 0,7 (Rosas et al., 1998), 2,4 ± 1,8 (Alvarenga et al., 2001) e 3,4 ± 0,6 (Scoggin et al., 2002).

Dippert et al. (1994) também testou uma dose de 40 mg diários de E.P.E., e relatou que 92,9% das éguas tiveram múltiplas ovulações, com uma média de 3,6 ± 2,1 ovulações.

Já os trabalhos mais recentes, utilizando 25 mg de E.P.E. duas vezes ao dia, relatam uma resposta de: 7,1 ± 5,1 (Alvarenga et al., 2001), 4,7 ± 0,6 (Scoggin et al., 2002), 3,5 ± 1,9 (Carmo, 2003) e de 3,4 ± 1,5 ovulações por égua (Machado et al., 2003), porém, com uma baixa taxa de recuperação embrionária por ovulação, 49%, 43,2%, 37,8% e 26%, respectivamente.

4.5.1. Recuperação embrionária e taxa de prenhez

Após Douglas (1979), Woods & Ginther (1982 a 1984) e Woods et al. (1982) foram os primeiros a reportarem dados referentes à colheita de embriões. Em 1984 estes autores verificaram que o tratamento com E.P.E. resultou em um maior ($p<0,01$) número de embriões recuperados por égua, em comparação ao grupo controle (2,9 contra 0,7); sem modificação da taxa de coleta de embrião por ovulação (0,6 contra 0,7). Todavia, após a transferência dos embriões oriundos da superovulação, eles verificaram uma redução da sobrevivência, pois apenas nove gestações (47%) foram constatadas após a transferência de 19 embriões, em comparação a sete gestações após a transferência de oito embriões (88%) do grupo controle. Então concluíram que houve uma redução da viabilidade de embriões de sete dias, oriundos de múltiplas ovulações. Contudo, Squires et al. (1987b) demonstraram que as taxas de prenhez de embriões coletados de éguas superovuladas e transferidos para receptoras

foram similares às taxas de prenhez de embriões obtidos de éguas que ovularam espontaneamente.

Esta sugestão de que embriões oriundos de animais submetidos ao tratamento superovulatório são menos competentes para se desenvolver, do que embriões de animais não superovulados, também é discutida na espécie bovina (Elsden et al., 1976; Hyttel et al., 1991; Armstrong, 1993).

Dippert et al. (1992) recuperaram um número similar de embriões das éguas tratadas com 25 mg de E.P.E. a partir do quinto dia após a ovulação (1,2) ou a partir do 12º dia, com (0,9) ou sem (1,0) um implante de buserelina (análogo de GnRH), colocado no dia da ovulação; assim como no grupo controle (0,9). Porém, o tratamento com 40 mg diários de E.P.E., a partir do 5º dia após a ovulação, resultou em uma recuperação maior ($p<0,05$) de embriões por égua ($2,0 \pm 1,8$) em comparação ao grupo não tratado ($0,7 \pm 0,5$), mas com taxas similares de recuperação embrionária por ovulação, 57,1% e 62,5% (Dippert et al., 1994).

Alvarenga et al. (2001) foram os que alcançaram a melhor taxa média de recuperação embrionária por égua (3,5) até o momento, utilizando duas aplicações diárias de 25 mg de E.P.E.; entretanto, a taxa de recuperação em relação ao número de ovulações foi baixa (49%). Os trabalhos subseqüentes, que utilizaram a mesma dose e freqüência de administração, relataram uma recuperação embrionária por égua e por ovulação, respectivamente de 2,1 e 43,2% (Scoggin et al, 2002), 1,2 e 30,2% (Carmo, 2003) e, 1,0 e 26% (Machado et al., 2003).

Por isso, as baixas taxas de fertilização, ou completa ausência de fertilização, continua a ser um dos maiores fatores limitantes nos procedimentos de superovulação em bovinos e outras espécies (Armstrong, 1993). As falhas na fertilização têm sido atribuídas a anormalidades na maturação de oócitos (Moor et al., 1985) e a assincronia entre os eventos de maturação do oócito e do folículo (Loos et al., 1991), incluindo o tempo de ovulação (Callesen et al., 1987) como uma conseqüência do estímulo hormonal. O efeito deletério dos altos níveis de LH foi observado por Donaldson & Ward (1986) em vacas superovuladas utilizando fármacos com altas concentrações de LH.

Entretanto, mesmo com os relatos de baixos índices de recuperação embrionária por ovulação, e das inferiores taxas de prenhez de receptoras que receberam embriões provenientes de tratamentos superovulatórios, o saldo final da taxa de prenhez, por doadora superestimulada, é maior do que para as éguas com ovulações únicas.

Outro componente deste problema é a deficiência no transporte espermático em animais superovulados, que resulta em um reduzido número de espermatozóides nos ovidutos

no momento da fertilização (Hawk, 1988). Elsden & Seidel (1995) também propõem uma possibilidade mais remota de que os altos níveis de progesterona produzidos poderiam alterar o transporte de espermatozóides e óvulos.

Outra anormalidade em animais superovulados que pode ser relatada é a aceleração do desenvolvimento folicular durante o período pré-ovulatório, com a ovulação ocorrendo antes que os folículos atinjam um crescimento e desenvolvimento suficiente para o completo processo de maturação das células da granulosa ou do oócito (Armstrong, 1993). Driancourt & Fry (1992) observaram em ovelhas que os folículos estavam pequenos quando ovularam, sendo que o PMSG resultou em um número variável de células da granulosa, e o FSH, um menor número de células da granulosa por folículo ovulatório, em comparação ao controle não estimulado. Estes efeitos podem contribuir para deficiências do corpo lúteo incluindo a luteólise prematura que tem sido reportada como causa da falha de recuperação embrionária em uma certa percentagem de cabras (Armstrong et al., 1983) e ovelhas (Schiewe et al., 1990) superovuladas.

Na espécie eqüina, não está bem claro se a pobre recuperação de embriões a partir de éguas superovuladas é devido à falha dos folículos para se desenvolver e ovular, ou um problema da luteinização, ou ainda falha dos oócitos para entrarem no oviduto e serem fertilizados (Dippert et al., 1994).

Lapin & Ginther (1977) encontraram 24 corpos lúteos em seis éguas que foram previamente tratadas com doses superestimulatórias de gonadotrofinas, inseminadas e que foram então necropsiadas três ou quatro dias após as ovulações. Somente 14 dos corpos lúteos mostraram traços na fossa da ovulação. Ainda, lavados dos ovidutos das éguas produziram apenas seis embriões e um oócito. Então, a inabilidade de todos os folículos pré-ovulatórios alcançarem a fossa da ovulação e o distúrbio da maturação dos oócitos, pelas grandes quantidades de LH contidas nas altas doses de E.P.E. administradas durante a fase de crescimento folicular, podem ser uma explicação da baixa taxa de recuperação embrionária.

Dippert et al. (1994) removeram ovários e ovidutos de éguas superovuladas após dois dias da última ovulação, e determinaram que mais de 90% dos corpos lúteos formados são provenientes de ovulações e não de luteinizações. Após lavagem dos ovidutos, eles recuperaram uma média de 1,0 e 1,6 oócitos por oviduto nas éguas tratadas e não tratadas, respectivamente.

Alvarenga et al. (2001) relataram que um grande número de ovulações resultou em corpos lúteos funcionais, devido ao aumento nas concentrações de progesterona, e

também não observaram diferença na taxa de recuperação de oócitos para éguas tratadas uma ou duas vezes por dia com E.P.E.

Bézard et al. (1995) realizaram punções foliculares entre 34 e 35 horas após a indução das ovulações em éguas pôneis, tratadas com 0,75 mg de E.P.E. uma vez ao dia, e em éguas controle. Não observaram diferença significativa na taxa de recuperação de oócitos, por folículo puncionado, entre as éguas do grupo controle (79%) e as tratadas (61%). Porém, o número de oócitos por ciclo foi significativamente menor para o grupo controle em relação ao tratado, 0,66 e 1,17 oócitos, respectivamente.

Scoggin et al. (2002) aspiraram via transvaginal todos os folículos pré-ovulatórios para a recuperação dos oócitos, e também não observaram nenhuma diferença na porcentagem de oócitos recuperados por folículo aspirado, entre o grupo tratado com GnRH e E.P.E. ou apenas com E.P.E.

4.5.2. Efeito da freqüência e dose de administração

Como já pronunciado, Douglas et al. (1974) foram os primeiros a reportarem o sucesso do uso do E.P.E., administrado duas vezes ao dia, para a superovulação em éguas na fase de anestro sazonal; e como posteriormente Douglas, em 1979, alcançou resultados similares com uma aplicação diária de 750 Fevold-Hisaw rat-units (FHRU) em éguas que estavam ciclando, os protocolos utilizados desde então, para a indução de múltiplas ovulações em éguas, consistiram de apenas uma aplicação diária de E.P.E.

Somente em 1999 e 2001, Alvarenga e colaboradores relataram uma melhor resposta superovulatória com duas aplicações diárias de E.P.E. em comparação a uma única administração diária de E.P.E., em éguas na estação ovulatória. Neste experimento eles alcançaram, em média, um maior número de ovulações nas éguas tratadas com duas aplicações diárias de 25 mg de E.P.E. (7,1 ± 5,1), do que para àquelas tratadas apenas uma vez ao dia (2,4 ± 1,8). O número de embriões recuperados por égua também foi significativamente superior para o grupo que recebeu duas aplicações diárias (3,5 versus 1,6). Contudo, a taxa de recuperação embrionária por ovulação foi similar entre os grupos tratados duas ou uma vez diariamente, 49% e 68%, respectivamente.

Em um estudo subseqüente no laboratório da Universidade do Colorado, Scoggin et al. (2002) determinaram se o efeito responsável pelo aumento da resposta ovariana e produção de embriões estava relacionado ao aumento da dose ou da freqüência do tratamento com E.P.E. Neste experimento, 40 éguas foram divididas aleatoriamente entre os quatro

grupos de tratamento. As éguas do grupo (1) receberam 25 mg de E.P.E. uma vez ao dia, do grupo (2) 50 mg de E.P.E. uma vez ao dia, do grupo (3) 12,5 mg de E.P.E. duas vezes ao dia e do grupo (4) 25 mg de E.P.E. duas vezes ao dia. O tratamento foi iniciado em todas as éguas, no quinto dia após a detecção da ovulação, e elas receberam uma dose de prostaglandina $F_{2\alpha}$. O tratamento foi suspenso quando metade da população folicular alcançou 35 mm de diâmetro, e então administrou -se hCG. As éguas que receberam 50 mg de E.P.E. uma vez ao dia, desenvolveram um maior número de folículos pré-ovulatórios (5,9 ± 1,1) do que os outros grupos tratados com E.P.E. (grupo 1 = 3,6 ± 0,8; grupo 3 = 3,6 ± 0,6; grupo 4 = 4,3 ± 0,8). Um maior número de ovulações foi detectado nas éguas que receberam 25 mg duas vezes ao dia (4,7 ± 0,6) do que naquelas que receberam 25 mg (3,4 ± 0,6) ou 12,5 mg (3,4 ± 0,8), uma vez ao dia. Contudo, mais embriões (p = 0,04) foram recuperados no grupo que recebeu 12,5 mg duas vezes ao dia, comparado aquele que recebeu 25 mg uma vez ao dia; e a porcentagem de recuperação embrionária por ovulação foi maior também para o grupo que recebeu 12,5 mg de E.P.E. duas vezes ao dia, em comparação aos demais. Portanto, os resultados indicaram que as éguas tratadas com uma maior dose diária tiveram uma melhor resposta ovariana, enquanto que o aumento da freqüência do tratamento, mas não necessariamente a dose, melhorou a coleta embrionária por égua e por ovulação.

Apesar de grande parte dos protocolos utilizados em bovinos utilizar tratamentos com duas aplicações diárias de FSH em doses decrescentes (Monniaux et al., 1983), apenas em 2002, Scoggin et al. avaliaram a eficácia de um método similar em éguas. Neste experimento, eles iniciaram o tratamento com 35 mg de E.P.E. duas vezes ao dia, e então diminuíram a dose em 10 mg por dia, até alcançar a dose de 10 mg. O número de folículos maiores ou iguais a 35 mm, e o número de ovulações por égua foi de 4,0 e 3,3 respectivamente. O percentual de éguas com no mínimo duas ovulações foi de 88,9%, o número de embriões recuperados por égua foi de 2,3, o percentual de embriões recuperados por ovulação foi igual a 60%, sendo que, este índice não foi superior ao grupo controle não tratado (41,7%).

Carmo (2003) também estudou o efeito do uso de doses decrescentes sobre a resposta superovulatória e a recuperação embrionária. Foi utilizada uma dose inicial de 40 mg de E.P.E. a cada 12 horas, e as doses subseqüentes tiveram uma diminuição de cinco miligramas por dia. O número médio de ovulações (5,0 ± 2,2), o número médio de embriões recuperados por égua (1,8 ± 1,3) e o percentual de recuperação por ovulação (37,8%), não diferiu em relação ao grupo tratado com uma dose constante de 25 mg.

4.5.3. Efeito de repetidas estimulações

Estudos específicos sobre os efeitos da administração de E.P.E. em ciclos sucessivos são escassos. A maioria dos relatos em que se utilizou mais de um ciclo estral diz respeito à utilização de dois ciclos intercalados por um ou dois ciclos sem tratamento; nestes casos, não foi encontrada diferença na resposta superovulatória de éguas entre os tratamentos realizados nos dois ciclos (Woods & Ginther, 1985; Palmer et al., 1993; Carmo, 2003).

Palmer (1985) realizou repetidos estímulos com E.P.E. por até seis ciclos sucessivos durante a estação ovulatória e não observou alteração nas taxas de ovulação.

Hofferer et al. (1991) verificaram apenas uma tendência da taxa de ovulação da segunda onda ser melhor do que a taxa do primeiro ciclo tratado (3,2 versus 2,2 ovulações por égua; $p = 0,07$). Também concluíram que a interrupção do tratamento por sete dias após a primeira onda ovulatória não se mostrou necessária para se obter uma segunda onda, porém, promoveu uma melhor sincronização das ovulações subseqüentes.

4.5.4. Adição de somatotrofinas

Hofferer et al. (1991) avaliaram o efeito da adição de 0,25 mg do hormônio do crescimento suíno (GH) ao tratamento superovulatório com E.P.E. em éguas ciclando. Eles reportaram uma taxa de ovulação média de 2,2 ovulações para as éguas tratadas apenas com E.P.E., comparada com 2,3 ovulações para o grupo tratado com E.P.E. mais o GH. Portanto, a adição do hormônio não representou nenhum aumento aparente da efetividade do tratamento com E.P.E.

Bruck & Lehn-Jensen (1997) propuseram utilizar a somatotrofina eqüina com o intuito de aumentar a produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), que tem a finalidade de estimular o desenvolvimento folicular. Os autores não observaram aumento do diâmetro folicular e nem alterações dos níveis de estradiol, progesterona e hormônio luteinizante, durante e imediatamente após o tratamento.

4.6. Hormônio Folículo Estimulante - eqüino (eFSH)

Recentemente, o uso do FSH purificado de origem eqüina tem sido descrito. Em 1993, Hofferer et al. foram os primeiros a testar um FSH eqüino separado por cromatografia. Eles descreveram um procedimento de purificação utilizando a cromatografia de interação hidrofóbica sobre uma matriz de sefarose para a separação das frações de FSH e de LH, e

reportaram que o preparado continha aproximadamente quatro vezes mais FSH que LH. Entretanto, com este protocolo de separação, os autores não conseguiram uma melhora na taxa de ovulação em comparação ao extrato de pituitária cru.

Palmer et al. (1993) conseguiram uma taxa de ovulação de 2,8 ± 0,4 por ciclo, mas não melhoraram a taxa de produção embrionária (0,6 embriões por égua), com uma fração de eFSH contendo 12,5% de FSH e 3% de LH. Eles concluíram que a fertilidade por ovulação diminuiu nas éguas superovuladas (20%) comparado com os ciclos controle (60%). Para estes resultados, eles pronunciaram três hipóteses para explicar a redução da fertilidade: a) falha do folículo em liberar o oócito no momento da ovulação; b) produção de oócitos de baixa qualidade que não podem ser fertilizados, e c) fertilização normal seguida por uma morte embrionária precoce.

A administração diária de 750μg de FSH eqüino purificado, não modificou o tempo de crescimento folicular, mas, aumentou a taxa de ovulação, 1,59 versus 1,09 do grupo controle, e induziu duplas e triplas ovulações em 50% dos ciclos (Remy et al., 1997). Em relação à recuperação embrionária, a taxa por coleta tendeu a ser maior após o tratamento (0,47 versus 0,19), mas, em relação ao número de ovulações, não diferiu (0,26 para eFSH e 0,22 para o controle).

Os trabalhos que fornecem os melhores resultados baseiam-se na administração de uma dose diária de 25 mg de eFSH, em uma única aplicação (Rosas et al., 1998) ou fracionada em duas aplicações (Alvarenga et al., 2003; Machado et al., 2003).

Rosas et al. (1998) compararam a eficácia da administração diária de 25 mg de uma fração enriquecida do hormônio folículo estimulante eqüino (feFSH) com o extrato de pituitária eqüina, começando no sexto dia pós ovulação. O número de aplicações (7,6 versus 8,0), o intervalo entre o início do tratamento e a primeira ovulação (10,4 versus 10,2), a proporção de éguas com múltiplas ovulações (0,8 versus 0,8), e o número médio de ovulações por égua tratada (4,6 versus 3,6) foram similares entre os dois tratamentos (feFSH versus E.P.E., respectivamente). Porém, os dois tratamentos tiveram significativamente mais ovulações que o grupo controle não tratado, que apresentou apenas uma ovulação por égua.

Em relação à recuperação embrionária, os dois tratamentos foram efetivos e similares, recuperando-se dois embriões por égua, em comparação aos 0,4 embriões para o grupo controle. Mas, a proporção de embriões recuperados por ovulação não foi afetada pelos tratamentos, visto que recuperou-se 0,36, 0,53 e 0,4 embriões por ovulação para os grupos tratados com feFSH, E.P.E. e controle, respectivamente.

Machado et al. (2003) também compararam o tratamento superovulatório realizado com duas aplicações diárias de 25 mg de E.P.E., ou com duas aplicações diárias de 12 mg de FSH eqüino, iniciado no nono dia do diestro. No sétimo e oitavo dia pós-ovulação, as éguas de ambos os grupos receberam uma dose de $PGF_{2\alpha}$. O número de ovulações por égua foi semelhante nos dois tratamentos, 3,4 e 4,2 para os grupos que receberam E.P.E. e FSH eqüino respectivamente, mas superiores ao grupo controle não tratado. O número de embriões recuperados por égua também foi semelhante entre os dois grupos, mas apenas o tratamento com FSH eqüino obteve recuperação superior ao grupo controle: 2,2 embriões por égua para o grupo FSH, 1,0 para o E.P.E. e 0,4 para o grupo controle. A taxa de recuperação embrionária por ovulação e a taxa de crescimento folicular não diferiram entre os dois grupos tratados e o controle.

Alvarenga et al. (2003) confirmaram os dados de Machado et al. (2003) ao superestimularem éguas com duas injeções diárias de 12 mg de FSH eqüino purificado, obtendo quatro ovulações e dois embriões em média por égua.

Recentemente, Niswender et al. (2004) testaram o FSH eqüino em éguas durante o período transicional e conseguiram em média 2,5 ± 1,7 ovulações por égua, sendo que 62,5% (5/8) das éguas que ovularam apresentaram múltiplas ovulações (≥ 2 ovulações).

Objetivos

Os objetivos deste experimento foram:

- Avaliação da eficácia do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) exógeno na antecipação da estação reprodutiva em fêmeas eqüinas doadoras de embriões, que encontram-se na fase transicional de primavera;

- Averiguação da propriedade do eFSH em induzir uma resposta superovulatória em éguas na fase de transição de primavera;

- Acompanhamento do desenvolvimento folicular das éguas submetidas ou não ao tratamento com eFSH;

- Determinação da concentração sangüínea de progesterona, no dia da coleta de embriões, em animais submetidos a um processo superovulatório ou com ovulações únicas;

- Certificação da viabilidade de embriões eqüinos oriundos de um tratamento superovulatório;

- Verificar a continuidade da ciclidade após o tratamento com eFSH.

Material e Método

1. ANIMAIS

1.1. Seleção e Manejo das Éguas

Foram utilizadas 21 éguas mestiças e 07 éguas da raça Mangalarga, de 3 a 15 anos, que apresentavam bom estado corporal e peso compreendido entre 300 e 500 kg.

O aparelho reprodutivo das éguas, útero e ovários, foi examinado por palpação retal e ultra-sonografia previamente ao início do experimento. Todos os animais encontravam-se na fase de anestro ou no início da fase de transição de primavera (folículos menores que 25 mm) e não apresentavam qualquer alteração detectável por estes exames, que determinasse um quadro de subfertilidade ou de infertilidade.

As éguas foram mantidas sob sistema de criação extensiva em piquetes de pasto nativo, tendo livre acesso a bebedouro coletivo e a suplementação mineral. Diariamente cada égua recebeu 2 kg de ração peletizada, formulada para animais em manutenção, apresentando 12% de proteína bruta em sua composição.

1.2. Garanhão

Foram utilizados os ejaculados de um único garanhão da raça Árabe, de 19 anos de idade, com fertilidade comprovada. O garanhão permaneceu durante todo o experimento no Departamento de Reprodução Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP.

1.2.1. Coleta e avaliação seminal

O sêmen foi colhido através de uma vagina artificial modelo Botucatu (Papa & Alvarenga, 1987), sendo imediatamente avaliado sobre os seguintes aspectos: volume (ml), motilidade total subjetiva (%), concentração (10^6/ml), pH, osmolaridade (mOsm) e exame da integridade da membrana plasmática através do teste osmótico (%) (Dell'Aqua et al., 2002) e da coloração supravital. As avaliações dos ejaculados foram condizentes com um sêmen de boa qualidade.

2. FASE EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido durante os meses de setembro a dezembro de 2003, no setor de Eqüideocultura, da Fazenda Edgárdia, pertencente a UNESP, no município de Botucatu (Latitude 22^{o}52'S; Longitude 48^{o}27'W; Altitude 825m), estado de São Paulo.

Os ovários e o útero das éguas eram escaneados diariamente, pela manhã, com auxílio de um ultra-som Pie-Medical, modelo 450 com transdutor linear de 5,0 MHz. Uma vez detectado ao menos um folículo, de diâmetro médio de 25 mm, as éguas eram destinadas, alternadamente, a um dos dois grupos experimentais: controle ou tratamento.

2.1. Grupo Controle

O grupo controle foi composto por 14 éguas que encontravam-se no período de transição de primavera. O primeiro dia da detecção de um ou mais folículos de 25 mm foi determinado como sendo o primeiro dia do controle para a égua em questão. A partir deste momento, o desenvolvimento folicular foi acompanhado com intervalo máximo de 72 horas até que fosse observado um folículo com diâmetro igual ou superior a 30 mm, quando então o acompanhamento folicular tornou-se diário.

As éguas foram inseminadas artificialmente, pré – ovulação, em dias alternados, a partir da detecção de um folículo com diâmetro igual a 35 mm e até o momento em que fosse certificada a ovulação. Utilizou-se sêmen fresco, diluído na proporção de 1:1 em meio extensor a base de leite desnatado (K75)[1], desenvolvido pelo Departamento de Reprodução Animal – FMVZ – UNESP/ Botucatu. A dose inseminante continha no mínimo 500 x 10^{6} de espermatozóides móveis.

Com o objetivo de se induzir a ovulação, a partir da detecção do folículo pré – ovulatório (≥ 35 mm) e da observação de edema uterino apropriado, foi administrado, via endovenosa, 2.500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Vetecor – 5000 UI®)[2].

O dia da detecção da ovulação foi determinado como dia zero (D0).

---

[1] Papa, F.O. (Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu). Trabalho não publicado, 2003.

[2] Vetecor 5000UI ®- Laboratórios CALIER do Brasil Ltda, S.P.

2.2. Grupo Tratamento

Igualmente ao grupo controle, o grupo tratamento foi formado por 14 éguas de características já relatadas. A partir da detecção de um ou mais folículos com diâmetro mínimo de 25 mm, iniciou-se o tratamento com Hormônio Folículo Estimulante Eqüino (eFSH®)[3], e este dia foi denominado como o primeiro dia de tratamento.

Os animais foram tratados com 12,5 mg de eFSH®, via intramuscular, duas vezes por dia, sendo que a primeira aplicação do dia foi realizada em horário compreendido entre 7h30 e 8h30 da manhã, e a segunda aplicação entre 17h e 18h. Este protocolo experimental foi executado até que a maioria dos folículos atingisse um tamanho pré - ovulatório (≥ 35 mm); momento em que se suspendeu a aplicação do eFSH® e instituiu-se tratamento para a indução da ovulação, com a aplicação de 2.500 UI de hCG, via endovenosa.

A partir da indução da ovulação, as éguas foram inseminadas com intervalo máximo de 48 horas. Assim como no grupo controle, utilizou-se sêmen fresco diluído, na proporção de 1:1 em meio extensor a base de leite desnatado (K75). A dose inseminante continha no mínimo um bilhão (1.000×10^6) de espermatozóides móveis.

O acompanhamento da dinâmica do(s) folículo(s) foi efetuado diariamente por ultra-sonografia até a detecção da(s) ovulação (ões), e o dia da ovulação foi determinado de dia zero (D0).

2.3. Método de recuperação embrionária

A recuperação embrionária foi realizada entre o sétimo (D7) e oitavo (D8) dia após a detecção da ovulação, para os animais de ambos os grupos.

No dia da coleta do(s) embrião (ões) as éguas foram examinadas por palpação retal, determinando-se as condições de tensão uterina e cervical, e realizou-se exploração ultra-sonográfica via transretal do útero e ovários, para se avaliar o aspecto do útero e do(s) corpo(s) lúteo(s), e para se detectar a possível presença de folículos de diestro.

Posteriormente, mantendo-se as éguas devidamente contidas em tronco de palpação, a região perineal das mesmas foi higienizada com água e sabão.

Para o procedimento da técnica de coleta dos embriões utilizou-se uma sonda de Foley modelo Bivona®[4]. Após a introdução via transcervical, com mão enluvada, o balonete

[3] eFSH – Bioniche Animal Health Inc., Canadá (www.equinefsh.info)
[4] Bivona Medical Technologies, Gary, IN, EUA.

("cuff") localizado no ápice da sonda foi inflado com 45 ml de ar, de forma a ficar fixado na abertura cervical e impedir o refluxo do meio infundido no útero. Realizou-se a infusão de um litro, por lavado uterino, de solução de Ringer com Lactato de Sódio[5] (Alvarenga et al., 1993) aquecido a 37°C, o qual foi drenado do útero por gravidade, passando por um filtro de embriões de 75μm. Realizou-se um total de três e quatro lavados uterinos nas éguas do grupo controle e tratamento, respectivamente.

Após a realização dos lavados o conteúdo do filtro foi substituído por uma solução de manutenção DPBS modificado[6] (solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco-modificado), com o intuito de fornecer aos embriões um melhor ambiente enquanto fosse realizado o rastreamento dos mesmos. Em seqüência, o conteúdo do filtro foi transferido para uma placa de Petri 100 x 20 com o fundo demarcado e o filtro foi lavado com 20 ml de DPBS, utilizando uma pressão, que foi realizada com auxílio de uma seringa de 20 ml conectada a uma agulha 30 x 10, de modo a remover todo o conteúdo do filtro para dentro da placa.

2.4. Avaliação e classificação embrionária

O rastreamento dos embriões foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10 vezes, e a classificação embrionária utilizando-se aumento de 40 vezes. Após a identificação, os embriões foram transferidos para uma solução de HAM F-10 modificado com BSA[7], e nesta, eles permaneceram até o momento das análises posteriores. A identificação do estágio de desenvolvimento e a classificação embrionária foram realizadas conforme McKinnon & Squires (1988).

A imagem dos embriões foi obtida e fotografada mediante microscópio invertido, com o intuito de se realizar uma posterior mensuração.

2.5. Análise da viabilidade embrionária

Embriões, de ambos os grupos, foram incubados em solução de DPBS com 0,4% de BSA, acrescida de 125μg/ml de sonda fluorescente iodeto de propídeo (IP)[8] durante 10 minutos. Em seguida, foram transferidos para uma gota, sobre lâmina histológica, contendo solução de 10μg/ml de HOECHST 33342[9], sendo cobertos por lamínula e examinados

[5] J.P. Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, S.P.
[6] Nutricell Nutrientes Celulares Ltda, Campinas, S.P.
[7] Nutricell Nutrientes Celulares Ltda, Campinas, S.P.
[8] Iodeto de Propídeo – Sigma Chemical CO., St. Louis, USA.
[9] Bisbenzimide 33342 10mg/ml – Sigma Chemical CO., St. Louis, USA

imediatamente em microscópio invertido de fluorescência Leica® (filtro azul 535 e 617 nm). Os blastômeros que fluoresceram coloração azul, foram àqueles corados pela solução de HOECHST e foram considerados viáveis, em virtude da coloração dos cromossomos; e os blastômeros que fluoresceram vermelho, foram corados pela solução de IP e foram considerados inviáveis, devido à coloração dos ácidos nucléicos.

Através da contagem do número de células mortas presentes nos embriões, em seus diferentes estágios de desenvolvimento, foi avaliada a viabilidade embrionária.

2.6. Determinação sangüínea de progesterona

No dia estabelecido para a realização da coleta dos embriões, realizou-se coleta de sangue, através de punção venosa, com auxílio de sistema de "Vacuntainer" para a obtenção de soro. As amostras foram centrifugadas e o soro foi identificado e devidamente armazenado a –16^{o}C até que a concentração de progesterona fosse determinada por radioimunoensaio (Kit de Progesterona Coat-A-Count)[10].

2.7. Manejo após a coleta de embriões

Após o procedimento da coleta de embriões, as éguas foram tratadas com 7,5 mg (1,5 ml) de Dinoprost Trometamina (Lutalyse)[11], via intramuscular. As éguas que foram submetidas ao tratamento superestimulatório receberam uma segunda dose de prostaglandina no dia subseqüente a coleta.

O ciclo seguinte, dos animais de ambos os grupos, foi acompanhado até a ocorrência da próxima ovulação, que também foi induzida com a administração de hCG.

[10] Progesterona CAC – Diagnostic Products CO Medlab, São Paulo, S.P.
[11] Lutalyse – Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda, Paulínia, S.P.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Sigma Stat 2,0 – Jandel.

Comparações do número de ovulações e de embriões recuperados por égua, e de embriões recuperados por ovulação, entre os grupos, foi realizada pelo teste t. Os intervalos entre o início do tratamento/controle e o folículo pré-ovulatório, início do tratamento/controle e primeira ovulação, e entre a administração de $PGF_{2\alpha}$ e a segunda ovulação, também foi analisado pelo teste t de Student. Para estudo das correlações entre o número de folículos no início do tratamento e o número de ovulações, e entre o número de ovulações e a concentração sangüínea de progesterona, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. O estudo da dinâmica folicular foi realizado através da análise de regressão.

A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

1. ANTECIPAÇÃO DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA

Para as análises estatísticas foram considerados 14 animais do grupo tratamento e 13 animais do grupo controle. Um animal foi excluído após 60 dias da sua inclusão no grupo controle.

Para a análise da eficiência do eFSH em acelerar o início da estação reprodutiva foram considerados os seguintes fatores: a) o intervalo, em dias, entre a detecção do primeiro folículo igual ou superior (≥) a 25 mm e o primeiro folículo ≥ 35 mm; b) o intervalo, em dias, entre a detecção do primeiro folículo ≥ 25 mm e a primeira ovulação.

O número de dias necessário para a segunda ovulação, após a coleta de embriões, também foi analisado com o intuito de se verificar se os animais continuaram ciclando normalmente após o tratamento, ou seja, não retornaram à fase de transição.

Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e Figura 1, e as informações individuais dos animais, de ambos os grupos, podem ser consultadas nos Apêndices A (controle) e B (tratamento).

Tabela 1 – Intervalo em dias (média ± desvio padrão) entre o 1º folículo ≥ 25 mm até o desenvolvimento do 1º folículo ≥ 35 mm e até a ocorrência da 1ª ovulação, e, intervalo (média ± desvio padrão) entre a coleta de embrião e administração de $PGF_{2}\alpha$ e a 2ª ovulação, para as éguas submetidas ou não ao tratamento com eFSH.

	CONTROLE	**TRATAMENTO**
Nº de éguas (n)	13	14
Intervalo folículo ≥ 25 - ≥ 35 mm (dias)	14,92 ± 10,80 [a]	4,14 ± 0,95 [b]
Intervalo folículo ≥ 25 mm – ovulação (dias)	18,00 ± 11,08 [c]	6,57 ± 1,22 [d]
Intervalo coleta embrião - 2ª ovulação (dias)	10,92 ± 3,50[e]	22,36 ± 17,46[f]

Valores na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente.
[a,b] (p = 0,001); [c,d] (p< 0,001); [e,f] (p = 0,029)

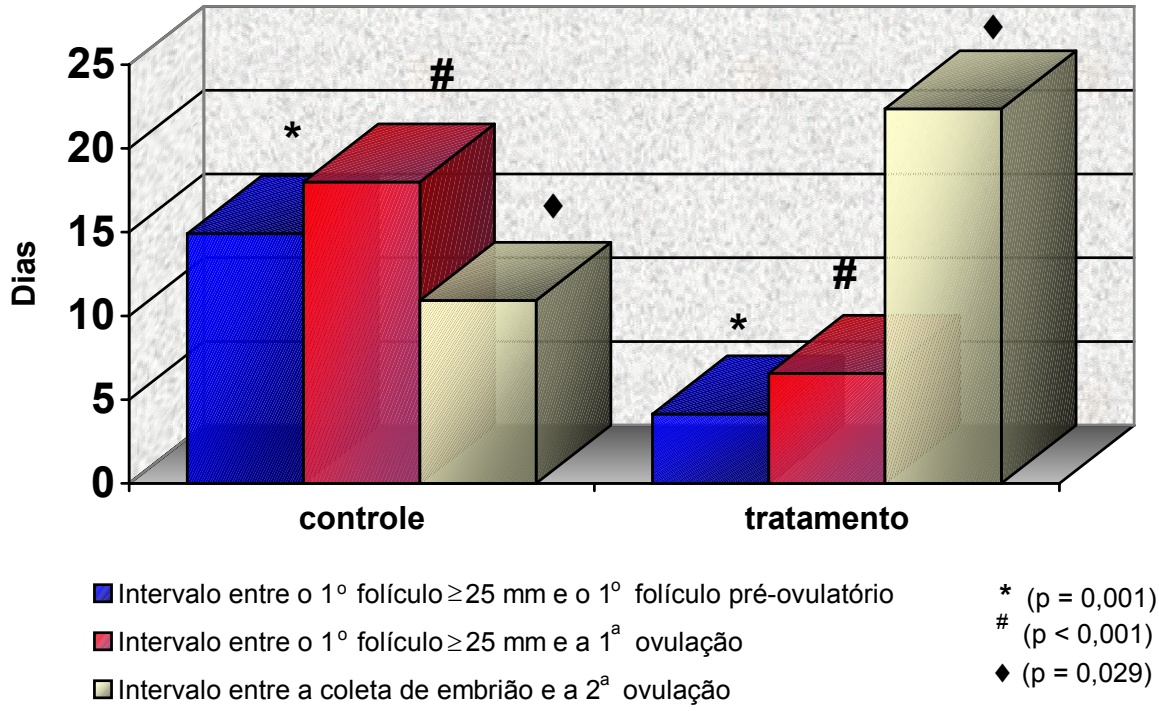


Figura 1 - Intervalo em dias (média ± desvio padrão) entre o 1º folículo ≥ 25 mm até o desenvolvimento do 1º folículo ≥ 35 mm e até a ocorrência da 1ª ovulação, e, intervalo (média ± desvio padrão) entre a coleta de embrião e administração de $PGF_{2\alpha}$ e a 2ª ovulação, para as éguas submetidas ou não ao tratamento com eFSH.

O intervalo máximo para a ocorrência da segunda ovulação da estação reprodutiva, para o grupo controle, foi de 17 dias após a realização da coleta de embrião, sendo a média de 10,92 dias. No grupo tratado, 11 das 14 éguas também ovularam até 17 dias após a recuperação embrionária; contudo, três éguas (21,43% dos animais), ovularam num intervalo superior a trinta dias: 36, 58 e 64 dias.

O intervalo médio entre a administração da prostaglandina $F_{2\alpha}$ e a segunda ovulação para o grupo submetido ao tratamento foi de 22,36 dias, com uma amplitude de 12 a 64 dias. Se excluirmos os três animais, que apresentaram um intervalo superior a 30 dias para a ocorrência da segunda ovulação, calculamos uma média de 14,09 dias e desvio padrão igual a 1,38. Após a exclusão dos três valores, continuamos a observar que existe uma diferença significativa em relação ao grupo controle ($p = 0,01$), porém com um menor desvio padrão.

Em relação à indução da ovulação, aproximadamente 85% e 93% dos animais do grupo controle e tratamento, respectivamente, ovularam num período compreendido entre 36 e 48 horas após a administração de 2.500 UI de hCG.

2. SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA

O período médio de tratamento foi de 4,79 dias e foi eficiente, para a superestimulação e conseqüente superovulação, para 85,71% (12/14) das éguas tratadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Período de tratamento (dias), resposta ovulatória (número de ovulações/égua e porcentagem de éguas com múltiplas ovulações) e recuperação de embriões e/ou oócitos, em éguas submetidas ao tratamento com eFSH, em comparação ao grupo controle não-tratado, durante a fase de transição de primavera.

	GRUPO	
	CONTROLE	**TRATAMENTO**
Nº de éguas (n)	13	14
Nº de dias de tratamento (dias)	-	4,79 ± 1,07
Ovulações por égua (média ± DP)	1,00 ± 0,00 [a]	5,57 ± 4,54 [b]
Éguas com ≥ 2 ovulações (%)	0 (0,00%)	12 (85,71%)
Total de embriões recuperados (n)	09	28
Embriões recuperados		
Por égua (média ± DP)	0,69 ± 0,48 [c]	2,00 ± 1,80 [d]
Por ovulação (média ± DP)	0,69 ± 0,48	0,44 ± 0,41
Total de oócitos recuperados (n)	0	6
Estruturas recuperadas (embriões + oócitos)		
Por égua (média ± DP)	0,69 ± 0,48 [e]	2,43 ± 2,03 [f]
Por ovulação (média ± DP)	0,69 ± 0,48	0,59 ± 0,45

Valores na mesma linha, com letras diferentes, diferem estatisticamente.
[a,b] (p = 0,001); [c,d] (p = 0,018); [e,f] (p = 0,006)

Nas figuras 2 e 3 observamos os ovários direito e esquerdo de éguas submetidas ao tratamento com eFSH.

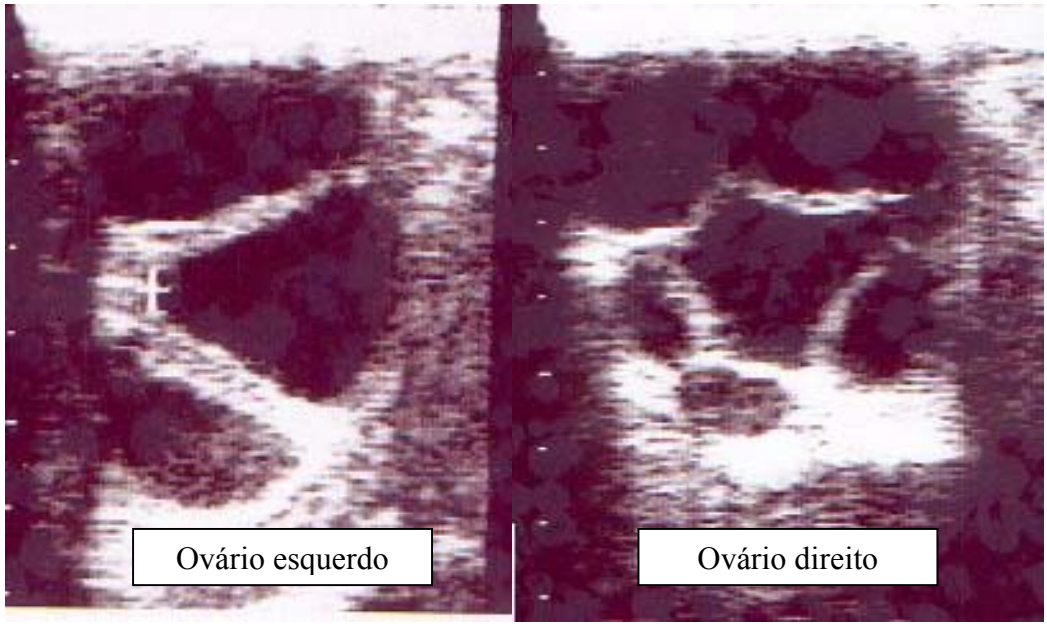


Figura 2 - Imagem ultra - sonográfica dos ovários esquerdo e direito de uma égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (4º dia de tratamento).

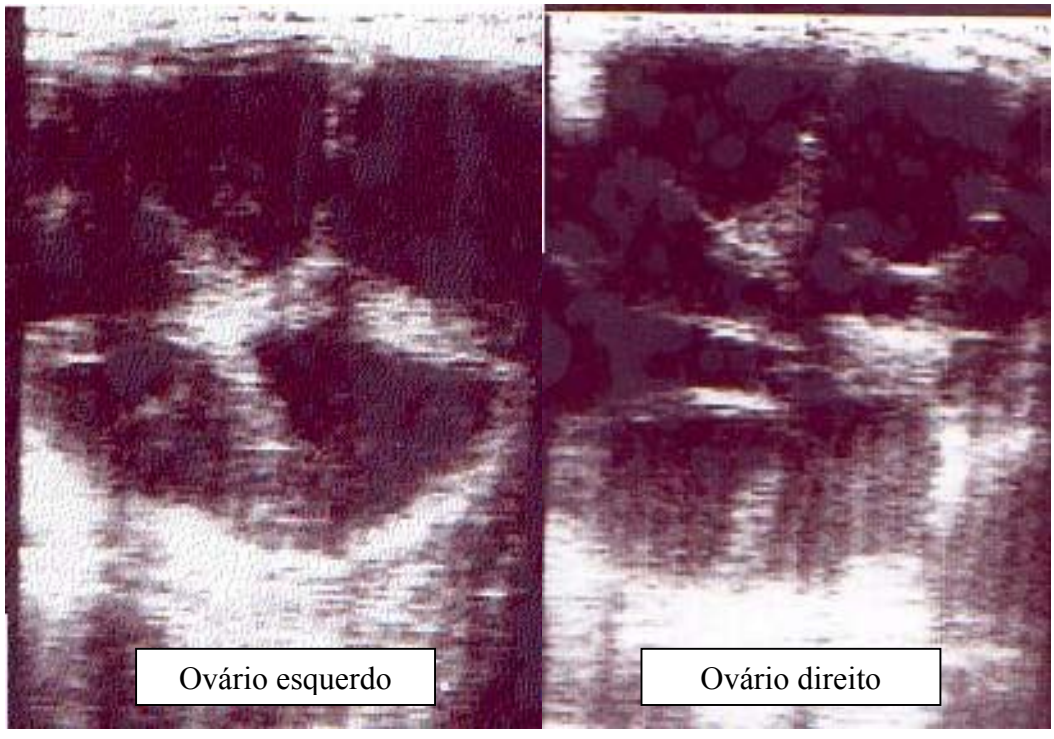


Figura 3 - Imagem ultra - sonográfica dos ovários esquerdo e direito de uma égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (6º dia de tratamento).

Em média foram recuperados dois embriões por égua tratada, o que foi significativamente superior (p = 0,018) aos 0,69 embriões recuperados por égua no grupo controle. O número médio de estruturas recuperadas (embriões mais oócitos) também foi superior nas éguas tratadas (Tabela 2).

Foram recuperadas seis estruturas não fertilizadas (oócitos) nas coletas realizadas nos animais do grupo tratamento, apesar de ser reconhecido o evento de retenção de estruturas não fertilizadas no oviduto das éguas (McKinnon & Voss, 1993). Em uma das coletas, identificou-se apenas um oócito degenerado e nenhum embrião, enquanto que, os outros cinco oócitos foram recuperados junto com embriões. No grupo controle, nenhum oócito foi identificado.

O gráfico com a taxa de recuperação embrionária e total de estruturas (embriões + oócitos), para o grupo controle e tratado, está representado na Figura 4.

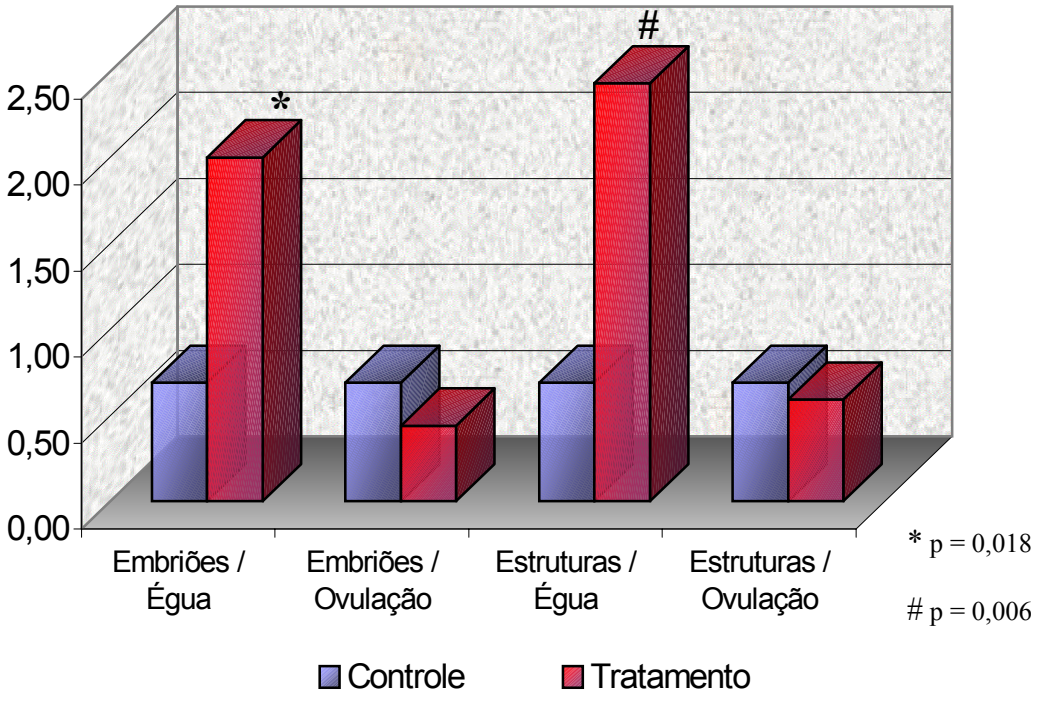


Figura 4 – Número médio de embriões e de estruturas (embriões + oócitos) recuperadas, por égua e por ovulação, para animais submetidos ou não ao tratamento com eFSH.

Após a instituição do tratamento com eFSH, os animais não responderam de maneira homogênea à superestimulação. Duas éguas (14,29%) não responderam ao tratamento e tiveram apenas uma ovulação. Três éguas (21,43%), em contrapartida,

apresentaram uma superestimulação com dez, doze e dezessete ovulações cada. A maioria (64,29%), nove animais, apresentou de duas a seis ovulações.

O número de dias de tratamento foi significativamente inferior (p = 0,021) para os animais que não responderam a superestimulação (tiveram apenas uma ovulação) em comparação aos animais que responderam (tiveram no mínimo duas ovulações). Não foi observada diferença estatística entre estes animais, em relação a recuperação de embriões e de oócitos. Os dados referentes ao período de tratamento, à recuperação embrionária e ao total de estruturas, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Período de tratamento (dias) e taxa de recuperação embrionária e de estruturas (embrião + oócito) de animais que responderam ou não ao tratamento superestimulatório com eFSH (média ± desvio padrão).

Animais submetidos ao tratamento com eFSH	Não responderam = 1 ovulação	Responderam ≥ 2 ovulações
Número de éguas (%)	2 (14,29)	12 (85,71)
Dias de tratamento *	3,25 ± 0,35 [a]	5,04 ± 0,92 [b]
Embriões recuperados por égua	0,00 ± 0,00	2,33 ± 1,72
Estruturas recuperadas por égua	0,50 ± 0,71	2,69 ± 1,93

Valores na mesma linha, com letras diferentes, diferem estatisticamente. [a,b] (p = 0,021)
* O tratamento foi realizado até que a maioria dos folículos em desenvolvimento atingi-se um diâmetro ≥ 35 mm.

Quando excluímos os animais que não responderam ao protocolo de superestimulação, ou seja, tiveram ovulação única, nos restam animais que apresentaram uma resposta superovulatória e que ovularam de dois a seis folículos, e animais que responderam de forma intensa, com dez ou mais ovulações. Os dados referentes às ovulações, dias de tratamento e de recuperação embrionária, destas duas categorias de animais, estão sumarizados na Tabela 4.

Não observamos diferença significativa em relação ao período de tratamento, ao número de embriões e ao total de estruturas recuperadas por égua, comparando-se as éguas que tiveram de duas a seis ovulações e àquelas que tiveram dez ou mais ovulações detectadas. Entretanto, quando comparamos o número total de embriões e de estruturas (embriões mais oócitos) recuperadas em relação ao número de ovulações, observamos significativamente uma menor recuperação nas éguas que responderam intensamente, como pode ser observado na Tabela 4 e Figura 5.

Tabela 4 - Resposta superovulatória (período de tratamento, número médio e total de ovulações) e recuperação de embriões e estruturas (embriões + oócitos) obtida de éguas tratadas com eFSH, durante o período de transição de primavera, que responderam de maneira moderada ou intensa.

Parâmetros	2 a 6 ovulações	≥ 10 ovulações
Número de animais (%)	9 (64,29%)	3 (21,43%)
Período de tratamento (dias)	5,00 ± 1,06	5,17 ± 0,29
Número total de ovulações (n)	37	39
Média de ovulações (média ± DP)	4,11 ± 1,36	13,00 ± 3,61
Número total de embriões (n)	24	4
Recuperação de embriões por égua (média ± DP)	2,67 ± 1,80	1,33 ± 1,15
Embriões por ovulação (média ± DP)	0,65 ± 0,36 [a]	0,11 ± 0,10 [b]
Número de oócitos recuperados (n)	5	0
Recuperação de estruturas por égua (média ± DP)	3,22 ± 2,05	1,33 ± 1,15
Estruturas por ovulação (média ± DP)	0,77 ± 0,37 [c]	0,11 ± 0,10 [d]

Valores na mesma linha, com letras diferentes, diferem estatisticamente.
[a,b] (p = 0,001); [c,d] (p < 0,001)

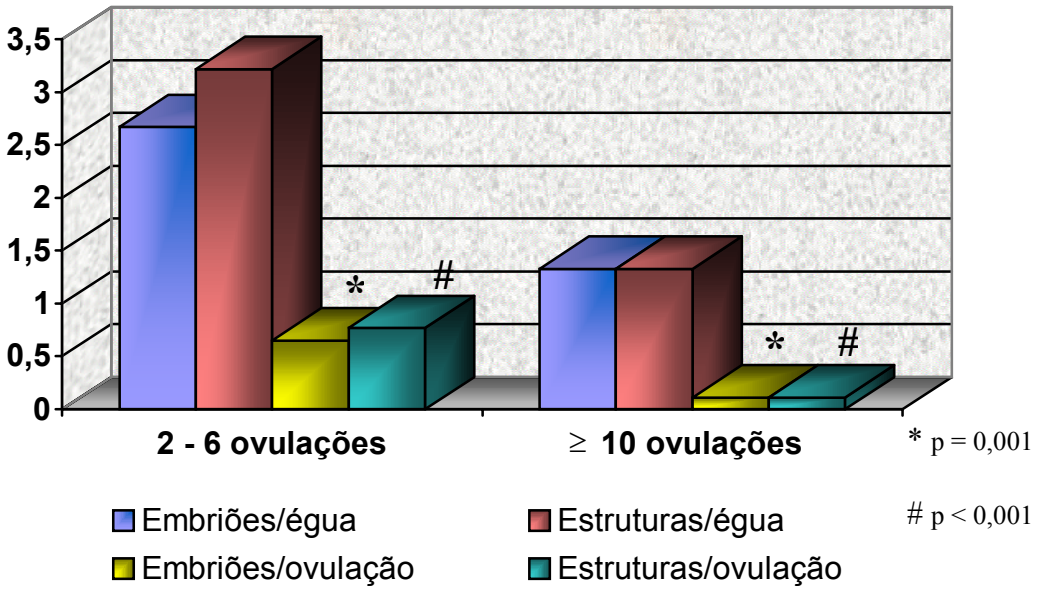


Figura 5 - Relação da recuperação embrionária e de estruturas, por égua e por ovulação: dados referentes aos animais que responderam ao protocolo superestimulatório com eFSH.

3. ASPECTOS DA DINÂMICA FOLICULAR

A população folicular existente no primeiro dia do tratamento foi registrada, sendo posteriormente correlacionada com o número observado de ovulações. Podemos observar na Tabela 5 que não houve qualquer correlação entre o número de folículos, distribuídos em quatro categorias de acordo com seu tamanho, e o número de ovulações. A população folicular presente no primeiro dia de tratamento, de cada égua tratada, pode ser consultada no Apêndice B.

Tabela 5 - Correlação entre o número de folículos de 10-14,9; 15-19,9; 20-24,9 e 25-29,9 mm no início do tratamento com eFSH e o número de ovulações.

Diâmetro Folicular	Coeficiente de correlação (r)	Valor de p
10 – 14,9 mm	0,51	0,14
15 – 19,9 mm	0,49	0,09
20 – 24,9 mm	0,33	0,25
25 – 29,9 mm	- 0,19	0,51

Observando a população folicular presente no dia da indução da ovulação e as ovulações, conseguimos perceber que todos os folículos que apresentavam diâmetro médio igual ou superior a 28 mm no dia da administração do hCG culminaram em ovulação, exceto um folículo de 30 mm, que regrediu. As observações estão demonstradas no Quadro 1. Nestes dados foram excluídas as ovulações de uma égua, pelo fato dela não ter respondido à aplicação do hCG, ou seja, ovulou após as 48 horas previstas.

Quadro 1- Observação da ocorrência de ovulação, nos animais tratados com eFSH, relacionado com o diâmetro folicular observado no dia da aplicação do hCG.

Diâmetro Folicular (mm)	N° total	Ovularam	Não-ovularam
Menores de 26 mm	> 60	0	>60
26 – 26,9	1	1	0
27 – 27,9	2	0	2
28 – 28,9	7	7	0
29 – 29,9	5	5	0
30 – 30,9	4	3	1
Maiores de 31 mm	56	56	0

O crescimento folicular foi acompanhado até o dia da indução da ovulação com hCG, pois, a determinação do diâmetro folicular de cada um dos folículos, principalmente nas éguas que apresentaram uma intensa resposta ao tratamento, levaria a uma grande margem de erro.

A distribuição das ovulações do grupo submetido ao tratamento pode ser consultada no Apêndice C.

Após a detecção da ovulação, realizou-se uma análise de forma retroativa do crescimento folicular. Desta maneira, calculamos o crescimento médio diário dos folículos até a indução da ovulação, isto é, quando ainda havia uma interferência do eFSH exógeno. Para padronizarmos o período de crescimento, para os folículos do grupo controle também foi calculado o crescimento até a data da aplicação do hCG.

As taxas de crescimento folicular médio observado nas éguas dos grupos controle e tratamento, estão demonstradas no Quadro 2 e na Figura 6.

A dinâmica do crescimento dos folículos, do grupo controle, que culminaram em ovulação estão evidenciadas na Figura 7. As figuras 8 a 13, exemplificam a seqüência de crescimento de todos os folículos que chegaram à ovulação em seis éguas que foram submetidas ao tratamento com eFSH.

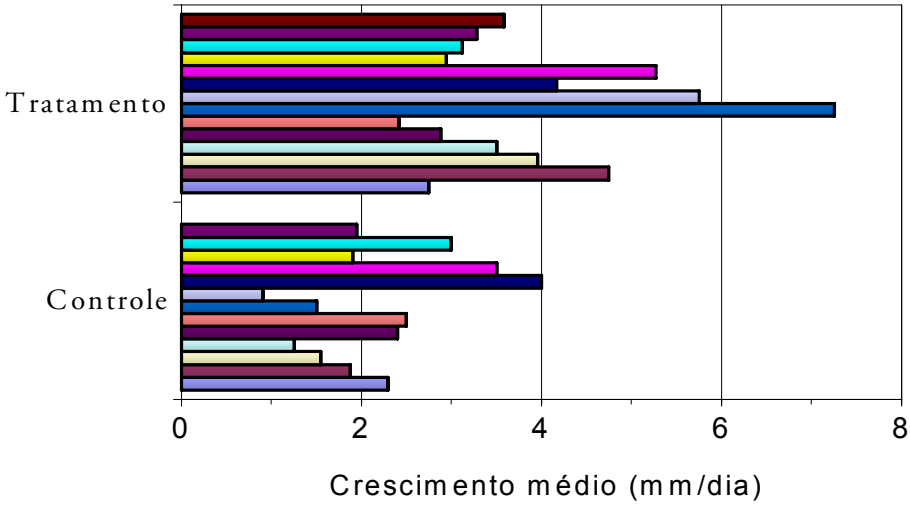
A figura 14 demonstra o crescimento folicular médio de todos os folículos, ao longo do tempo, que chegaram à ovulação nos grupos controle e tratamento.

A taxa de crescimento folicular médio observado no grupo controle foi de 2,19 mm diários, com desvio padrão igual a 0,86. Os valores determinados através do exame ultra-sonográfico obedeceram a um padrão de crescimento linear na análise de regressão ($y = 1,88x + 40,82$; $r^2 = 0,96$), como demonstrado na Figura 14.

Não foi possível realizar uma comparação direta entre o grupo controle e o grupo de éguas tratadas com eFSH. Conforme demonstrado na Figura 14, o crescimento folicular para o grupo tratado foi mais lento nos primeiros dias de tratamento (até aproximadamente o dia –6), aumentando durante os últimos dias antes da ovulação (dia –6 até a ovulação). Assim, o crescimento deu-se de forma polinomial ($y = 0,34x^2 + 5,55x + 44,11$; $r^2 = 0,98$).

Quadro 2– Crescimento folicular médio (mm/dia) observado nos animais do grupo controle e tratamento.

GRUPO CONTROLE			**GRUPO TRATAMENTO**		
Égua	**Nº de folículos**	**Crescimento médio (mm/dia)**	**Égua**	**Nº de folículos**	**Crescimento médio (mm/dia)**
09	1	2,29	40	1	5,75
13	1	1,88	41	1	4,17
14	1	1,90	33	2	2,88
15	1	1,55	39	2	7,25
19	1	1,25	31	4	3,50
29	1	3,00	36	4	2,42
32	1	2,40	163	4	3,12
34	1	2,50	20	5	4,75
37	1	1,50	49	5	2,94
38	1	0,91	734	5	3,28
735	1	4,00	18	6	2,75
898	1	1,95	27	10	3,96
902	1	3,50	162	12	3,58
			42	17	5,27



OBS: cada barra representa uma égua.

Figura 6- Taxa de crescimento folicular médio (mm/dia) observada nos animais do grupo controle e tratamento.

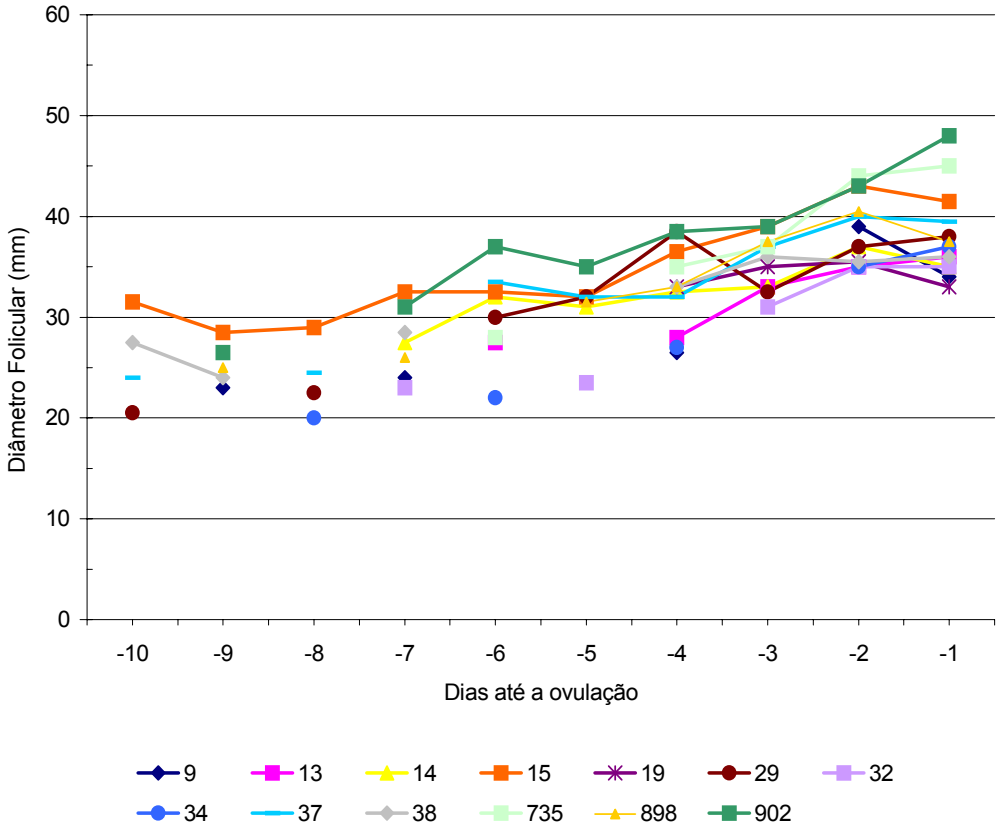
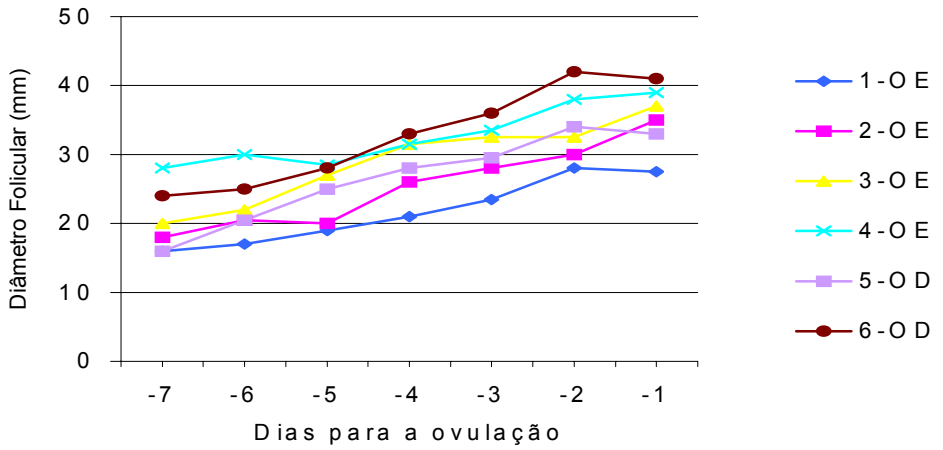
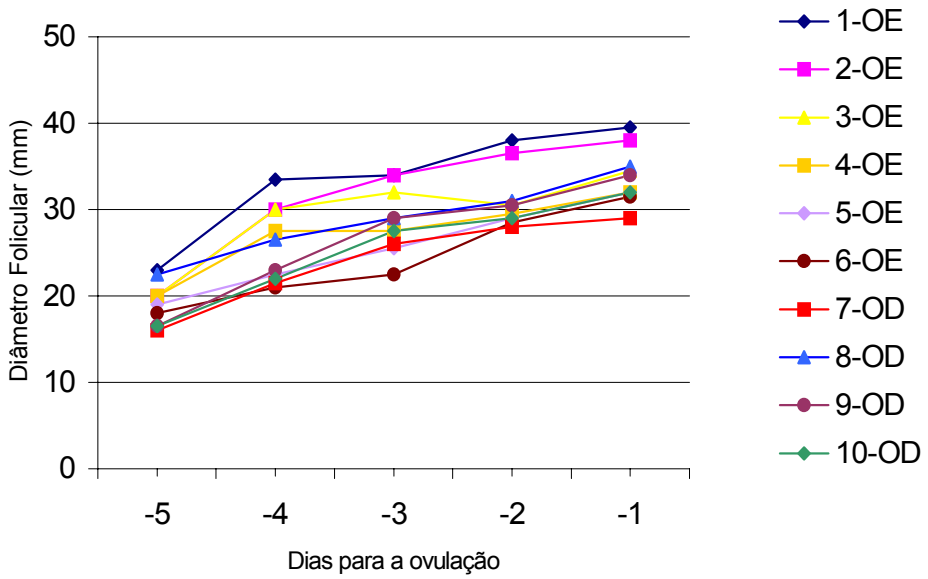


Figura 7 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação no grupo controle (os números da legenda identificam o número das éguas).



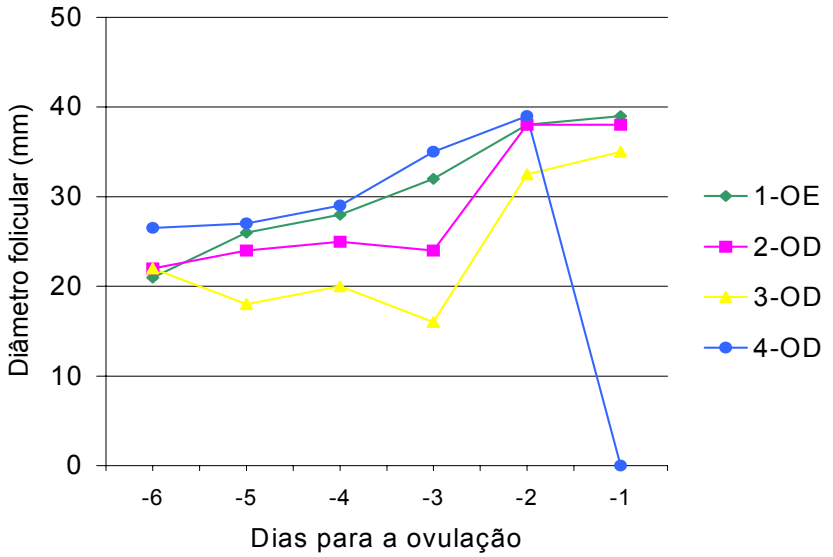
OBS: Início do tratamento: dia –7; Administração do hCG: dia - 2

Figura 8 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 18).



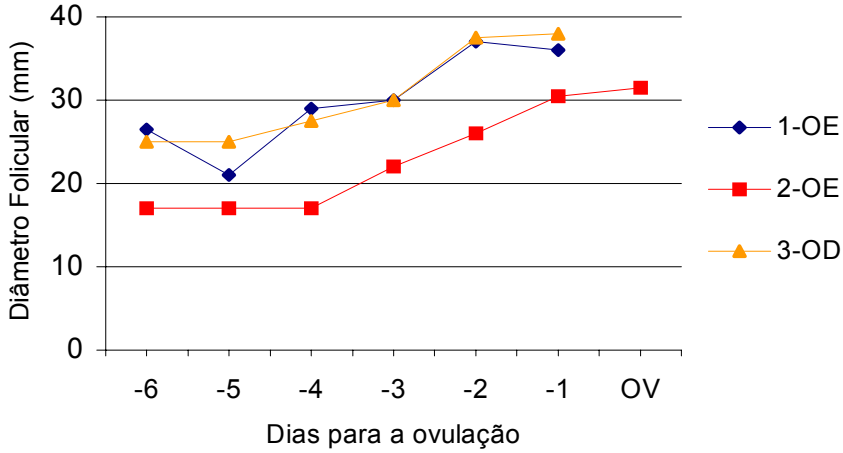
OBS: Início do tratamento: dia –7; Administração do hCG: dia –2

Figura 9 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 27).



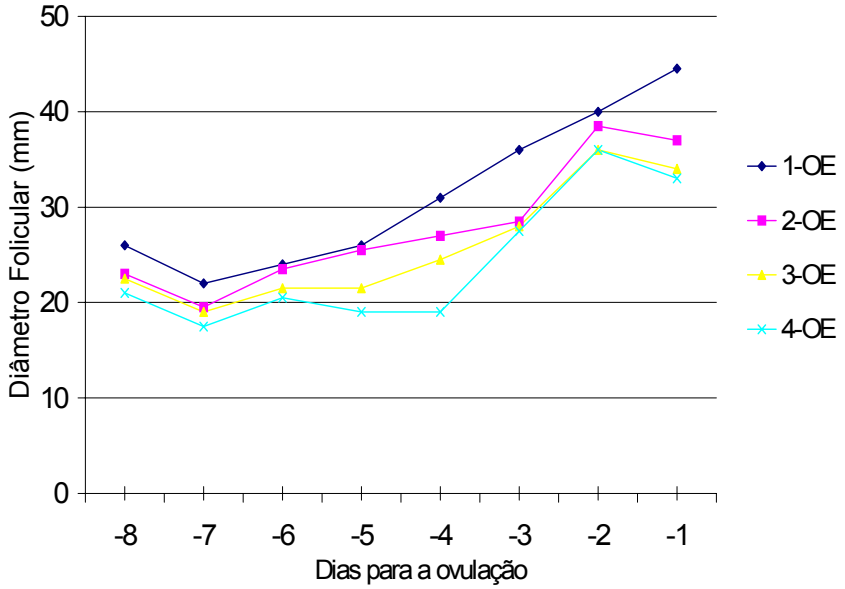
OBS: Início do tratamento: dia –6; Administração do hCG: dia –2.
O folículo denominado de 4-OD ovulou após 12 horas da administração do hCG.

Figura 10 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 31).



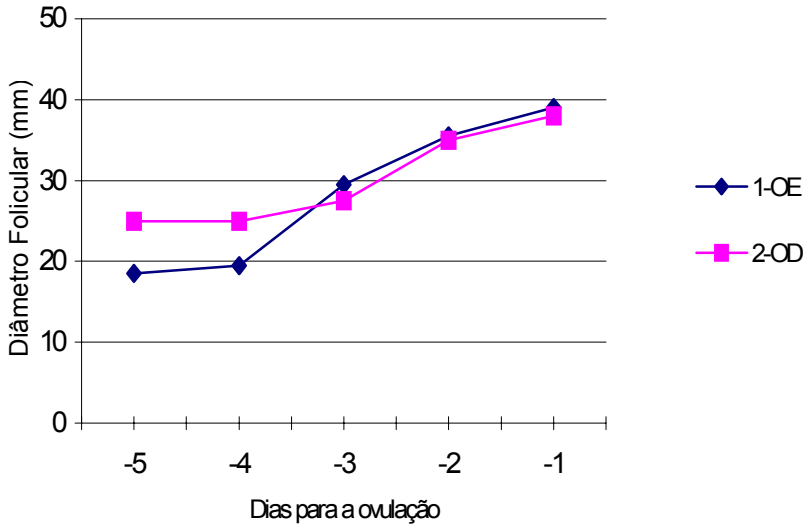
OBS: Início do tratamento: dia –6; Administração do hCG: dia –2
O folículo denominado 2-OE não culminou em ovulação.

Figura 11 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 33).



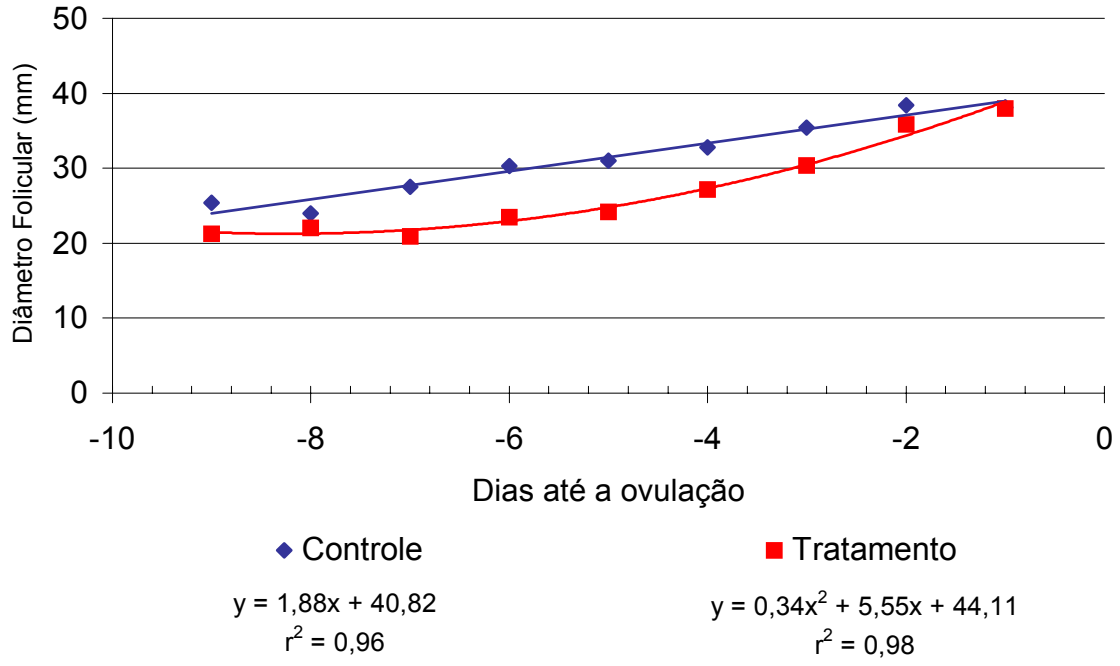
OBS: Início do tratamento: dia –8; Administração do hCG: dia –2

Figura 12 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 36).



OBS: Início do tratamento: dia –5; Administração do hCG: dia –2

Figura 13 - Dinâmica dos folículos que culminaram em ovulação em égua submetida ao tratamento com eFSH, durante a transição de primavera (égua 39).



Sendo que: y = diâmetro folicular; x = - (dias que faltam para a ovulação);
r^2 = porcentagem de folículos que obedecem à curva de regressão.

Figura 14 - Crescimento folicular médio observado no grupo controle não-tratado e no grupo tratado com eFSH.

4. CLASSIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO EMBRIONÁRIA

Após a coleta embrionária, os embriões foram rastreados e imediatamente classificados de acordo com o seu grau de desenvolvimento: em mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx), e de acordo com o seu grau de qualidade: grau 1= excelente, grau 2 = bom, grau 3 = regular, grau 4 = ruim, grau 5 = degenerado (McKinnon & Squires, 1988).

Foram recuperados nove embriões no grupo controle, sendo dois (22,22%) Bi, três (33,33%) Bl e quatro (44,44%) Bx. Das 13 coletas, 2 foram realizadas oito dias após a detecção da ovulação e uma após sete dias e meio, recuperando-se blastocistos expandidos.

Recuperou-se 28 embriões no grupo tratado, sendo uma mórula (3,57%), cinco (17,86%) Bi, oito (28,57%) Bl, onze (39,29%) Bx e três embriões degenerados (10,71%) onde não foi possível identificar o seu estágio de desenvolvimento. Uma Mo, um Bl, três Bx e os três embriões degenerados foram recuperados em coletas realizadas no oitavo dia após a detecção da ovulação e, um Bl e três Bx em uma coleta realizada com sete dias e meio após a ovulação.

A porcentagem de embriões recuperados no sétimo dia após a detecção da ovulação, para ambos os grupos, de acordo com o seu grau de desenvolvimento embrionário, está representada na Figura 15.

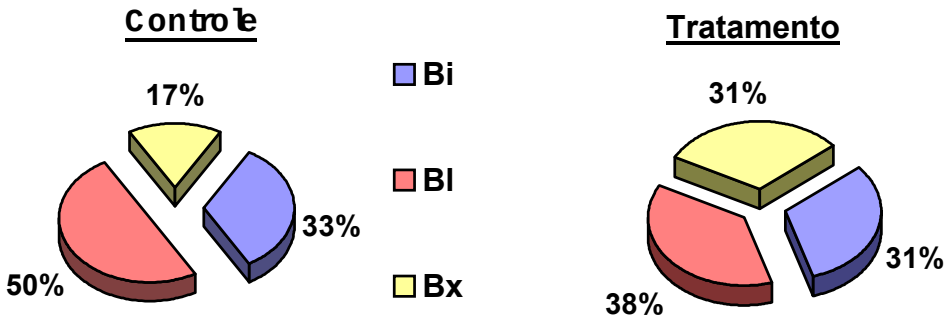


Figura 15 – Taxa de recuperação embrionária (D7), de acordo com o grau de desenvolvimento dos embriões, em éguas do grupo controle e do grupo tratado com eFSH.

O diâmetro dos embriões recuperados, no sétimo dia após a ovulação, foi aferido e comparado entre os grupos controle e tratamento de acordo com o seu grau de desenvolvimento. Não observamos diferença significativa entre os grupos, como pode ser constatado na Tabela 6.

Tabela 6 - Diâmetro médio (μm) de embriões coletados no D7, conforme o seu estágio de desenvolvimento.

Estágio embrionário	CONTROLE		TRATAMENTO	
	Nº emb.	Média ± DP	Nº emb.	Média ± DP
Bi	2	288,5 ± 125,1	5	296,0 ± 58,2
BI	2	535,5 ± 87,0	7	460,7 ± 40,3
Bx	2	730,0 ± 56,6	8	758,8 ± 146,7

$p > 0,1$

Embriões oriundos do grupo controle podem ser vistos nas Figuras 16 e 17, e embriões oriundos de éguas submetidas ao tratamento com eFSH nas Figuras 18 e 19.

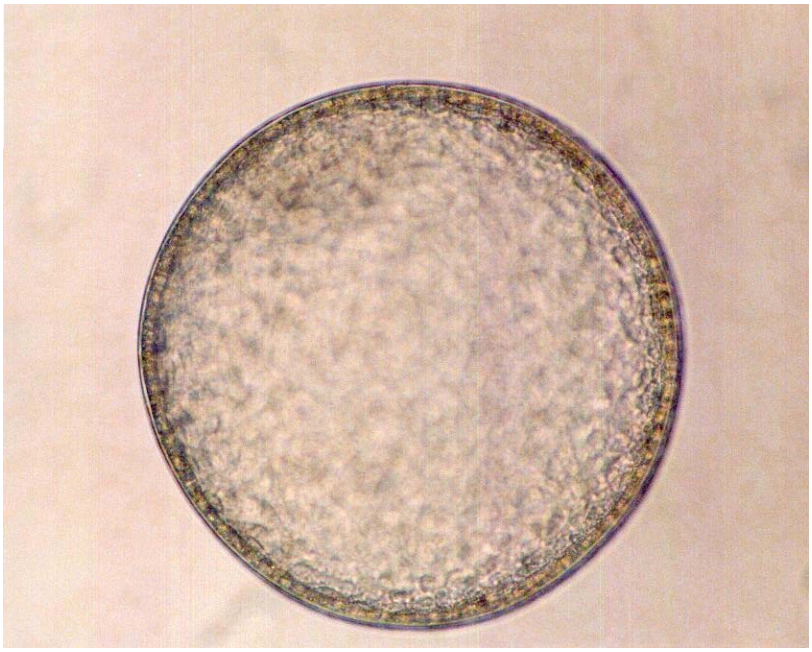


Figura 16 – Blastocisto (BIG1) oriundo de ovulação única - grupo controle (égua 898).



Figura 17 – Blastocisto expandido (BxG1) oriundo de ovulaçao única – grupo controle (égua 38).

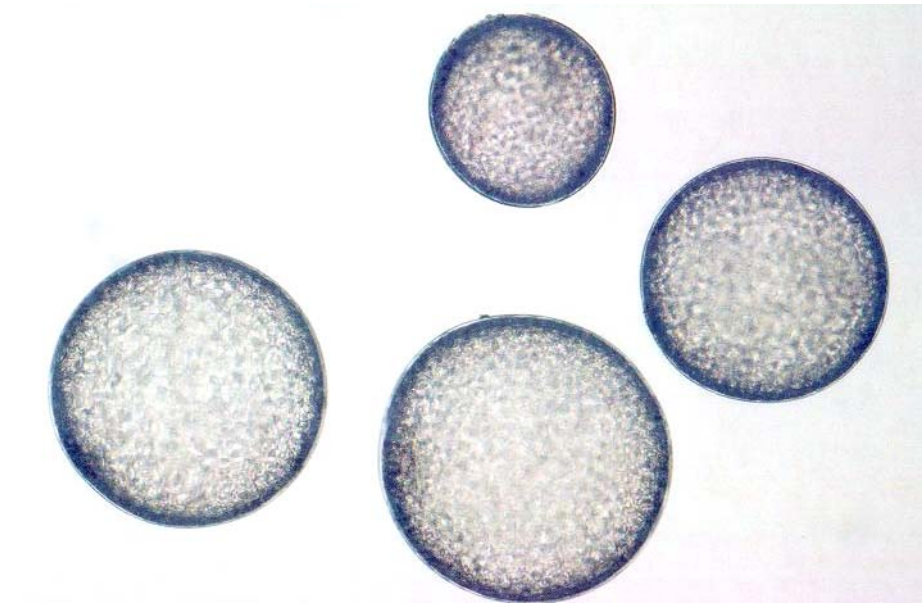


Figura 18- Embriões oriundos de égua submetida ao tratamento superovulatório com eFSH (égua 163).

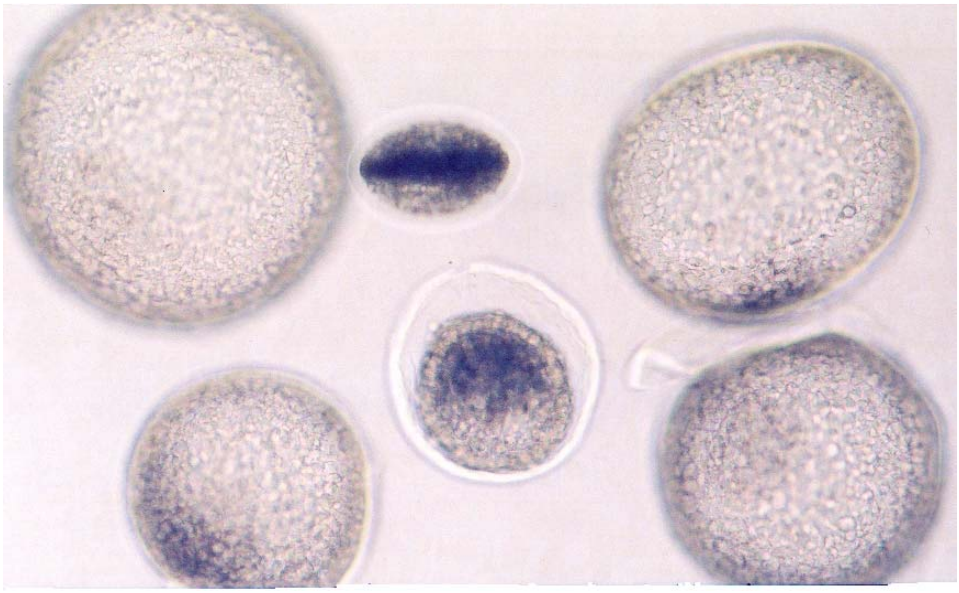


Figura 19 - Embriões e oócito oriundos de uma égua submetida a tratamento superovulatório com eFSH (égua 18).

Após a classificação embrionária, conforme o seu estágio de desenvolvimento, os embriões foram observados para a determinação da sua qualidade (Grau 1 a 5) e alguns foram corados aleatoriamente, conforme explicado anteriormente, para se determinar a viabilidade dos mesmos.

Dos nove embriões coletados no grupo controle, oito (88,88%) foram classificados como grau 1-1,5 e apenas um (11,11%) como grau 2-2,5. No grupo tratamento, dos 28 embriões coletados, 21 (75%) foram classificados como grau 1-1,5; 4 (14,28%) como grau 2-2,5 e três (10,71%) como grau 5 ou degenerado (Quadro3).

Quadro 3 - Distribuição dos embriões coletados do grupo controle e tratamento conforme o seu grau de qualidade.

Classificação	CONTROLE	TRATAMENTO
1 – 1,5	8 (88,88%)	21 (75,00%)
2 – 2,5	1 (11,11%)	4 (14,28%)
5 (degenerado)	0	3 (10,71%)
Não – fertilizado (oócito)	0	6
Total	9	34

Sete embriões do grupo controle foram corados, sendo observadas no máximo dez células coradas de vermelho (inviáveis). Dez embriões do grupo tratamento também foram corados, sendo observadas no máximo seis células lesadas, em seis embriões, aproximadamente 150 células lesadas em um embrião, e a confirmação da inviabilidade dos três embriões degenerados. Outros embriões também foram corados, entretanto, como visualmente eles sofreram algum prejuízo entre a coleta e o processo de coloração, estes dados não foram considerados.

Portanto, através do exame visual por microscópio estereoscópico (lupa) e classificação (grau 1 a 5), conforme McKinnon e Squires (1988), todos os embriões (9/9) do grupo controle; e 89,3% (25/28) dos embriões oriundos do tratamento superovulatório foram considerados viáveis.

E através da coloração indicativa de viabilidade, detectamos que todos (100%) os embriões do grupo controle (7/7) e 70% (7/10) do grupo tratamento estavam viáveis.

Embriões corados do grupo controle estão demonstrados nas Figuras 20 e 21, e embriões do grupo tratado, nas Figuras 22 a 26.

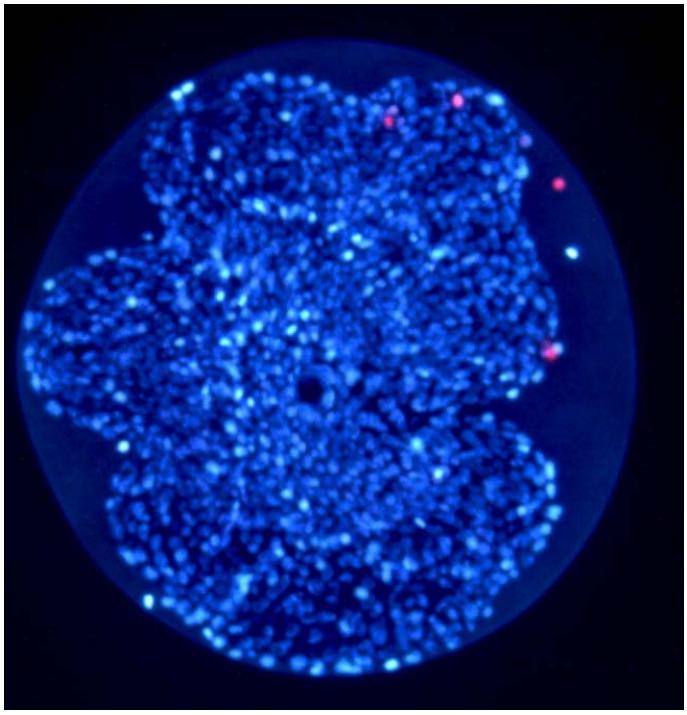


Figura 20 - Blastocisto corado com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo - grupo controle.

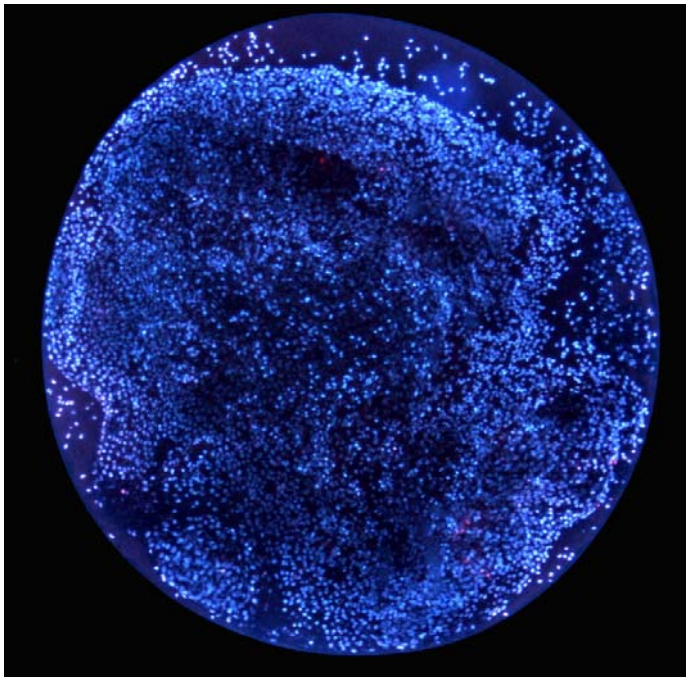


Figura 21 - Blastocisto expandido corado com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo – grupo controle.

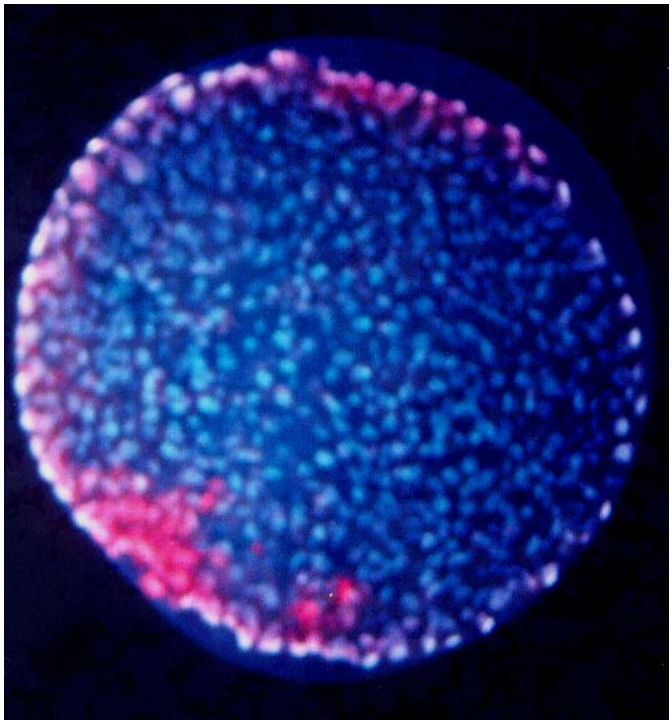


Figura 22 **-** Blastocisto (BIG2) corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo, proveniente de tratamento superovulatório com eFSH (égua18).

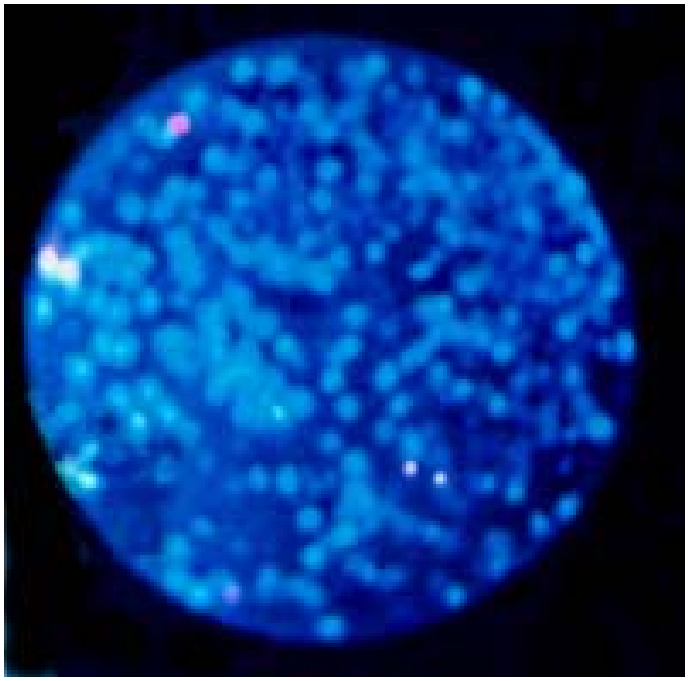


Figura 23 - Blastocisto (BIG1) obtido por tratamento superovulatório com eFSH e corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo (égua 39).

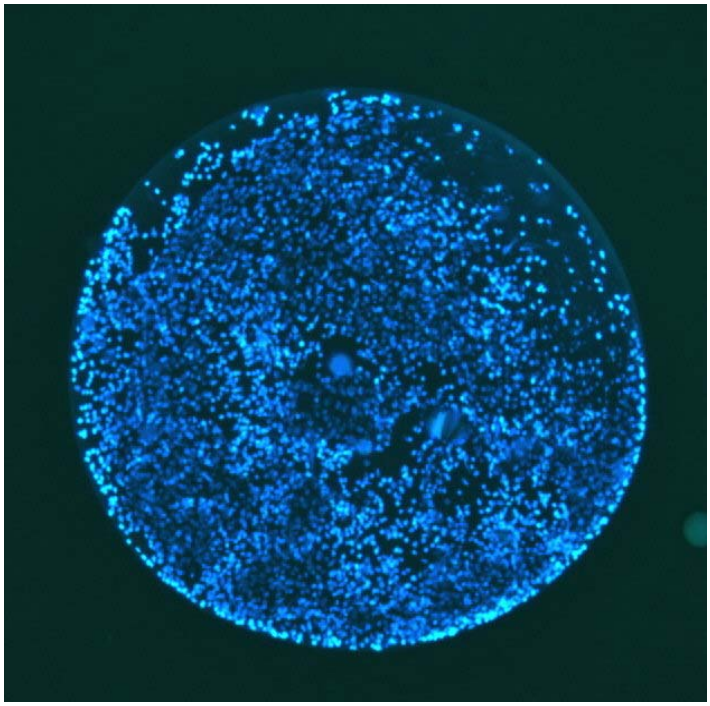


Figura 24 - Blastocisto expandido (BxG1) corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo oriundo de processo superovulatório com eFSH (égua 39).

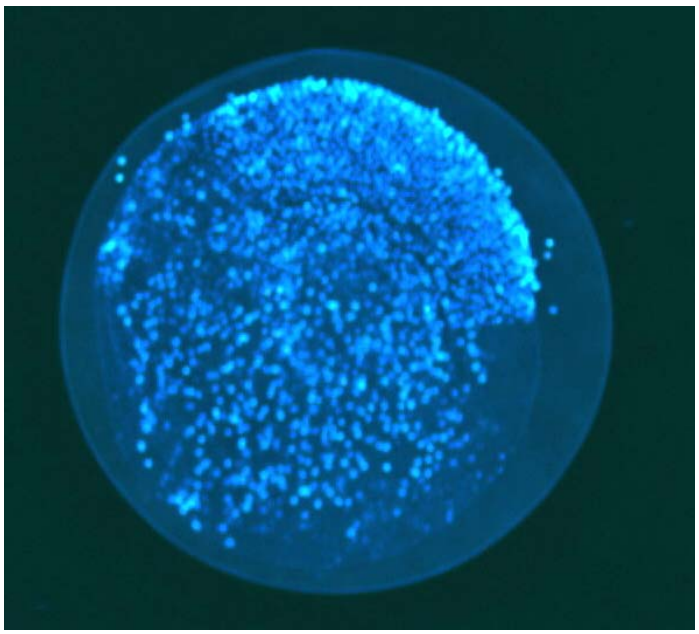


Figura 25 - Blastocisto expandido (BxG1) corado com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo proveniente de tratamento superovulatório com eFSH (égua 33).

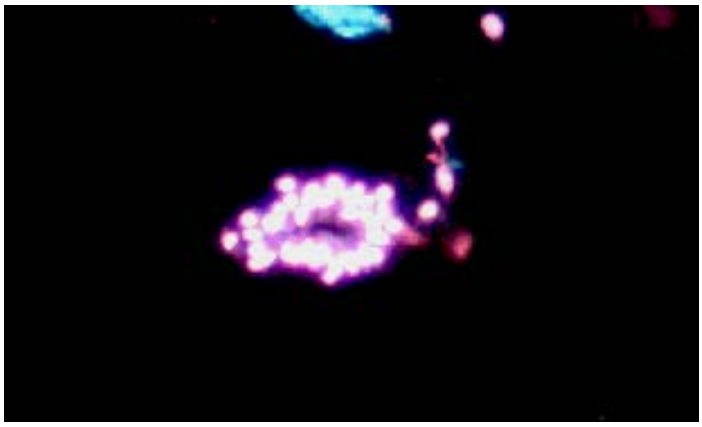


Figura 26 - Embrião degenerado corado com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo proveniente de tratamento superovulatório com eFSH (égua 36).

5. DETERMINAÇÃO SÉRICA DA PROGESTERONA

A concentração de progesterona no dia da coleta de embrião (D7 – D8) está positivamente correlacionada com o número de ovulações, como demonstrado na Tabela 7 e na Figura 27. Os valores individuais das concentrações podem ser consultados no Apêndice D. O valor de uma égua do grupo tratamento (égua 40) não foi utilizada para a análise, visto que ela apresentou uma ovulação de diestro.

Tabela 7 - Efeito do número de ovulações sobre a concentração sérica de progesterona determinada no dia (D7-8) da recuperação embrionária em éguas não-tratadas (controle) e tratadas com eFSH no período de transição de primavera.

Ovulações (n)	Éguas (n)	Concentração de progesterona (ng/ml)
1 (controle)	13	7,39 ± 2,11
1 (tratamento)	1	8,02 ± 0,00
2	2	14,53 ± 2,46
4	3	18,44 ± 2,57
5	3	24,38 ± 11,03
6	1	44,00 ± 0,00
10	1	24,90 ± 0,00
12	1	38,49 ± 0,00
17	1	45,00 ± 0,00
Correlação	r = 0,855	p < 0,001

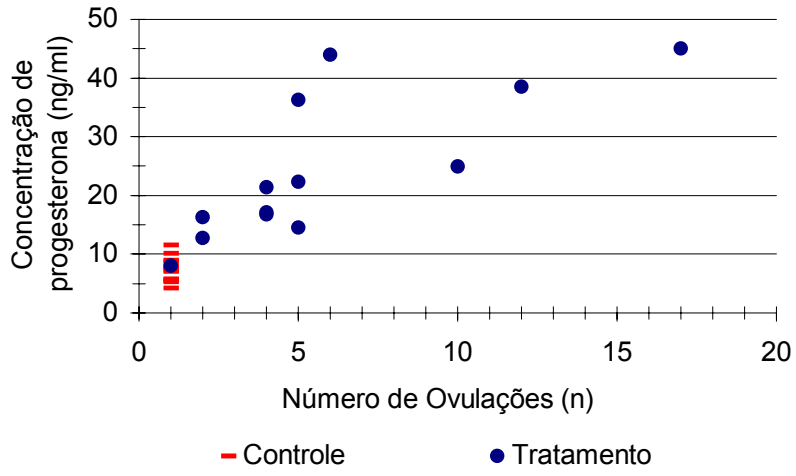


Figura 27 - Correlação entre o número de ovulações e a concentração sérica de progesterona (D7-8) em éguas não-tratadas (controle) e tratadas com eFSH no período de transição de primavera.

Discussão

Confrontando os dados dos animais do grupo controle com os animais do grupo tratado com eFSH®, observamos que houve uma antecipação significativa da ocorrência do primeiro folículo pré-ovulatório, em aproximadamente treze dias, e da primeira ovulação, em aproximadamente onze dias, quando os animais foram submetidos ao tratamento a partir da detecção do primeiro folículo com diâmetro igual ou superior a 25 mm. Niswender et al. (2004) foram os primeiros a demonstrarem que o eFSH® poderia ser utilizado para este fim. Porém, várias outras técnicas para se acelerar o início da estação reprodutiva, já foram relatadas com sucesso.

O uso do fotoperíodo artificial é o método mais conhecido e utilizado, sendo divulgado desde a década de 40 (Burkhardt, 1946), mas são necessários de 60 a 90 dias de exposição à luz artificial para se induzir a ovulação na maioria das éguas (Scraba & Ginther, 1985), e ainda assim, as éguas passam por um período de transição.

Desde 1974, relata-se que é possível fazer uso do extrato de pituitária eqüino para induzir a ovulação em éguas durante a estação anovulatória (Douglas et al., 1974; Lapin & Ginther, 1977; Woods & Ginther, 1982; Hofferer et al., 1991; Coy et al., 1999). A partir da mesma época, o GnRH e seus agonistas também têm sido utilizados com sucesso como indutores da ovulação durante a estação anovulatória (Ginther & Wentworth, 1974; Garcia & Ginther, 1975; Evans & Irvine; 1977; Evans & Irvine, 1979; Johnson, 1986, 1987; Allen et al., 1987; Fitzgerald et al., 1987b; Hyland et al., 1987; Palmer & Quellier, 1988; Ginther & Bergfelt,1990). Mais recentemente, também foram relatados sucessos com o uso de antagonistas da dopamina (Besognet et al., 1996,1997; Daels et al., 2000; Brendemuehl & Cross, 2000).

Todas as éguas (14/14) deste experimento, tratadas com eFSH® a partir da detecção de um folículo ≥ 25 mm, ovularam de 5 a 8 dias (média de 6,57 ±1,22) após uma média de 4,79 ± 1,07 dias de tratamento (variação de 3 a 6 dias). Este resultado confirma o exposto por Niswender et al. (2004) que relataram que foram necessários aproximadamente cinco dias (5,2 ± 1,3) de tratamento para que oito das dez éguas, em fase de transição, ovulassem após 7,6 ± 2,4 dias da primeira administração de eFSH®. Os altos índices de ovulação também foram observados por Woods & Ginther (1982) e Coy et al. (1999) com a utilização do E.P.E. Woods & Ginther (1982), induziram a ovulação em 95% das éguas, e Coy et al. (1999) em 89,9% das éguas tratadas durante o período transicional e que exibiam no início do tratamento um folículo ≥ 25 mm. Entretanto, estes autores (Woods & Ginther, 1982; Coy et al., 1999) que utilizaram o E.P.E., demonstraram um maior intervalo entre o

início do tratamento e a ovulação (9,1 e 11,8 dias, respectivamente), em comparação ao intervalo relatado por Niwender et al. (2004) e ao intervalo observado no presente trabalho.

Devemos ressaltar que praticamente todas as experiências com o FSH eqüino purificado, durante a estação ovulatória (Remy et al., 1997; Rosas et al., 1998; Machado et al., 2003; Alvarenga et al., 2003), e o aglomerado de trabalhos que utilizaram o extrato de pituitária durante a estação ovulatória (Squires et al., 1986; Dippert et al., 1994; Rosas et al., 1998; Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002; Machado et al., 2003) ou anovulatória (Woods & Ginther, 1982; Hofferer et al., 1991; Coy et al., 1999), mostraram a necessidade de um maior período de tratamento e conseqüentemente de um maior intervalo para a ocorrência das ovulações, em comparação ao tratamento com o eFSH durante a fase transicional. Isto pode significar que as éguas em período transicional, são mais sensíveis a administração do FSH eqüino, e isto tem por conseqüência uma menor despesa com o tratamento.

Machado et al. (2003) que utilizaram o eFSH durante a estação ovulatória, detectaram a primeira ovulação após 9,0 ± 0,9 dias do início do tratamento; Alvarenga et al. (2003) utilizando protocolo similar, relataram a necessidade de 7,7 dias, em média, de tratamento.

Trabalhos, como os de Woods & Ginther (1982) e Coy et al. (1999), detectaram uma maior efetividade do tratamento com E.P.E. para a indução da ovulação quando o diâmetro do maior folículo, no início do tratamento, era maior ou igual a 25 mm. Quando o folículo atinge este diâmetro, considera-se que a égua está deixando o período de anestro e iniciando a fase transicional (Ginther, 1992). Este foi o momento escolhido para o início da administração do eFSH no presente experimento.

Os estudos com GnRH também demonstram que a situação folicular no início do tratamento pode afetar o resultado. Éguas em transição respondem melhor do que éguas em anestro profundo (Hyland et al., 1987; Ginther & Bergfelt, 1990), não apenas em relação à indução de ovulações, mas, também em consideração a ocorrência de múltiplas ovulações (Ginther & Bergfelt, 1990).

No entanto, Pierson & Ginther (1990) após a supressão do desenvolvimento folicular, realizada com um regime de estrógeno e progesterona, trataram éguas com E.P.E. em quatro momentos diferentes, isto é, a partir do instante em que o maior folículo alcançou 15, 20, 25 ou 30 mm de diâmetro, e observaram uma maior resposta superestimulatória ($p<0,05$) nos dois primeiros grupos (15 e 20 mm) em comparação ao grupo de 30 mm. O grupo de 25 mm não diferiu estatisticamente dos dois primeiros grupos, mas, apresentou resultados intermediários, indicando que em algumas éguas o processo de seleção já havia

ocorrido. No presente estudo, duas das 14 éguas tratadas com eFSH® (14,29%) ovularam apenas um folículo, o que provavelmente deve indicar que nestas éguas o folículo dominante já havia sido selecionado, como discutido por Pierson & Ginther (1990). Além disso, nestas éguas, o primeiro folículo dominante a se desenvolver foi o que culminou em ovulação, o que também vem a confirmar os resultados de Ginther (1990), que afirma que algumas éguas não apresentam um padrão óbvio de atividade folicular durante o período de transição.

Ao mesmo tempo, outros fatores podem ter interferido no início da estação ovulatória e na resposta superovulatória, principalmente a idade (Fitzgerald & McManus, 2000) e a condição corporal (Gentry et al., 2002a). As éguas apresentavam idade (3 a 15 anos), raça (mangalarga ou sem raça definida) e peso (300 a 500 kg) variados, e isto pode ter corrompido os resultados, apesar da distribuição aleatória. Além disso, grande parte dos animais estavam ganhando peso e recuperando a condição corporal neste período. Sumarizando, os resultados obtidos podem servir de embasamento para programas similares que utilizem uma população heterogênea de animais; contudo, não podemos afirmar ou prever que animais com idade, raça, peso e escore corporal similares irão apresentar resultados equivalentes ao exposto.

As éguas deste experimento, como demonstrado, atingiram o primeiro folículo pré-ovulatório (≥ 35 mm) após 4,14 ± 0,95 dias, em média, do início do tratamento; isto ocorreu de forma mais breve e com menor variação em relação ao grupo de éguas não tratadas (14,92 ± 10,80 dias). Enquanto 14 das 14 éguas submetidas ao tratamento, apresentaram um folículo pré-ovulatório em até seis dias, e ovularam em até oito dias, apenas quatro das treze éguas do grupo controle, apresentaram um folículo pré-ovulatório após o mesmo período, e apenas três, ovularam em até oito dias. Porém, Pierson & Ginther (1990) que começaram o tratamento com E.P.E. em seis éguas a partir da detecção do primeiro folículo ≥ 25 mm, detectaram um folículo pré-ovulatório antecipadamente (3,2 dias, em média).

Após a coleta de embriões, as éguas do grupo controle e tratamento, receberam uma e duas doses de $PGF_{2\alpha}$, respectivamente. O intervalo entre a administração do luteolítico após a coleta do(s) embrião(ões) até a segunda ovulação do ano, durou 10,92 ± 3,5 dias, em média, para o grupo controle, e, 22,36 ± 17,46 dias para o grupo de éguas submetidas ao tratamento. Mesmo com duas aplicações de prostaglandina $F_{2\alpha}$, observou-se que o tempo exigido para a lise de todos os corpos lúteos da éguas tratadas, foi maior.

Inicialmente, poderíamos pensar que o grande número de corpos lúteos, obtidos após o tratamento superestimulatório, interferiu na ocorrência da segunda ovulação,

entretanto, Carmo (2003) identificou uma duração semelhante entre os dois ciclos com tratamento superovulatório e o ciclo que sucedeu o segundo tratamento (23,7, 21,5 e 24,1 dias, respectivamente). Portanto, a duração do ciclo estral pós-tratamento parece não sofrer interferência do tratamento superovulatório. Os baixos níveis séricos de LH presentes na fase transicional, então podem ser os responsáveis pela necessidade de um maior período para a ocorrência do segundo ciclo ovulatório. Altos níveis de LH são necessários para o desenvolvimento do tecido luteal (Ginther, 1992), assim, a formação dos corpos lúteos sob baixa quantidade de LH, provavelmente foi prejudicada. Considerando-se esta hipótese, os corpos lúteos ainda não estavam responsivos à prostaglandina $F_{2\alpha}$ no dia da coleta de embriões, retardando o processo de luteólise. Outros estudos são necessários para se determinar o momento adequado para a administração da prostaglandina e conseqüente lise dos corpos lúteos formados durante a fase de transição.

Observando os dados referentes aos animais do grupo controle (Apêndice A), constatamos que o maior intervalo entre a aplicação de $PGF_{2\alpha}$ e a ovulação seguinte, foi de 17 dias. No grupo tratado (Apêndice B), 11 dos 14 animais também demoraram um período máximo de 17 dias entre a primeira administração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ e a ovulação. Apesar de estatisticamente diferente, podemos considerar que 78,57% dos animais submetidos ao tratamento com eFSH tiveram a segunda ovulação até um período máximo igual ao observado no grupo controle. Adicionalmente, estas 11 éguas pertencentes ao grupo tratado, ovularam em um intervalo mais restrito (12 a 17 dias) do que as éguas do grupo controle (4 a 17 dias).

Além do grande número de corpos lúteos provavelmente ter influenciado no tempo necessário para a ocorrência da segunda ovulação, devemos debater que o fato de algumas éguas retornarem ao período transicional, após o tratamento, não é raro. Woods & Ginther (1982) relataram que 50% das éguas tratadas com E.P.E. e que ovularam, não gestaram ou retornaram a condição anovulatória. Ginther & Bergfelt (1990) utilizando um análogo do GnRH para induzir a ovulação em éguas na fase anovulatória, também pronunciaram que quando os folículos são pequenos no início do tratamento, é comum que as éguas retornem ao estado anovulatório após a indução da ovulação. Se o presente tratamento com eFSH tivesse sido iniciado mais precocemente, provavelmente conseguiríamos induzir a ovulação nas éguas, porém, um grande número de animais, e não apenas as três éguas observadas, retornariam à fase transicional.

Alguns trabalhos utilizaram o fotoperíodo artificial em conjunto com outros protocolos de indução da ovulação. A associação entre o fotoperíodo artificial e o eFSH

também deve trazer maiores benefícios, especialmente em locais que já possuam a infra-estrutura necessária para a manutenção das doadoras sob a luz.

Após este experimento, os animais foram utilizados em outro trabalho, por isso, foi administrado hCG para induzir a segunda ovulação em 10 dos 13 animais do grupo controle e, em 12 dos 14 animais do grupo tratado. Visto que estes animais, que não receberam hCG nesta segunda etapa, ovularam dentro do período médio dos respectivos grupos, seus valores não influenciaram os resultados.

Além de antecipar a ocorrência da primeira ovulação do ano, o eFSH® foi avaliado em relação a sua capacidade de promover múltiplas ovulações. O número médio de ovulações por égua tratada (5,57 ± 4,54) foi superior ao relatado por Rosas et al. (1998), Machado et al. (2003) e Alvarenga et al. (2003) que utilizaram o eFSH em éguas ciclando e alcançaram taxas iguais a 4,6, 4,2 e 4,0, respectivamente; e também foi superior ao relatado por Niswender et al. (2004), que obtiveram apenas 2,5 ± 1,7 ovulações por égua, realizando o tratamento durante o período de transição de primavera. No experimento realizado por Niswender et al. (2004) o protocolo foi semelhante ao do presente estudo, entretanto, o hCG foi administrado logo após a detecção do primeiro folículo pré-ovulatório, o que explica os resultados alcançados pelos autores.

Apenas Alvarenga et al. (2001), que utilizaram 25 mg de E.P.E. a cada doze horas, alcançaram uma maior taxa de ovulação por égua (7,1 ± 5,1) em comparação ao presente experimento. Este resultado foi obtido porque duas das oito éguas tratadas, apresentaram um grande número de ovulações (11 e 18 ovulações). Conforme outros trabalhos, que utilizaram diferentes doses e freqüências de administração do E.P.E., o número médio de ovulações por égua foi numericamente inferior, variando de 1,1 a 4,7 (Woods & Ginther, 1984; Woods & Ginther, 1985; Squires et al., 1986; Dippert et al., 1992; Dippert et al., 1994; Rosas et al., 1998; Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002; Machado et al., 2003; Carmo, 2003).

Em relação a recuperação embrionária 10 das 14 éguas (71,43%) tratadas com eFSH® produziram ao menos um embrião, sendo recuperados, em média, 2,0 ± 1,8 embriões (0 – 5) por égua, ou ainda, 2,8 embriões/égua, considerando-se apenas estas dez éguas. Este resultado foi similar ao reportado por Machado et al. (2003) e Alvarenga et al. (2003): 2,2 e 2,0 embriões por égua, respectivamente. Os trabalhos que utilizaram o E.P.E. apresentam resultados mais variados, de 1 a 3,5 embriões por égua (Woods & Ginther, 1984; Squires et

al., 1986; Dippert et al., 1992; Rosas et al., 1998; Alvarenga et al., 2001; Scoggin et al., 2002).

Similarmente ao grupo tratado, nove das treze (69,23%) éguas do grupo controle produziram um embrião. Isto implica que podemos utilizar com sucesso o primeiro ciclo do ano, independentemente do uso de qualquer tratamento promotor da ovulação.

De acordo com os dados que estão sumarizados na Tabela 2, percebemos que houve uma resposta superovulatória em 12 das 14 éguas (85,71%), recuperando-se significativamente mais embriões e/ou estruturas por égua, em comparação ao grupo controle, porém, sem uma diferença significativa na recuperação de embriões e estruturas por ovulação. Independente do protocolo utilizado, todos os autores concordam que a taxa de recuperação embrionária por ovulação é similar ou até inferior (Douglas et al., 1974; Woods & Ginther, 1982; Palmer et al., 1993) a taxa observada em éguas que não foram submetidas a um tratamento superovulatório. Utilizando o eFSH recuperamos apenas 0,44 ± 0,41 embriões por ovulação, que apesar de estatisticamente semelhante, foi numericamente inferior ao grupo controle (0,69 ± 0,48). Remy et al. (1997), Rosas et al. (1998) e Alvarenga et al. (2003) que utilizaram uma fração purificada de FSH eqüino também relataram um pequeno percentual de recuperação embrionária por ovulação (0,26, 0,36 e 0,50 embriões por ovulação, respectivamente). Os tratamentos superovulatórios com E.P.E. também apresentam valores similares aos observados no grupo controle, e igualmente, variados: 0,6 (Woods & Ginther, 1984); 0,57 (Dippert et al., 1994); 0,53 (Rosas et al., 1998); 0,49 e 0,68 (Alvarenga et al., 2001); 0,6 (Scoggin et al., 2002); 0,26 (Machado et al., 2003) e 0,3 (Carmo, 2003).

Várias são as hipóteses supostas para o baixo rendimento na produção de embriões por ovulação: baixa taxa de fertilização (Armstrong, 1993), devido a anormalidades na maturação oocitária (Moor et al., 1985) e a assincronia entre os eventos de maturação do oócito e do folículo (Loos et al., 1991); ocorrência de luteinização ao invés de ovulação; ou ainda falha dos oócitos para entrarem no oviduto (Dippert et al., 1994).

Lapin & Ginther (1977) em seu experimento, demonstraram que apenas 14 dos 24 corpos lúteos observados, mostraram traços na fossa da ovulação, ou seja, nem todos os folículos pré-ovulatórios alcançaram a fossa da ovulação. Segundo eles, a inabilidade de todos os folículos pré-ovulatórios alcançarem a fossa da ovulação e o distúrbio da maturação dos oócitos, pelas grandes quantidades de LH contidas nas altas doses de E.P.E. administradas durante a fase de crescimento folicular, podem ser uma explicação da baixa taxa de recuperação embrionária. Hofferer et al. (1991) também utilizaram os mesmos argumentos em seu experimento. Entretanto, no presente trabalho, e em outros experimentos que utilizaram o

FSH eqüino purificado, não foram administradas altas quantidades de LH, e nem por isso, a recuperação embrionária foi superior.

Posteriormente, os resultados de Dippert et al. (1994), divergiram da hipótese de luteinização, uma vez que eles determinaram que 92,7% dos corpos lúteos formados, após um tratamento superestimulatório, foram provenientes de ovulação. Outra suposição de que provavelmente haveria um contato inadequado entre o infundíbulo e o ovário superestimulado, igualmente foi refutada por Dippert et al. (1994), visto que eles recuperaram um pequeno número de oócitos tanto em éguas com uma ou com múltiplas ovulações.

As causas para a baixa produção embrionária, que possuem maiores álibis, são os distúrbios que afetam a maturação folicular e/ou oocitária e conseqüentemente a qualidade do oócito. Walton & Armstrong (1983) concluíram que oócitos de ratas superovuladas são igualmente hábeis para se desenvolver, entretanto, apresentam maior número de alterações de organelas (Semenov et al., 1986). Hyttel et al. (1991) pronunciaram que 37% dos oócitos recuperados de vacas superovuladas sofreram uma maturação anormal, comparado a um índice de apenas 11% nos animais não-estimulados. Dippert et al. (1994) observaram uma taxa similar de fertilização entre éguas controle e superovuladas; contudo, encontraram uma tendência dos embriões oriundos de éguas superovuladas, apresentarem um desenvolvimento *in vitro* mais avançado em comparação àqueles das éguas controle.

Grande parte das vezes, as éguas ovulam oócitos completamente maduros, isto é, no estágio de metáfase II (Carneiro, 2001), entretanto, alguns oócitos eqüinos podem completar o seu desenvolvimento dentro do oviduto (Scott et al., 2001). Observamos neste experimento que embora as ovulações tenham ocorrido, na maioria das vezes, de forma sincrônica; muitas vezes os embriões estavam em diferentes estágios de desenvolvimento, o que denota que nos processos de superovulação, muitos dos oócitos estão imaturos no momento da ovulação e alguns, talvez, não consigam completar a sua maturação em tempo hábil para serem fertilizados, ou ainda, que degenerem rapidamente após a ovulação (Noyes, 1952).

Bézard et al. (1995) declararam que não há diferença entre o grau de maturação nuclear de oócitos de éguas superovuladas ou não-superovuladas. Portanto, o maior problema deva ser em relação à maturação citoplasmática, que é o momento em que o oócito adquire a capacidade de ser fertilizado e de continuar o seu desenvolvimento como um embrião (Wassarman & Albertini, 1994).

Os resultados sobre índices de gestação também são divergentes, Woods & Ginther (1984) indicaram uma redução da taxa de sobrevivência de embriões provenientes de

tratamento superovulatório (47%) em comparação a taxa obtida com a transferência de embriões oriundos de ovulações únicas e espontâneas (88%). No entanto, Squires et al. (1987b) afirmam que as taxas de prenhez são similares. Também são descritas menores taxas de prenhez após a transferência de embriões de vacas superovuladas (Elsden et al, 1976).

Neste trabalho, recuperamos em uma das éguas submetidas ao tratamento, três embriões que se encontravam em intenso grau de degeneração. Porém, nenhum embrião degenerado foi identificado no grupo controle. Isso pode ser um indício de que alguns oócitos, oriundos de superovulação, asseguram a sua capacidade de sofrerem fertilização, ou seja, são ovulados maduros ou terminam a sua maturação no oviduto, mas, devido a outras deficiências, provavelmente em relação à sua maturação citoplasmática, não conseguem prosseguir com o processo de clivagem e desenvolvimento. Esta suposição pode ajudar a explicar a baixa taxa de recuperação embrionária. No momento da coleta, os embriões podem estar em um grau tão avançado de degeneração que torna-se difícil a sua identificação, e, portanto, não serão computados. Os embriões degenerados que foram encontrados neste estudo, apenas foram identificados categoricamente como embriões, após a sua coloração com Hoescht e Iodeto de Propídeo, e posterior identificação dos blastômeros.

Somando os achados, a baixa taxa de recuperação de embriões por ovulação deve-se provavelmente a um processo de maturação insuficiente demonstrada por alguns oócitos e por graves danos estruturais ou enzimáticos, evidenciados por outros. Estudos de maturação e fertilização *in vitro* (MIV e FIV), de oócitos oriundos de éguas superestimuladas, podem ajudar a esclarecer quais são os pontos críticos para a fertilização e manutenção do desenvolvimento embrionário.

Como exposto, na Tabela 2, foram recuperadas seis estruturas não fertilizadas (oócitos) nas coletas realizadas nos animais do grupo tratamento, apesar de ser reconhecido o evento de retenção de estruturas não fertilizadas no oviduto das éguas (Onuma & Ohnami, 1975; McKinnon & Voss, 1993). A explicação mais lógica é que, provavelmente, estes oócitos foram carreados para o útero em virtude da PGE_2 produzida pelos outro(s) embrião(ões) presentes na mesma ocasião (Vanderwall et al., 1993; Weber & Woods, 1993). Em uma das coletas, entretanto, identificou-se apenas um oócito degenerado e nenhum embrião.

Dippert et al. (1994) classificaram oócitos que foram recuperados do oviduto de éguas superestimuladas ou não. Os oócitos foram considerados recentemente ovulados, ou seja, pertencentes àquele ciclo se: 1) havia uma borda distinta entre o ooplasma e o espaço perivetílico, 2) apresentava um ooplasma de densidade uniforme e 3) a zona pelúcida era

esférica ou levemente elíptica. Os oócitos foram considerados de ciclos anteriores se: 1) não havia uma borda uniforme entre o espaço perivitelínico e o ooplasma, 2) o ooplasma tinha uma aparência condensada, segmentada ou granular e, 3) a zona pelúcida era irregular ou apresentava um formato não esférico. Neste trabalho, Dippert et al. (1994) não obtiveram diferença na taxa de recuperação de oócitos do oviduto de éguas tratadas com E.P.E. ou não, e ainda, dos 46 oócitos recuperados, 41 foram classificados como pertencentes a ciclos anteriores e apenas cinco, como do ciclo atual.

Os oócitos deste experimento, recuperados a partir de lavados uterinos, estavam em diferentes graus de degeneração, por isso, não puderam ser classificados conforme Dippert et al. (1994); entretanto, considerando-se que foi utilizado o primeiro ciclo do ano após meses de anestro, a chance de se ter recuperado um oócito pertencente a um ciclo da estação anterior é bastante reduzida. Ainda, oócitos de ciclos anteriores, provavelmente, estariam em fases muito avançadas de degeneração, o que dificultaria identificá-los.

Em relação a superestimulação, os animais não responderam de maneira similar (Tabelas 3 e 4). Conforme exposto, duas das 14 éguas tratadas (14,29%) não apresentaram múltiplas ovulações; a maioria (64,29%), apresentou duas a seis ovulações; e três éguas (21,43%) sofreram uma hiperestimulação que promoveu 10, 12 e 17 ovulações.

Na Tabela 3 observamos que o período de tratamento necessário para se obter o primeiro folículo pré-ovulatório, foi inferior (p=0,021) para as duas éguas (identificadas pelo número 40 e 41) que apresentaram apenas uma ovulação. Elas receberam apenas seis (3,0 dias) e sete (3,5 dias) aplicações de eFSH® e ovularam após cinco dias do início do tratamento. O rápido crescimento folicular (5,75 e 4,17 mm diários) em um curto espaço de tempo poderia originar uma maturação folicular e/ou oocitária incompleta, o que elucidaria o motivo do insucesso da recuperação embrionária. Outra égua (número 31) que apresentou a sua primeira ovulação, de um total de quatro, também após cinco dias; da mesma forma, não produziu embriões. Porém, a égua de número 39, assim como estas, ovulou após cinco dias do início do tratamento e apresentou um rápido crescimento folicular, e no entanto, foram recuperados dois embriões. Desta forma, a hipótese de que um crescimento folicular demasiado poderia prejudicar o processo de maturação folicular e/ou oocitária deve ser refutada.

Todavia, devemos reconsiderar melhor o caso das duas éguas que tiveram apenas uma ovulação. A égua 39 contraria a teoria do rápido crescimento folicular, mas, no caso das duas éguas citadas (40 e 41), provavelmente deva ser uma somatória deste fato com a alta quantidade hormonal (FSH) que é disponibilizada e que acaba sendo utilizada por apenas um

folículo. Como já advertido, estes folículos provavelmente já haviam adquirido a dominância sobre os demais, e possivelmente eles já não apresentavam características morfológicas e esteroidogênicas iguais a outros folículos transicionais (Watson & Al-zi'abi, 2002).

Na Tabela 4 e na Figura 5 os dados demonstram que nos animais com acentuada resposta ovariana (éguas 27, 42 e 162), obtemos uma recuperação embrionária muito inferior àqueles com resposta moderada. Não existe uma razão evidente para que estas éguas tivessem apresentado essa exagerada resposta ovariana. Não podemos supor que a quantidade de hormônio foi excessiva para estas éguas, porque as éguas 162 e 27 eram umas das éguas mais pesadas do lote. Possivelmente, esta resposta ovariana exagerada para os padrões da espécie, deve-se a características individuais. Não foi possível realizar um estudo hormonal de cada égua no início e durante o tratamento com eFSH®, talvez isto pudesse indicar alguma diferença hormonal nestes animais em comparação aos demais, e esclarecer os possíveis motivos.

Nenhum embrião foi recuperado da égua 162, a qual apresentou 12 ovulações, e apenas dois embriões foram recuperados das éguas 27 e 42, que apresentaram 10 e 17 ovulações, respectivamente. Nestes casos, possivelmente ocorreu uma falha na captação dos oócitos e/ou nem todos os folículos tiveram acesso à fossa da ovulação (Lapin & Ginther, 1977). Além disso, a quantidade de LH deve ter sido insuficiente para promover a maturação de todos estes folículos. No trabalho realizado por Alvarenga et al. (2001) duas éguas que receberam extrato de pituitária duas vezes ao dia, tiveram 11 e 18 ovulações, sendo recuperados cinco e sete embriões, respectivamente. Assim, essas éguas que tiveram uma superestimulação ovariana, mas, que foram supridas com maiores quantidades de LH, visto que o E.P.E. contém FSH e LH, conseguiram maturar uma maior quantidade de folículos e/ou oócitos.

Em relação à dinâmica folicular, os folículos do grupo controle apresentaram uma taxa de crescimento similar (2,19 mm/dia) ao relatado na literatura durante a estação ovulatória (Ginther, 1992; Machado et al., 2003). Entretanto, as éguas em transição submetidas ao tratamento com eFSH, apresentaram um padrão de crescimento folicular diferente do grupo controle e de outros tratamentos superestimulatórios. De acordo com o observado (Figuras 8 a 14) nas éguas submetidas ao tratamento, o crescimento folicular começa de forma mais lenta, aumentando nos últimos dias que antecedem à ovulação. Uma menor vascularização e uma menor quantidade de fatores angiogênicos encontrados nos folículos transicionais (Watson & Al-zi'abi, 2002) podem ser os fatores responsáveis por este crescimento inicial mais lento. Segundo Watson & Al-zi'abi (2002) o fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF), expresso nas células da teca, pode ter um papel chave no crescimento folicular dependente de gonadotrofina. Assim, de acordo com estas informações, podemos especular que os folículos crescem inicialmente de forma mais lenta porque ainda apresentam características de folículos transicionais, ou seja, baixa vascularização, pequena produção de esteróides e pouca quantidade de fatores angiogênicos; conforme eles vão crescendo, eles passam a adquirir características de folículos pré-ovulatórios, apresentando melhor vascularização, maior produção de esteróides, maior produção e expressão de fatores angiogênicos e ainda maior quantidade de receptores gonadotróficos.

As baixas quantidades de LH durante a estação transicional (Freedman et al., 1979) contribuem com esta inadequada produção de fatores angiogênicos, incluindo o VEGF (Watson & Al-zi'abi, 2002). E, já foi evidenciado que a concentração de VEGF no fluido folicular de porcas pré-púberes, aumenta após o tratamento com eCG e hCG (Barboni et al., 2000). Adicionalmente, a baixa vascularização contribui para a inadequada liberação de gonadotrofinas e outros fatores tróficos que irão sustentar o desenvolvimento folicular.

Neste experimento não se observou qualquer correlação entre a população folicular existente no início do tratamento, e o número de ovulações; ao contrário de outros trabalhos que induziram com E.P.E. a superovulação em éguas durante a estação ovulatória (Woods & Ginther, 1985; Carmo, 2003). Woods & Ginther (1985) determinaram que o número de folículos com mais de 10 mm, no 15^{o} dia do diestro, pode representar o número de ovulações; há mais folículos > 10 mm ($p<0,05$) em éguas com cinco ou mais ovulações do que em éguas com uma ou duas ovulações ($6,5 \pm 0,6$ versus $3,6 \pm 0,7$), e uma tendência a ser maior ($p<0,1$) quando comparado com éguas com três ou quatro ovulações. Carmo (2003) verificou uma correlação positiva entre a população de folículos de 16 a 20 mm, no início do tratamento (após a administração de luteolítico), e o número de ovulações. Neste trabalho, como foram utilizadas éguas durante a fase de transição, ainda não havia ocorrido o recrutamento folicular, e, portanto, é compreensível o fato de não ter sido detectada uma correlação.

Concordando com os achados de Woods & Ginther (1985), observamos que as múltiplas ovulações ocorreram de forma aleatória. Quando submetemos as éguas a um tratamento com gonadotrofinas, o número de folículos que ovulam em um ovário, não necessariamente é igual ao número de folículos que ovulam no ovário contralateral. Isto parece infringir as regras de alternância entre os ovários.

Através de estudos sobre múltiplas ovulações espontâneas, sabemos que mais embriões gêmeos são recuperados quando as ovulações ocorrem em ovários distintos (Squires

et al., 1987a). Neste trabalho não se realizou uma analogia entre a distribuição das ovulações e o número de embriões recuperados, entretanto, três das quatro éguas (éguas 20, 163, 39 e 33 – Apêndice C) que apresentaram uma distribuição mais equilibrada do número de ovulações (20 = 2:3; 163 = 2:2; 39 = 1:1; 33 = 1:1), produziram o número máximo de embriões possível: 5, 4, 2 e 1 embrião, respectivamente.

Pôde-se determinar neste trabalho, que quase todos os folículos, com exceção de um, com diâmetro igual ou superior a 28 mm no dia da aplicação do hCG, ovularam (Quadro 1). Além disso, nenhum folículo ovulou ou luteinizou antes da administração do hCG. Este dado mostra que mesmo com a interrupção das administrações de FSH os folículos continuaram a crescer e que eles já estavam responsivos ao LH. Esta observação é amparada pelas informações de Fay & Douglas (1987) que relataram que o número de receptores de LH já está alto nas células da teca, quando o folículo possui 29 mm de diâmetro. Wiepz et al. (1988), trabalhando com éguas em final de transição, relataram que o folículo dominante torna-se responsivo à administração do hCG, ao atingir um diâmetro de 30 a 35 mm. Outros autores (Ginther, 1992; Bergfelt, 1998), por sua vez, descrevem que o momento mais adequado para a aplicação do hCG deve se basear na identificação das principais características pré-ovulatórias do folículo dominante, como tamanho, alterações de formato e espessura da parede folicular. Diante destas informações, é conveniente que este dado seja confirmado, e que se realizem estudos mais específicos sobre as alterações que ocorrem em folículos transicionais estimulados por gonadotrofinas.

Após a recuperação dos embriões, eles foram avaliados segundo seu estágio de desenvolvimento e seu grau de viabilidade. Por causa do pequeno número de embriões, não julgamos conveniente realizar uma análise estatística em relação à distribuição embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário (Figura 15), porém, visualmente esta distribuição não se mostrou desigual. Além disso, embriões oriundos de éguas superovuladas, com o mesmo grau de desenvolvimento, apresentaram diâmetros muito semelhantes àqueles do grupo controle (Tabela 6).

A viabilidade dos embriões, provenientes de tratamentos superovulatórios, sempre foi motivo de discussão, vários trabalhos suportam a idéia de que embriões provenientes de animais superovulados são menos competentes em se desenvolver do que embriões de animais que ciclaram normalmente (Elsden et al., 1976; Woods & Ginther, 1984; Hyttel et al., 1991). Elsden et al. (1976) mostraram que as taxas de prenhez foram ligeiramente mais altas para vacas não tratadas do que para vacas superovuladas (89 versus 70%). Similarmente, Woods & Ginther (1984) reportaram uma baixa taxa de sucesso com a transferência de

embriões de éguas que tiveram múltiplas ovulações (11 de 21) em comparação com receptoras que receberam embriões de éguas que tiveram apenas uma ovulação (7 de 8). Hyttel et al. (1991) relataram que 37% dos oócitos recuperados de vacas superestimuladas sofreram uma maturação anormal, comparado a apenas 11% dos oócitos de animais não estimulados. Porém, Dippert et al. (1994) relataram uma mesma taxa de desenvolvimento, após cinco dias de cultura, de embriões obtidos de éguas tratadas com E.P.E. e de embriões de éguas controle (46,4 versus 40,0%); e, Scoggin et al. (2002) relataram ter obtido cinco gestações após a transferência de 12 embriões recuperados de éguas tratadas com E.P.E.

Após a avaliação visual e classificação conforme McKinnon & Squires (1988) por meio de um microscópio estereoscópico (lupa), observamos que 75% (21/28) dos embriões recuperados a partir de éguas superovuladas eram perfeitos morfologicamente (grau 1 – 1,5), e 14,28% (4/28) apresentavam pequenas alterações (grau 2 – 2,5). Estes índices foram próximos àqueles observados no grupo controle (88,88% e 11,11%, respectivamente). No entanto, também foram recuperados três embriões e um oócito, todos degenerados e provenientes de uma mesma égua superovulada; e mais outros cinco oócitos provenientes de quatro éguas distintas, as quais foram submetidas ao tratamento com eFSH. Estes fatos raramente ocorrem em éguas com ovulações espontâneas. Como salientado previamente, os oócitos provavelmente chegaram ao útero, carreados pelos outros embriões.

Em éguas com ovulações espontâneas, na maior parte dos casos, a recuperação de um embrião degenerado deve-se a um meio intra-uterino inadequado para o seu desenvolvimento. Esta pode ter sido a razão da recuperação dos três embriões degenerados, pois todos foram recuperados de uma mesma égua, apesar de não terem sido detectadas alterações uterinas por meio do exame ultra-sonográfico. Contudo, a hipótese de ocorrência de morte embrionária precoce devido a problemas intrínsecos ao embrião, oriundo de um tratamento superestimulatório, não deve ser descartada e deve ser melhor estudada.

A avaliação através das sondas fluorescentes também nos indicou que exceto os três embriões degenerados, todos os outros sete analisados (70%) apresentavam um pequeno número de células inviáveis, assim como os embriões do grupo controle. Apenas um embrião apresentou um número razoável de células inviáveis na sua periferia, aproximadamente 150. Isto pode ser um indicativo de que este embrião sofreu algum dano, durante o tempo em que se manteve no meio de manutenção até a sua avaliação. Porém, mesmo assim, ele mostrou-se um embrião com boa viabilidade.

No presente experimento, também foram mensuradas as concentrações séricas de progesterona nas éguas de ambos os grupos, no dia em que foi realizada cada coleta de

embrião. Assim como Alvarenga et al. (2001), observamos um aumento nas concentrações de progesterona, relacionado ao aumento do número de ovulações ($p<0,001$). Porém, os valores não são diretamente proporcionais ao número de corpos lúteos, como por exemplo, a égua que teve seis ovulações produziu uma maior quantidade de progesterona (44 ng/ml) em relação às éguas que tiveram 10 e 12 ovulações (24,9 e 38,49 ng/ml, respectivamente).

Este aumento nas concentrações de progesterona indica que um grande número de ovulações resultou em corpos lúteos funcionais, entretanto, parece existir uma variada capacidade esteroidogênica entre os corpos lúteos, o que pode ter contribuído para esta diversidade de valores.

Nos animais do grupo controle, observa-se claramente que apesar de todos os animais possuírem apenas um corpo lúteo, as concentrações de progesterona variaram de 4,3 a 11,6 ng/ml (Apêndice D). Isto mostra que um corpo lúteo pode ter uma capacidade esteroidogênica quase três vezes maior que um outro corpo lúteo. Assim, é compreensível que os valores sanguíneos de progesterona, averiguados nas éguas com múltiplas ovulações, não acompanharam o número de corpos lúteos.

Também, aparentemente, não se observou qualquer relação entre a concentração de progesterona, a imagem ultra-sonográfica do(s) corpo(s) lúteo(s) e a recuperação de embriões. Éguas com corpos lúteos menores, não necessariamente apresentaram uma menor concentração de progesterona. Do mesmo modo, a concentração de progesterona parece não ter influenciado na recuperação embrionária. Arruda et al. (2001) estudaram a relação entre o tamanho e a morfoecogenicidade dos corpos lúteos e os teores de progesterona em receptoras de embriões e observaram que o aumento da concentração de progesterona é acompanhado pelo aumento da morfoecogenicidade, principalmente do D4 em diante, entretanto, a elevação nos níveis de progesterona não são decorrentes do tamanho dos corpos lúteos. Estes autores também não detectaram diferença na morfoecogenicidade e no tamanho dos corpos lúteos, nem nos níveis de progesterona circulantes do D0 ao D9 em receptoras de embriões eqüinos que se tornaram gestantes ou não após o procedimento da transferência de embriões.

Adicionalmente, sugere-se que sejam realizados maiores estudos sobre a produção de progesterona de éguas que foram superestimuladas durante a estação de transição e durante a estação reprodutiva. Percebemos que as concentrações médias de progesterona no presente estudo foram inferiores às relatadas por Alvarenga et al. (2001), apesar de ambos os trabalhos terem utilizado a mesma técnica para a mensuração (radioimunoensaio). As baixas concentrações séricas de LH, podem ter influenciado no desenvolvimento dos corpos lúteos, e, conseqüentemente, na produção de progesterona.

Conclusões

A partir deste experimento, realizado de acordo com as condições expostas anteriormente, as seguintes conclusões podem ser pronunciadas:

1) A utilização do Hormônio Folículo Estimulante purificado eqüino (eFSH) foi efetiva em acelerar o início da atividade reprodutiva em éguas durante o período de transição de primavera;

2) O tratamento com eFSH foi eficiente em promover múltiplas ovulações na maioria dos animais;

3) Um maior número de ovulações e um maior número de embriões e estruturas foram recuperados nas éguas submetidas ao tratamento, em comparação ao grupo não tratado;

4) Os animais do grupo tratado apresentaram um crescimento folicular diferenciado em relação ao grupo controle, apresentando um crescimento mais lento inicialmente, que se acentuou durante os últimos dias que antecederam a ovulação;

5) Os embriões oriundos das éguas submetidas ao tratamento com eFSH mostraram-se viáveis, assim como os embriões das éguas do grupo não tratado;

6) As éguas com múltiplas ovulações apresentaram uma maior concentração de progesterona quando comparado àquelas com ovulações únicas;

7) A maioria das éguas manteve a atividade cíclica ovariana após a suspensão do tratamento com o eFSH.

Referências Bibliográficas

ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H.G., EVANS, M.J., TAYLOR, T.B. Control of the onset of the breeding season in the mare, its artificial regulation by progesterone treatment and subsequent effects on the resistance to uterine infection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM EQUINE REPRODUCTION, 1990, Deauville. **Abstract**... Deauville, 1990. p.102-3.

ALLEN, W.R. Embryo transfer in the horse. In: ADAMS, C.E. (Ed). **Mammalian egg transfer.** Boca Raton: CRC Press, 1982. p.135-54.

ALLEN, W.R., SANDERSON, M.W., GREENWOOD, R.E.S., ELLIS, D.R., CROWHURST, J.S., SIMPSON, D.J., ROSSDALE, P.D. Induction of ovulation in anoestrous mares with a slow-release implant of a GnRH analogue (ICI 118 630). **J. Reprod. Fertil.**, v.35 (suppl), p.469-78, 1987.

ALLEN, W.R., URWIN, V., SIMPSON, D.J., GREENWOOD, R.E.S., CROWHURST, R.C., ELLIS, D.R., RICKETTS, S.W., HUNT, M.D.N., WINGFIELD DIGBY, N.J. Preliminary studies on the use of an oral progestogen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares. **Equine Vet. J.**, v.12, p.141-5, 1980.

ALMEIDA, H.B., VIANA, W.G., ARRUDA, R.P., OLIVEIRA, C.A. Estrus synchronization and follicular dynamics of crioulo mares by norgestomet, melengestrol acetate and altrenogest treatments. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, p.267-72, 2001.

ALVARENGA, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F.C., MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recovery equine embryos. **Equine Vet. J.**, v.15, p.111-2, 1993.

ALVARENGA, M.A., McCUE, P.M., BRUEMMER, J., NEVES NETO, J.R., SQUIRES, E.L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-87, 2001.

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

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP.** São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database.** Philadelphia, 1996. 468p.

ALVARENGA, M.A., SQUIRES, E.L., MACHADO, M.S., ARANTES, M., PERES, K.R., LEÃO, K.M., OLIVEIRA, J.V., ROSER, J.F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH eqüino purificado. **Acta Scientiae Vet.**, v.31, p.216-7, 2003.

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

ARMSTRONG, D.T., PFITZNER, A.P., WARNES, G.M., RALPH, M.M., SEAMARK, R.F. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. **J. Reprod. Fertil.**, v.67, p.395-401, 1983.

ARRUDA, R.P., VISINTIN, J.A., FLEURY, J.J., GARCIA, A.R., MADUREIRA, E.H., CELEGHINI, E.C.C., NEVES NETO, J.R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, p.233-9, 2001.

AURICH, C., SCHLOTE, S., HOPPEN, H.O., KLUG, E., HOPPE, H., AURICH, J.E. Effects of the opoid antagonist naloxone on release of luteinizing hormone in mares during the anovulatory season. **J. Endocrinol.**, v.142, p.139-44, 1994.

BARBONI, B., TURRIANI, M., GALEATI, G., SPINACI, M., BACCI, M.L., FORNI, M., MATTIOLI, M. Vascular endothelial growth factor production in growing antral pig follicles. **Biol. Reprod,** v.63, p.858-64, 2000.

BERGFELT, D.R. Ovarian follicular wave dynamics in mares. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, p.104-24, 1998.

BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mares. **Theriogenology**, v.26, p.733-47, 1986.

BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.39, p.781-96, 1993.

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

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

BÉZARD, J., GOUDET, G., DUCHAMP, G., PALMER, E. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Bio. Reprod.**, v.1, p.261-71, 1995.

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

BOGH, I.B., HOIER, R., SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Steroid concentrations in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. **Theriogenology**, v.54, p.877-88, 2000.

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

BRASELTON, W.E., McSHAN, W.H. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.139, p.45-8, 1970.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.,** v.109, p.165-71, 1997.

BRENDEMUEHL, J.P., CROSS, D.L. Influence of the dopamine antagonist domperidone on the vernal transition in seasonally anoestrous mares. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.56, p.185-93, 2000.

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

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

BURGER, H.G., IGARASHI, M. Inhibin: Definition and nomenclature, including related substances. **Endocrinology**, v.122, p.1701-2, 1988.

BURKHARDT, J. Transition from anoestrous in the mare and the effects of artificial lighting. **J. Agric. Sci.**, v.37, p.64-8, 1946.

CALLESEN, H., GREVE, T., HYTTEL, P. Premature ovulations in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.28, p.155-66, 1987.

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

CARMO, M.T., TRINQUE, C.L.N., LIMA, M.M., MEDEIROS, A.S.L., ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.3, p.252-4, 2002.

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

CARNEVALE, E.M., THOMPSON, K.N., KING, S.S., ROSZKOWSKI, J.J. Effects of age and diet on the spring transition in mares. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 42., 1996, Denver. **Proceedings...** Denver, 1996, p.146-7.

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

COSTA, W.P., ALBUQUERQUE, J.F.G., MOURA, C.E.B., PEREIRA, H.M., CARVALHO, R.C., RESENDE, H.R.A., JÁCOME, C.G.M., SOUZA, J.A.T. Sincronização, indução ao estro e à ovulação em éguas Quarto-de-milha atletas (*Equus caballus*) no Nordeste brasileiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.502-4, 2003.

COY, R.E., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Follicular response of mares in deep or transitional anestrus to equine pituitary extract. In: EQUINE NUTRITION PHYSIOLOGY SYMPOSIUM, 16, 1999, Raileigh. **Proceedings...** Raileigh, 1999. p.65-8.

CUMMINS, L.J., O'SHEA, T., AL-OBAIDI, S.A., BINDON, B.M., FINDLAY, J.K. Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity. **J. Reprod. Fertil.**, v.77, p.365-72, 1986.

DAELS, P.F., FATONE, S., HANSEN, B.S., CONCANNON, P.W. Dopamine antagonist-induced reproductive function in anoestrous mares: gonadotrophin secretion and the effects of environmental cues. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.56, p.173-83, 2000.

DAVIS, S.D., SHARP, D.C. Intra-follicular and peripheral steroid characteristics during vernal transition in the pony mare. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.44, p.333-40, 1991.

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

DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O., ZAHN, F.S., ALVARENGA, M.A., LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** v.26, n.3, p.189-91, 2002.

DIPPERT, K.D., HOFFERER, S., PALMER, E., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, v.38, p.695-710, 1992.

DIPPERT, K.D., JASKO, D.J., SEIDEL, G.E.Jr, SQUIRES, E.L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41, p.1411-23, 1994.

DONADEU, F.X., GINTHER, O.J. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v.124, n.6, p.875-85, 2002.

DONALDSON, L.E., WARD, D.N. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. **Vet. Rec.**, v.119, p.625-6, 1986.

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

DOUGLAS, R.H., NUTI, L., GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, v.2, p.133-42, 1974.

DRIANCOURT, M.A., FRY, R.C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, v.27, p.279-92, 1992.

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

ELSDEN, R.P., HASLER, J.F., SEIDEL, G.E. Jr. Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v.6, p.523-9, 1976.

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

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

EVANS, M.J., IRVINE, C.H.G. Induction of follicular development and ovulation in seasonally acyclic mares using gonadotrophin-releasing hormones and progesterone. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.27, p.113-21, 1979.

EVANS, M.J., IRVINE, C.H.G. Induction of follicular development, maturation and ovulation by gonadotropin releasing hormone administration to acyclic mares. **Biol. Reprod.**, v.16, p.452-62, 1977.

EVANS, M.J., IRVINE, C.H.G. Measurement of equine follicle stimulating hormone and luteinizing hormone: response of anestrous mares to gonadotropin releasing hormone. **Biol. Reprod.**, v.15, p.477-84, 1976.

FAY, J.E., DOUGLAS, R.H. Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.35, p.169-81, 1987.

FEVOLD, H.L. Extraction and standardization of pituitary follicle stimulating and luteinizing hormones. **Endocrinology**, v.24, n.4, p.435-46, 1939.

FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reprod. Fertil.,** v.6, p.127-39, 1994.

FITZGERALD, B.P., AFFLECK, K.J., BARROWS, S.P., MURDOCH, W.L., BARKER, K.B., LOY, R.G. Changes in LH pulse frequency and amplitude in intact mares during the transition into the breeding season. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.485-93, 1987a.

FITZGERALD, B.P., AFFLECK, K.J., PEMSTEIN, R.L., LOY, R.G. Investigation of the potencial of LHRH or na agonist to induce ovulation in seasonally anoestrous mares with observations on the use of the agonist in problem acyclic mares. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.35, p.683-4, 1987b.

FITZGERALD, B.P., McMANUS, C.J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biol. Reprod.**, v.63, p.335-40, 2000.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammal. **Biol. Reprod.,** v.50 p.225-32, 1994.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.135-63, 2003.

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

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

GARCIA, M.C., GINTHER, O.J. Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, p.1581-4, 1975.

GARZA, F., THOMPSON, D.L., FRENCH, D.D., WIEST, J.J., St. GEORGE, R.L., ASHLEY, K.B., JONES, L.S., MITCHELL, P.S., McNEILL, D.R. Active immunization of intact mares against gonadotropin-releasing hormone: Differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. **Biol. Reprod.**, v.35, p.347-52, 1986.

GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1320-7, 1997.

GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., NOGUEIRA, G.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.53, p.925-40, 2000.

GENTRY, L.R., THOMPSON Jr., D.L., GENTRY Jr., G.T., DAVIS, K.A., GODKE, R.A., CARTMILL, J.A. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **J. Anim. Sci.**, v.80, n.10, p.2695-703, 2002a.

GENTRY, L.R., THOMPSON Jr., D.L., STILZER, A.M. Responses of seasonally anovulatory mares to daily administration of thyrotropin-releasing hormone and (or) gonadotropin-releasing hormone analogue. **J. Anim. Sci.**, v.80, n.1, p.208-13, 2002b.

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.90, p.311-20, 1990.

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

GINTHER, O.J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryos fixation in mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v.7, p.82-8, 1987.

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

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

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

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

GINTHER, O.J., MEIRA, C., BEG, M.A., BERGFELT, D.R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biol. Reprod**., v.67, p.862-7, 2000.

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

GUILLOU, F., COMBARNOUS, Y. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v.755, p.229-36, 1983.

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

HART, P.J., SQUIRES, E.L., IMEL, K.J., NETT, T.M. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. **Biol. Reprod.**, v.30, p.1055-62, 1984.

HAWK, H.W. Gamete transport in the superovulated cow. **Theriogenology**, v.29, p.125-42, 1988.

HENDERSON, K.M., FRANCHIMONT, P., LECOMTE-YERNA, M.J. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. **J. Endocrinol.**, v.102, p.305-9, 1984.

HILLMAN, R.B., LOY, R.G. Oestrogen excretion in mares in relation to various reproductive states. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.23, p.223-30, 1975.

HINES, K.K., AFFLECK, K.J., BARROWS, S.P., MURDOCH, W.L., FITZGERALD, B.P., LOY, R.G. Follicle-stimulating hormone pulse amplitude decreases with onset of the breeding season in the mare. **Biol. Reprod.**, v.44, p.516-21, 1991.

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

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

HOUSEKNECHT, K.L., BAILE, C.A., MATTERI, R.L., SPURLOCK, M.E. The biology of leptin: a review. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1405-20, 1998.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DER DONK, J.A., VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17β-estrdiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, p.217-26, 1995.

HYLAND, J.H., WRIGHT, P.J., CLARKE, I.J., LARSON, R.S., LANGFORD, D.A., JEFFCOTT, L.B. Infusion of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) induces ovulation and fertile oestrus in mares during seasonal anoestrus. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.35, p.211-20, 1987.

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

IRVINE, C.H.G. Endocrinology of the estrous cycle of the mare: applications to embryo transfer. **Theriogenology**, v.15, p.85-104, 1981.

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

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

JOHNSON A.L. Induction of ovulation in anestrous mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Am. J. Vet. Res.,** v.47, p.983-6, 1986.

KENNEY, R.M., CONDON, W., GARJAN, V.K., CHANNING, C.P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresia. **J. Reprod. Fertil.**, v.27, p.163-71, 1979.

KOOISTRA, L.H., GINTHER, O.J. Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, p.1413-9, 1975.

KUBIAK, J.R., CRAWFORD, B.H., SQUIRES, E.L., WRIGLEY, R.H., WARD, G.M. The influence of energy intake and percentage of body fat on the reproductive performance of nonpregnant mares. **Theriogenology**, v.28, p.587-98, 1987.

LAPIN, D.R., GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with na equine pituitary extract. **J. Anim. Sci.**, v.44, p.834-42, 1977.

LEBEDEVA, I.Y., DENISENKO, V.U., LEBEDEVA, V.A., KUZMINA, T.I. Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows: work in progress. **Theriogenology,** v.49, p.509-19, 1998.

LOFSTEDT, R.M. Control of the estrous cycle in the mare. **Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.**, v.4, p.177-96, 1988.

LOOS, F.A.M. de, BEVERS, M.M., DIELEMAN, S.J., KRUIP, T.A.M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. **Theriogenology**, v.35, p.537-46, 1991.

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

MACHADO, M.S., ARANTES, M., PERES, K.R**,** LEÃO, K.M., CARMO, M.T., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório, utilizando-se extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** v.27, n.3, p.506-8, 2003.

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

McCUE, P.M., CARNEY, N.C., HUGHES, J.P., RIVEIER, J., YALE, W., LASLEY, B.L. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against na inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, v.38, p.823-31, 1992.

McCUE, P.M., HUGHES, J.P., LASLEY, B.L. Effect on ovulation rate of passive immunization of mares against inhibin. **Equine Vet. J.** suppl.15, p.103-6, 1993.

McKINNON, A.O., BROWN, R.W., PASHEN, R.L., GREENWOOD, P.E., VASEY, J.R. Increased ovulation rates in mares after immunization against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. **Equine Vet. J.** v.24, p.144-6, 1992.

McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract**., v.4, p.305-33, 1988.

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

MELROSE, P.A., WALKER, R.F., DOUGLAS, R.H. Dopamine in the cerebrospinal fluid of prepubertal and adult horses. **Brain Behav. Evol.**, v.35, p.98-106, 1990.

MONNIAUX, D., CHUPIN, D., SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.55-81, 1983.

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

MOOR, R.M., OSBORN, J.C., CROSBY, I.M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **J. Reprod. Fertil.,** v.74, p.167-72, 1985.

NAMBO, Y., KANEKO, Y., NAGATA, S., OIKAWA, M., YOSHIHARA, T., NAGAMINE, N., WATANABE, G., TAYA, K. Control of FSH secretion by passive immunization against inhibin may become a new method of control of folliculogenesis and ovulation rate in mares. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 7, 1998, Colchester. **Anais...** Pretória, 1998. p. 67-8 (abstract).

NEQUIN, L.G., KING, S.S., JOHNSON, A.L., GOW, G.M., FERREIRA-DIAS, G.M. Prolactin may play a role in stimulating the equine ovary during the spring transition **J. Equine Vet. Sci.,** v.13, p.631-35, 1993.

NEQUIN, L.G., KING, S.S., MATT, K.S., JURAK, R.C. The influence of photoperiod on gonadotrophin-releasing hormone stimulated luteinising hormone release in the anoestrous mare. **Equine Vet. J.**, v.22, p.356-8, 1989.

NISWENDER, K.D., McCUE, P.M., SQUIRES, E.L. Effect of purified equine follicle-stimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v.24, n.1, p.37-9, 2004.

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

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

ONUMA, H., OHNAMI, Y. Retention of tubal eggs in mares. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.23, p.507-11, 1975.

OXENDER, W.D., NODEN, P.A., HAFS, H.D. Estrus, ovulation, and serum progesterone, estradiol, and LH concentrations in mares after an increased photoperiod during winter. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, p.203-7, 1977.

PALMER, E. Recent attempts to improve synchronisation of ovulation and to induce superovulation in the mare. **Equine Vet. J.,** suppl.3, p.11-8, 1985.

PALMER, E. Reproductive management of mares without detection of oestrus. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 27, p.263-70, 1979.

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

PALMER, E., QUELLIER, P. Uses of LHRH and analogues in the mare. INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION & ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin, 1988. v.5, p.339-46.

PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Inseminação artificial com sêmen a fresco. **Rev. Cavalo Mang.**, v.12, p.16-23, 1987.

PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v.14, p.219-31, 1987.

PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Ovarian follicular response of mares to na equine pituitary extract after suppression of follicular development. **Anim. Reprod. Sci.**, v.22, n.2, p.131-44, 1990.

PRICE, C.A., MORRIS, B.A., O'SHEA, T., WEBB, R. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p.161-8, 1987.

REMY, B., BRUYAS, J.F., BECKERS, J.F., LEDUC, F., FIÉNI, F., TAINTURIER, D. Ovulation rates in donor mares treated with purified equine FSH. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.394, 1997.

ROBINSON, G, PORTER, M.B., PELTIER, M.R., CLEAVER, B.C., FARMERIE, T.A., WOLFE, M.W., NILSON, J.H., SHARP, D.C. Regulation of luteinizing hormone β and α messenger ribonucleic acid by estradiol or gonadotropin-releasing hormone following pituitary stalk section in ovariectomized pony mares **Biol. Reprod**. **Monogr. Ser**., v.1**,** p.373-83, 1995.

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.1257-64, 1998.

SAFIR, J.M., LOY, R.G., FITZGERALD, B.P. Inhibition of ovulation in the mare by active immunization against LHRH. **J. Reprod. Fertil.**, suppl.35, p.229-37, 1987.

SCHIEWE, M.C., HOWARD, J.G., GOODROWE, K.L., STUART, L.D., WILDT, D.E. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin $F_{2\alpha}$ synchronization is compromised by premature luteal regression. **Theriogenology**, v.34, p.469-86, 1990.

SCOGGIN, C.F., MEIRA, C., McCUE, P.M., CARNEVALE, E.M., NETT, T.M., SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v.58, p.151-64, 2002.

SCOTT, T.J., CARNEVALE, E.M., MACLELLAN, L.J., SCOGGIN, C.F., SQUIRES, E.L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology,** v.55, p.705-15, 2001.

SCRABA, S.T., GINTHER, O.J. Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, v.24, p.667-79, 1985.

SEMENOV, V.V., KITAEV, E.M., ZELENINA, N.V. Ultrastructure of rat oocytes during the induction of superovulation. **Tsitologiia**, v.28, n.11, p.1259-61, 1986.

SHARP, D.C. Transition into the breeding season: clues to the mechanisms of seasonality. **Equine Vet. J.**, v.20, p.159-61, 1988.

SHARP, D.C., GARCIA, M.C., GINTHER, O.J. Luteinizing hormone during sexual maturation in pony mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, p.584-6, 1979.

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

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

SIROIS, J., BALL, B.A., FORTUNE, J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Vet. J.**, suppl. 8, p.43-8, 1989.

SIROIS, J., KIMMICH, T.L., FORTUNE, J.E. FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares. **Theriogenology**, v.37, p.300, 1992.

SQUIRES, E.L., CARNEVALE, E.M., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-70, 2003.

SQUIRES, E.L., GARCIA, R.H., GINTHER, O..J., VOSS, J.L., SEIDEL, G.E. Comparasion of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone to superovulating mares. **Theriogenology**., v.26, p.661-70, 1986.

SQUIRES, E.L., McCLAIN, M.G., GINTHER, O.J., McKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, v.28, p.609-13, 1987a.

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

SQUIRES, E.L., ROWLEY, H.R., NETT, T.M. Comparison of pulsatile versus constant release of GnRH for superovulation in mares. **Am. Soc. Anim. Sci.,** suppl.1, v.67, p.391-2, 1989 (abstract).

SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. Superovulation. In: SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. **Collection and transfer of equine embryos.** 8. Fort Collins: Colorado State University, 1995. p.32-8. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory.

STABENFELDT, G.H., EDQVIST, L.E. Processos reprodutivos na fêmea. In: SWENSON, M.J., REECE, W.O. (Eds). **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.615-44.

STEWART, F., ALLEN, W.R. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. **J. Reprod.Fertil.,** suppl 27, p.431-40, 1979.

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

TURNER, D.D., GARCIA, M.C., GINTHER, O.J. Follicular and gonadotropic changes throughout the year in pony mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, p.1694-700, 1979.

TURNER, D.D., GARCIA, M.C., WEBEL, S.K., GINTHER, O.J. Influence of follicular size on the response of mares to allyl trenbolone given before the onset of the ovulatory season. **Theriogenology**, v.16, p.73-84, 1981.

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

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J. Regulação do crescimento oocitário e maturação em mamíferos. **Acta Scientiae Vet.**, v.31, p.172-205, 2003.

VANDERWALL, D.K., WOODS, G.L. Age-related subfertility in the mare. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 36, 1990, Lexington. **Proceedings**... Lexington, 1990. p.85-9.

VANDERWALL, D.K., WOODS, G.L., WEBER, J.A. PGE_2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. **Equine Vet. J.,** suppl.15, p.24-7, 1993.

VESELINOVIC, S., IVKOV, V., VESELINOVIC, S. Induction of superovulation in mares. In: ANNUAL MEETING OF THE AETE, 10, 1994, Lyon. **Proceedings...** Lyon, 1994.

WALTON, E.A., ARMSTRONG, D.T. Oocyte normality after superovulation in immature rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.67, p.309-14, 1983.

WASSARMAN, P.M., ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E., NEILL. J.D. (Eds) **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p.90-7.

WATSON, E.D., AL-ZI'ABI, M.O. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mare during spring transition and the breeding season. **Reproduction**, v.124, p.227-34, 2002.

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

WEBEL, S.K., SQUIRES, E.L. Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 32, p.193-8, 1982.

WEBER, J.A., WOODS, G.L. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. **Equine Vet. J.,** suppl.15, p.36-8, 1993.

WESSON, J.A., GINTHER, O.J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. **J. Anim. Sci.**, v.52, p.119-29, 1981.

WIEPZ, G.J., SQUIRES, E.L., CHAPMAN, P.L. Effects of norgestomet, altrenogest, and/or estradiol on follicular and hormonal characteristics of late transitional mares. **Theriogenology**, v.30, p.181-93, 1988.

WISE, T., MAURER, R.R. Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge and progestin inhibition of LH surge. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.35-8, 1994.

WOODS, G.L., GINTHER, O..J. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.21, p.461-9, 1984.

WOODS, G.L., GINTHER, O..J. Follicular dynamics in mares treated with na equine pituitary extract. **Theriogenology**, v.23, n.2, p.297-308, 1985.

WOODS, G.L., GINTHER, O..J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, v.20, p.347-55, 1983b.

WOODS, G.L., GINTHER, O..J. Recent studies relating to the collection of multiple embryos in mares. **Theriogenology**, v.19, p.101-8, 1983a.

WOODS, G.L., GINTHER, O.J. Ovarian response, pregnancy rate and incidence of multiple fetuses in mares treated with an equine pituitary extract. **J. Reprod.Fertil.,** suppl.32, p.415-21, 1982.

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

Apêndices

APÊNDICE A - GRUPO CONTROLE

ÉGUA	1º dia controle	Pop. Folicular 1º dia				Nº dias p/ fol. ≥ 35	Dia hCG	Pop. Folicular (mm) dia hCG							Nº ovul	Intervalo hCG – ovulação (hs)	Intervalo fol.≥25mm - ovul. (dias)	Coleta D7-8,0	Interv. $PGF_{2\alpha}$-2ª ovul. (dias)
		10-14,9	15-19,9	20-24,9	25-29,9			10-14,9	15-19,9	20-24,9	25-29,9	30-34,9	35-39,9	≥40					
(01) **735**	22.09	0	2	0	1	2	26.09	0	1	0	1	0	0	1	1	36	6	+	12
(02) **902**	03.10	1	6	4	1	42	14.11	4	6	0	0	0	1	0	1	120	47	+	17*
(03) **32**	10.10	2	1	4	1	18	28.10	2	4	2	0	0	1	0	1	36	20	+	10*
(04) **13**	11.10	3	2	2	3	3	15.10	2	3	4	0	0	1	0	1	36	6	-	14
(05) **09**	18.10	5	1	0	1	22	11.09	1	1	0	0	0	1	0	1	48	24	+	9*
(06) **15**	18.10	2	0	1	1	20	11.09	3	0	0	0	0	0	1	1	48	24	+	10*
(07) **56**#	18.10	3	2	1	1	>60													-
(08) **34**	19.10	0	3	1	1	6	25.10	1	3	0	1	0	1	0	1	36	8	-	4
(09) **19**	21.10	poli	2	4	1	20	11.11	poli	4	1	0	0	1	0	1	48	23	+	9*
(10) **37**	24.10	1	4	3	2	14	08.11	3	3	0	0	0	0	1	1	48	17	-	9*
(11) **38**	05.11	2	0	0	1	11	17.11	2	1	1	0	0	1	0	1	48	14	+	16*
(12) **14**	08.11	5	2	0	1	21	29.11	3	5	0	1	0	1	0	1	48	23	+	8*
(13) **898**	11.11	2	2	1	1	9	21.11	0	2	0	0	0	0	1	1	48	12	+	13*
(14) **29**	19.11	5	4	3	1	6	25.11	poli	poli	0	1	0	1	0	1	96	10	-	11*
Média						**14,92**									**1**		**18,00**	**0,69**	**10,92**

56# - Dados excluídos da análise estatística.

* com hCG

APÊNDICE B – GRUPO TRATAMENTO

ÉGUA	1º dia tratamento	Pop. Folicular (mm) - 1º dia				Nº dias p/ fol. ≥ 35 mm	Nº dias tratamento.	Dia hCG	Pop. Folicular (mm) – dia hCG							Nº ovul	Interv. hCG – ovul.(hs)	Intervalo fol.≥25mm-1ª ovul. (dias)	Coleta D7-8	Rec. Ooc.	Interv. $PGF_{2\alpha}$ - 2ª ovul. (dias)
		10-14,9	15-19,9	20-24,9	25-29,9				10-14,9	15-19,9	20-24,9	25-29,9	30-34,9	35-39,9	≥ 40						
(01) **20**	11.09	poli	0	0	1	6	6.5	17.09	1	2	1	1	2	1	1	5	36	8	+++++	-	64*
(02) **40**	25.09	poli	1	0	1	3	3.5	28.09	2	1	0	1	0	0	1	1	48	5	-	+	15*
(03) **31**	26.09	1	4	3	1	3	4.5	30.09	3	4	1	1	1	3	0	4	12-48	5-7	-	-	17*
(04) **163**	05.10	poli	2	1	1	4	6.0	11.10	0	2	2	0	1	1	2	4	48	8	++++	-	13
(05) **49**	16.10	4	6	0	1	5	5.5	21.10	1	3	1	2	1	3	0	5	48	6	+	+	58*
(06) **27**	17.10	8	7	2	1	5	5.0	22.10	2	2	3	5	3	2	0	10	48	7	++	-	14*
(07) **18**	18.10	1	3	2	1	4	5.0	23.10	1	2	0	1	3	2	0	6	48	7	+++++	+	14*
(08) **734**	20.10	5	4	2	2	4	4.0	24.10	poli	3	3	1	3	1	0	5	96-120	8-9	+++	++	14
(09) **162**	22.10	4	4	3	1	5	5.5	27.10	0	1	0	3	6	3	1	12	36	7	-	-	15*
(10) **36**	28.10	0	6	4	1	5	6.0	03.11	2	6	0	0	1	3	1	4	48	8	+++	+	13*
(11) **39**	28.10	4	4	0	1	3	3.5	31.10	0	5	0	0	0	2	0	2	36	5	++	-	36*
(12) **42**	06.11	poli	poli	1	1	4	5.0	11.11	0	0	1	5	7	5	1	17	48	7	++	-	15*
(13) **33**	11.11	4	1	0	2	4	4.0	15.11	1	0	0	1	0	2	0	2	48	6	+	-	12*
(14) **41**	21.11	0	2	0	1	3	3.0	24.11	2	0	0	0	0	1	0	1	48	5	-	-	13*
Média						**4,14**	**4,79**									**5,57**		**6,57**	**2,0**		**22,36**

* com hCG

APÊNDICE C

Distribuição das ovulações em éguas submetidas ao tratamento com eFSH®				
ÉGUA	**Número de Ovulações**		**Nº Embriões**	**Nº Estruturas** (emb. + oóc.)
	O. E.	**O. D.**		
20	2	3	5	5
40	0	1	0	1
31	1	3	0	0
163	2	2	4	4
49	4	1	1	2
27	6	4	2	0
18	4	2	5	6
734	1	4	3	5
162	9	3	0	0
36	4	0	3	4
39	1	1	2	2
42	7	10	2	2
33	1	1	1	1
41	1	0	0	0

APÊNDICE D

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA (ng/ml)		
CONTROLE		
Égua	N^0 de Corpos Lúteos	[ ] P_4 (ng/ml)
09	1	5,262
13	1	8,793
14	1	7,082
15	1	10,189
19	1	8,951
29	1	5,743
32	1	7,288
34	1	5,532
37	1	7,898
38	1	4,304
735	1	11,594
898	1	7,773
902	1	5,726
TRATAMENTO		
Égua	N^0 de Corpos Lúteos	[ ] P_4 (ng/ml)
41	1	8,025
33	2	12,792
39	2	16,272
40	2 (1 diestro)	10,114
31	4	21,402
36	4	17,108
163	4	16,797
20	5	36,288
49	5	22,338
734	5	14,518
18	6	44,000
27	10	24,899
162	12	38,490
42	17	45,000