

ALEXANDRE NASCIMENTO ROCHA FILHO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM BAIXA DOSE DE EXTRATO DE
PITUITÁRIA OU FSH PURIFICADO EQÜINO NO CRESCIMENTO
FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS**

Dissertação

Mestrado

Botucatu

2005

ALEXANDRE NASCIMENTO ROCHA FILHO

EFEITO DO TRATAMENTO COM BAIXA DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA OU
FSH PURIFICADO EQUINO NO CRESCIMENTO FOLICULAR, TAXA DE
OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária.

Orientador: Prof. Adjunto Marco Antonio Alvarenga

Botucatu

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Rocha Filho, Alexandre Nascimento.

Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária ou FSH purificado eqüino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas / Alexandre Nascimento Rocha Filho. – 2005.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Prof. Adjunto Marco Antonio Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução

CDD 636.10824

Palavras-chave: EPE; eFSH; Ovulações múltiplas; Superovulação

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, pelos incessantes incentivos em todos os desafios e empreitadas da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Marco Antonio Alvarenga, pelos ensinamentos, incentivos e amizade demonstrados durante a realização do curso de Mestrado.

Aos docentes, colegas pós-graduandos e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, Unesp-Botucatu, que muito bem me receberam nesta instituição, sendo sempre solícitos a minha pessoa.

Ao amigo e companheiro de república Gustavo e sua namorada, Carla, pelas risadas, companheirismo e auxílio em diferentes trabalhos que desenvolvemos durante o Mestrado.

Ao amigo e colega de profissão Dr. Edílson Lopes, pelo auxílio na condução da etapa experimental deste trabalho.

À equipe e proprietário do Haras Santa Esmeralda, Sr. Adolfo Geo Filho, pela viabilização deste trabalho nas dependências da Fazenda Água Fria, Esmeraldas, MG.

Ao Prof. Edward Squires (Colorado State University) e à Bioniche Animal Health pela doação do FSH purificado eqüino utilizado no presente trabalho.

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos de doses baixas de extrato de pituitária (EPE) ou FSH purificado eqüino (eFSH) no crescimento folicular, taxa de ovulação e de recuperação embrionária em éguas. O experimento foi conduzido de outubro a dezembro de 2004 com a utilização de 27 éguas doadoras e 28 receptoras de embriões da raça Mangalarga Marchador. Após uma colheita de embrião no dia 8 pós-ovulação, as éguas receberam uma injeção de luteolítico e foram alocadas em um de dois grupos experimentais: EPE (n=13) ou eFSH (n=14). Para todas as éguas estudaram-se dois intervalos entre uma colheita de embrião e a ovulação subsequente, sendo o primeiro o ciclo controle (sem tratamento) e o segundo o ciclo tratado. Em ambos os ciclos ultra-sonografia transretal do útero e dos ovários foi realizada diariamente para acompanhar o desenvolvimento dos dois maiores folículos. Durante o estro as éguas foram inseminadas a cada 48 h com sêmen a fresco do mesmo garanhão e receberam hCG (2.500 UI/IV) mediante a detecção de pelo menos um folículo com 35 a 40 mm de diâmetro. Os tratamentos consistiram em administração de EPE (4 mg/IM/s.i.d.; Grupo EPE) ou eFSH (5 mg/IM/s.i.d.; Grupo eFSH) do dia 8 (dia 0 = ovulação) até o dia anterior à indução das ovulações com hCG. As colheitas de embrião foram realizadas no oitavo dia pós-ovulação e sempre seguidas da administração de luteolítico. O percentual de éguas com mais de uma ovulação foi comparado pelo teste de Fischer e o número médio de ovulações e embriões, bem como os diâmetros foliculares, pelo teste *t* pareado entre ciclos dentro do mesmo grupo ou pelo teste *t* não pareado entre grupos diferentes. Uma probabilidade de $P < 0,05$ indica que a diferença foi significativa e uma probabilidade de $P \geq 0,05$ a $P < 0,1$ indica que a diferença se aproximou da significância estatística. O percentual de éguas com mais de uma ovulação tendeu ($P < 0,1$) a ser maior no ciclo tratado com EPE do que no controle (30,8 vs. 0%). Embora o número médio de ovulações tenha sido similar entre o tratamento com EPE e seu respectivo controle (1,2 e 0,9, respectivamente), o número médio de embriões recuperados tendeu ($P < 0,1$) a ser maior no ciclo tratado (1,1 vs. 0,6). O tratamento com eFSH provocou maior ($P < 0,05$) incidência de ovulações múltiplas (50 vs. 0%) e maior número médio de ovulações (1,6 vs. 1,0) em comparação ao controle. O diâmetro do maior folículo não foi afetado pelos tratamentos hormonais, mas o segundo maior folículo atingiu diâmetro máximo superior ($P < 0,05$) após

tratamento com eFSH quando comparado ao seu controle. Os tratamentos com as baixas doses de EPE ou eFSH utilizados no presente trabalho não interferem no desenvolvimento do maior folículo ovariano, mas prolongam a fase de crescimento do segundo maior folículo. Ambos tratamentos aumentam a incidência de ovulações múltiplas em éguas, sendo o eFSH o mais eficiente em aumentar a taxa de ovulação. Adicionalmente, esses protocolos de indução de ovulações múltiplas com baixas doses hormonais propiciam a recuperação de um embrião em média por lavado, o que já torna viável e interessante a aplicação comercial dos mesmos. Ainda assim, acreditamos que aumento nas doses diárias desses preparados hormonais – ainda utilizando doses abaixo das preconizadas na superovulação –, associado à seleção dos animais com base na população folicular pré-tratamento, podem produzir aumentos mais consistentes na incidência de ovulações duplas e triplas em éguas e melhorar a relação benefício/custo dos programas comerciais de transferência de embriões eqüinos.

Palavras-chave: superovulação; EPE; eFSH; ovulações múltiplas.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of low doses of equine pituitary extract (EPE) or purified equine FSH (eFSH) on follicular growth, ovulation rate and embryo recovery rate in mares. The experiment was conducted from October to December 2004 using 27 donors and 28 recipient mares belonging to the Mangalarga Marchador breed. After an embryo collection attempt on day 8 post-ovulation, all mares received an injection of luteolytic and were assigned to one of two experimental groups: EPE (n=13) or eFSH (n=14). For all mares two intervals between an embryo collection attempt and the subsequent ovulation were studied. The first served as a control cycle and the second as the treated cycle. In both cycles transrectal ultrasonography of the uterus and ovaries was performed daily to keep track of the two largest follicles. During estrus mares were inseminated every 48 h with fresh semen from a single stallion and received an injection of hCG (2,500 IU/IV) upon detection of at least one follicle of 35 to 40 mm in diameter. The treatments consisted of administration of EPE (4 mg/IM/s.i.d.; Group EPE) or eFSH (5 mg/IM/s.i.d.; Group eFSH) from day 8 (day 0 = ovulation) until the day before the induction of ovulation with hCG. The embryo collections were performed on day 8 post-ovulation and were always followed by administration of luteolytic. The percentage of mares with more than one ovulation was compared by means of Fischer's test and the mean number of ovulations and embryos, as well as follicular diameters, by paired Student's *t* test between cycles within the same group and by unpaired Student's *t* test between different groups. A probability of $P < 0.05$ indicates that the difference was significant and a probability of $P \geq 0.05$ to $P < 0.1$ indicates that the difference approached significance. The percentage of mares with more than one ovulation tended ($P < 0.1$) to be higher in the EPE-treated cycle than in the control (30.8 vs. 0%). Although the mean number of ovulations was similar between the EPE-treated cycle and its control, (1.2 and 0.9, respectively), the mean number of recovered embryos tended ($P < 0.1$) to be higher in the treated cycle (1.1 vs. 0.6). The eFSH treatment produced a greater ($P < 0.05$) incidence of multiple ovulations (50 vs. 0%) and mean number of ovulations (1.6 vs. 1.0) compared to the control. The diameter of the largest follicle was not altered by the hormonal treatments, but the second largest follicle attained a greater ($P < 0.05$) maximum diameter following eFSH treatment, compared to its control. The treatments with low doses of EPE or eFSH

used in the present study do not interfere on the development of the largest ovarian follicle, but enlarge the growth phase of the second largest follicle. Both treatments increase the incidence of multiple ovulations in mares, being the eFSH the most efficient in increasing the ovulation rate. Additionally, these multiple ovulation-inducing protocols with low doses of hormones provided recovery of one embryo on average per flush, what makes their commercial application viable and interesting. Even though, we believe that an increase in the daily doses of these preparations – still using doses below those recommended for superovulation –, associated with selection of animals based on the pre-treatment follicular population, can produce more consistent increases on the incidence of double and triple ovulations in mares and enhance the benefit/cost ratio of equine commercial embryo transfer programs.

Key words: superovulation; EPE; eFSH; multiple ovulations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do delineamento experimental ilustrando a ocorrência dos eventos e intervenções nos ciclos controle (A) e tratado (B). OV = ovulação; DX = dia da indução das ovulações.....	30
Figura 2: Diâmetro (média $\pm$ EPM) do maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D).....	46
Figura 3: Taxa de crescimento (média $\pm$ EPM) do maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D).....	47
Figura 4: Diâmetro (média $\pm$ EPM) do segundo maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D).....	48
Figura 5: Taxa de crescimento (média $\pm$ EPM) do segundo maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D).....	49
Figura 6: Diâmetros e taxas de crescimento (média $\pm$ EPM) do dois maiores folículos dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle (A e C) e tratado (B e D) do grupo EPE.....	50
Figura 7: Diâmetros e taxas de crescimento (média $\pm$ EPM) do dois maiores folículos dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle (A e C) e tratado (B e D) do grupo eFSH.....	51

Figura 8: Diâmetros e taxas de crescimento (média $\pm$ EPM) do dois maiores folículos dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 em éguas com ovulação simples (A e C) ou ovulações múltiplas (B e D) pós-tratamento com EPE ou eFSH.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros observados em éguas da raça Mangalarga Marchador em um ciclo controle e após tratamento com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.).....	35
Tabela 2: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros observados em éguas da raça Mangalarga Marchador em um ciclo controle e após tratamento com baixa dose de eFSH (5 mg s.i.d.).....	36
Tabela 3: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros observados em éguas da raça Mangalarga Marchador após tratamento com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.) ou eFSH (5 mg s.i.d.).....	37
Tabela 4: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador durante um período controle e após tratamento com baixa dose (4 mg s.i.d.) de EPE a partir do dia 8.....	40
Tabela 5: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador durante um período controle e após tratamento com baixa dose (5 mg s.i.d.) de eFSH a partir do dia 8.....	41
Tabela 6: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador após tratamento com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.) ou eFSH (5 mg s.i.d.) a partir do dia 8.....	42
Tabela 7: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador tratadas com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.) ou eFSH (5 mg s.i.d.) a partir do dia 8, agrupadas em função do resultado do tratamento (≥ 2 ovulações ou < 2 ovulações).....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
<i>Seleção e Dominância Folicular em Éguas</i>	15
<i>Superovulação em Éguas</i>	17
<i>Ovulações Múltiplas Naturais em Éguas</i>	23
3. OBJETIVO.....	26
4. MATERIAL E MÉTODO.....	28
<i>Período e Local do Experimento</i>	28
<i>Animais e Grupos Experimentais</i>	28
<i>Delineamento Experimental e Tratamentos</i>	28
<i>Exames Ultra-sonográficos e Definições</i>	31
<i>Colheita de Sêmen e, Inseminação Artificial</i>	31
<i>Colheita, Manipulação e Transferência dos Embriões</i>	32
<i>Diagnóstico de Gestação</i>	32
<i>Análise Estatística</i>	32
5. RESULTADO.....	35
<i>Taxas de Ovulação, Recuperação Embrionária e Gestação</i>	35
<i>Desvio Folicular, Intervalos, Diâmetros e Taxas de Crescimento Pontuais dos Dois Maiores Folículos</i>	37
<i>Diâmetros e Taxas de Crescimento Folicular Diários</i>	44
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A fêmea eqüina é por natureza monovular, o que significa dizer que a cada ciclo estral, geralmente, uma única ovulação irá ocorrer. A possibilidade de se incrementar o número de ovulações no ciclo estral da égua traz consigo potenciais benefícios, mais notadamente 1) aumento no número de ovócitos disponíveis para aplicação de diferentes técnicas de reprodução assistida; e 2) aumento no número de embriões recuperados em uma única colheita, com conseqüente redução dos custos do programa de transferência de embriões, sendo este indubitavelmente a “menina dos olhos” daqueles que recorrem ao uso de protocolos superovulatórios ou se dedicam ao aprimoramento dos mesmos.

Os esforços de manipulação do ciclo estral de éguas a fim de se produzir ovulações múltiplas já duram cerca de três décadas. Depois de muitos insucessos com a utilização de preparados hormonais rotineiramente utilizados para superovular fêmeas de outras espécies domésticas que não a eqüina, hoje se detém o conhecimento necessário para induzir ovulações múltiplas em éguas com razoável consistência utilizando-se extrato de pituitária eqüina (EPE) ou FSH purificado eqüino (eFSH). Entretanto, a observação de dados clínicos e de estudos na área revela a recuperação de um número de embriões muito aquém, em média, do número de ovulações obtidos em éguas superovuladas. Adicionalmente, tem sido relatada a ocorrência de efeitos adversos, tal qual a luteinização de folículos ovarianos e desenvolvimento de folículos anovulatórios em decorrência de tratamentos superovulatórios. Um outro inconveniente da superestimulação ovariana em éguas é a necessidade de se preparar muitas éguas receptoras frente à possibilidade da recuperação de um número excessivo de embriões. Isso pode implicar na utilização de receptoras de qualidade questionável e em maus resultados ou em perdas com a preparação de éguas quando não se obtém o número esperado de embriões.

Adicionalmente, é sabido que a ocorrência de ovulações duplas espontâneas em éguas é um fator que incrementa a recuperação de embriões. Assim sendo, alguns grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo dos fatores responsáveis pela baixa recuperação embrionária em éguas superovuladas e ao desenvolvimento de protocolos que driblem esses fatores, que produzam menos

efeitos adversos e promovam estimulação moderada e não excessiva dos ovários. Recentemente, Farinasso (2004) utilizou doses de EPE mais baixas do que as tradicionalmente utilizadas para superovulação e obteve aumento no número médio de ovulações – provocado pela maior incidência de ovulações duplas e triplas – e de embriões recuperados em éguas.

O referido trabalho nos motivou a investigar a aplicabilidade de uma baixa dose de eFSH para incrementar o número de ovulações e embriões recuperados em éguas, tendo em vista tratar-se do único preparado hormonal para superovulação de éguas disponível em escala comercial, comparando seus efeitos aos do EPE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Seleção e Dominância Folicular em Éguas

O conhecimento da fisiologia do desenvolvimento folicular ovariano e dos mecanismos que determinam a seleção e dominância folicular é base indispensável para a manipulação do ciclo estral em fêmeas, independente da espécie a que pertencem e da finalidade da intervenção.

Em éguas, o desenvolvimento folicular durante o ciclo estral geralmente ocorre na forma de uma onda folicular maior, a qual se inicia na metade de um intervalo interovulatório de 22-24 dias (GINTHER, 1992). A concentração plasmática de FSH se eleva e estimula a emergência da onda folicular, atinge um pico em média três dias mais tarde e então passa a declinar durante vários dias até atingir níveis basais. Enquanto isso, os folículos crescem em paralelo até que o maior folículo atinja cerca de 21-23 mm. A partir de então, o maior folículo geralmente torna-se dominante e continua a crescer enquanto os demais se tornam subordinados e apresentam uma interrupção ou redução do crescimento, caracterizando o fenômeno de desvio folicular (GASTAL et al., 1997). Aparentemente, o maior folículo torna-se dominante antes que o segundo maior folículo possa atingir um diâmetro similar.

Baseado em um estudo realizado com vacas, foi postulado que a essência do mecanismo de seleção folicular encontra-se em uma associação funcional de mão-dupla entre as concentrações de FSH e os folículos. O futuro folículo dominante e os subordinados contribuem para a redução das concentrações de FSH da emergência até o desvio, apesar de continuarem sendo estimulados por essas concentrações decrescentes. No início da divergência, o futuro folículo dominante é o principal responsável pelo efeito depressor sobre as concentrações de FSH – pois produz grandes quantidades de estradiol e inibina – e continua a crescer sob estímulo dessas reduzidas concentrações, enquanto os folículos subordinados não mais respondem à reduzida quantidade de FSH e regridem (GINTHER et al., 2000). Em éguas, a queda nas concentrações plasmáticas de FSH é, desde o início até o esperado momento do desvio folicular, função de múltiplos folículos da onda folicular e atribuída à secreção de inibina (DONADEU & GINTHER,

2001). Posteriormente, o maior folículo contribui praticamente sozinho para a contínua supressão das concentrações de FSH (DONADEU & GINTHER, 2003).

Após o desvio folicular, o crescimento do folículo dominante passa a depender aparentemente das elevadas concentrações de LH (GINTHER, 2000). A redução induzida dessas concentrações ao redor do esperado momento do desvio folicular em éguas não impediu a ocorrência do mesmo, mas comprometeu o crescimento do maior folículo após o desvio (GASTAL et al., 1999). Em novilhas, foi demonstrado que o aumento nas concentrações de LH ao redor do momento do desvio folicular é responsável pelo aumento nas concentrações de estradiol e IGF-I no fluido folicular. Em éguas, a redução das concentrações circulantes de LH preveniu o aumento nas concentrações circulantes de estradiol e inibina antes do esperado dia do desvio folicular (BERGFELT et al., 2001).

Vários fatores presentes no fluido intrafolicular parecem exercer papéis importantes na expressão de dominância pelo maior folículo. O fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), na sua forma livre, amplifica a ação do FSH nas células da granulosa (ADASHI et al., 1989); a activina-A estimula a atividade da aromatase e a secreção de estradiol pelas células da granulosa de vacas, ratos e primatas (KNIGHT & GLISTER, 2001); a inibina-A tem função estimulante da produção de andrógenos induzida pelo LH, andrógenos que servem de substrato para a síntese de estradiol pelas células da granulosa (KNIGHT & GLISTER, 2001). Em estudo recente, fluido folicular dos três maiores folículos (F_1 , F_2 e F_3) de uma onda folicular induzida foi colhido em diferentes momentos, de acordo com o diâmetro de F_1 . As concentrações de androstenediona aumentaram nos três maiores folículos antes do momento esperado do desvio. Entretanto, as concentrações de estradiol, IGF-I, activina-A e inibina-A aumentaram somente em F_1 momentos antes do desvio, permanecendo mais elevadas em F_1 do que em F_2 e F_3 nas fases subseqüentes do desenvolvimento folicular (DONADEU & GINTHER, 2002).

Utilizando um modelo que consiste na aspiração do maior folículo no momento esperado do desvio com o intuito de se estudar o desvio produzido experimentalmente entre o segundo (F_2) e o terceiro maior folículo (F_3) em éguas, Ginther et al. (2002) verificaram que as concentrações de IGF-I livre no fluido

folicular aumentaram significativamente em F_2 e foram superiores ($P < 0,05$) às de F_3 no início do desvio folicular experimental. Os autores sugeriram que o IGF-I livre exerceu um papel fundamental na conversão de F_2 em folículo dominante. Em estudo posterior, a concentração de IGF-I livre no maior folículo foi reduzida experimentalmente por meio da injeção intrafolicular de proteína ligadora de IGF tipo 3 (IGFBP-3). As concentrações de IGF-I livre, estradiol, activina-A e inibina-A foram menores e as de androstenediona maiores no grupo tratado em comparação ao controle. No grupo tratado, as ovulações ocorreram primariamente do segundo maior folículo, enquanto no grupo controle o maior folículo tornou-se dominante e ovulou na maioria das vezes (GINTHER et al., 2004a). Os autores concluíram que o sistema IGF tem papel fundamental nas diferenças de concentração dos fatores intrafoliculares entre o futuro folículo dominante e os folículos subordinados e conseqüentemente no desvio e seleção folicular em éguas.

É importante ressaltar que antes do desvio folicular mais de um folículo possui a capacidade de tornar-se dominante. Quando o maior folículo da onda foi aspirado em éguas no esperado momento do início do desvio, o segundo maior folículo continuou a crescer sem interrupção (GASTAL et al., 1999). Em contrapartida, quando o maior folículo foi aspirado 24 h após o esperado início do desvio, o segundo maior folículo geralmente não se tornou dominante (GINTHER et al., 2004b). Recentemente, Gastal et al. (2004) demonstraram que a capacidade para a dominância é similar entre os quatro maiores folículos no esperado início do desvio, mas que a dominância de um folículo menor é bloqueada na presença de um folículo de maior diâmetro. Os mesmos autores demonstraram também que o segundo maior folículo mantém seu potencial para dominância por até dois dias após o início do desvio folicular.

Superovulação em Éguas

O principal desafio a ser vencido pelo tratamento superovulatório é estimular e manter o desenvolvimento de folículos que durante um ciclo normal teriam o crescimento inibido e sofreriam atresia (PIERSON & GINTHER, 1990). Dessa forma, os tratamentos superovulatórios baseiam-se na disponibilização de quantidades suficientes de FSH para o crescimento folicular, quer pela administração direta dessa gonadotrofina contida nos preparados, quer por meio da

imunização contra a inibina ou administração de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).

O uso de GnRH e análogos com o intuito de induzir múltiplas ovulações é uma prática pouco empregada atualmente por possuir algumas limitações. Os métodos descritos na literatura como sendo capazes de aumentar a incidência de ovulações múltiplas em éguas envolvem utilização de doses elevadas de GnRH e numerosas aplicações ou sistemas de liberação contínua por meio de bombas, restringindo seu uso na prática (JOHNSON, 1986, 1987; GINTHER & BERGFELT, 1990). Além disso, a eficácia do tratamento com GnRH durante a estação ovulatória é reduzida devido ao “feedback” negativo de hormônios ovarianos sobre a liberação de FSH, sendo seu uso mais efetivo durante o anestro (MCCUE, 1996).

A inibina é um hormônio protéico que tem um efeito específico sobre a secreção de FSH e pouca, ou nenhuma ação, sobre a secreção de LH (GINTHER, 1992). Nas fêmeas é produzida pelas células da granulosa e exerce efeito inibitório sobre a secreção de FSH pela hipófise (GINTHER, 1992). A principal fonte de inibina é o folículo dominante, e seu efeito depressor sobre as concentrações de FSH é determinante para a inibição do crescimento e atresia dos folículos subordinados durante a onda folicular (DONADEU & GINTHER, 2001). Taxas de 2,3 ovulações por égua (MCKINNON et al., 1992) e 2,8 (MCCUE et al., 1992) foram reportadas após imunização ativa contra inibina. Indução de múltiplas ovulações em éguas por meio de imunização passiva contra a inibina também tem sido relatada. McCue et al. (1993) obtiveram 50% de ovulações múltiplas entre os animais tratados com plasma anti-inibina ($1,6 \pm 0,2$ ovulações/égua) e Nambo et al. (1998) obtiveram em média mais ($P < 0,05$) ovulações após aplicarem em éguas soro anti-inibina durante o diestro do que no grupo controle (4,5 vs. 1,25 ovulações/égua; $n=4$). Entretanto, a ocorrência de efeitos adversos tais quais reações locais e choque anafilático foram descritas, o que desencorajou a continuidade dos estudos e a aplicação dos métodos de imunização contra a inibina (MCCUE et al., 1996).

Os primeiros relatos da utilização de FSH para indução de múltiplas ovulações em éguas se referem ao uso de FSH suíno (FSH-P), devido à sua ampla disponibilidade. Em síntese, a administração dessa gonadotrofina em éguas duas vezes ao dia, da metade ou final do diestro até o início do estro, forneceu resultados

pouco satisfatórios no que diz respeito à taxa de ovulação e número de éguas manifestando mais que uma ovulação por ciclo estral. Além de produzir uma resposta bem inferior à obtida na espécie bovina, trata-se de um método oneroso por requerer administração de elevadas doses – cerca de 70 vezes mais do que o necessário para superovular vacas – sendo, portanto, de aplicação restrita (SQUIRES et al., 1986). Em estudos subsequentes, avaliou-se a eficácia de preparados contendo frações enriquecidas de FSH de origem eqüina (eFSH) na superovulação de éguas. A administração de 25 mg de eFSH uma vez ao dia gerou em média mais ($P<0,05$) ovulações e embriões recuperados por égua em comparação ao controle (4,6 e 2,0 vs. 1,0 e 0,4, respectivamente; ROSAS et al., 1998). De maneira similar, Machado et al. (2003) administraram 12,5 mg de um preparado comercial à base de eFSH duas vezes ao dia durante o diestro e obtiveram mais ($P<0,05$) ovulações e embriões do que no grupo controle (4,2 e 2,2 vs. 1,0 e 0,4, respectivamente).

O extrato de pituitária eqüina (EPE) tem sido o preparado mais utilizado em estudos sobre indução de múltiplas ovulações em éguas (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Taxas de ovulação entre 1,6 (LAPIN & GINTHER, 1977) e 3,8 (SQUIRES et al., 1987a) foram reportadas com o uso do EPE em uma única aplicação diária. Recentemente, um novo protocolo com EPE proposto por Alvarenga et al. (2001) propiciou uma das mais significativas melhorias na resposta de éguas à superovulação, aumentando o interesse pelos estudos voltados para esse assunto. Utilizando duas aplicações diárias de 25 mg de EPE em éguas durante a estação ovulatória, Alvarenga et al. (2001) obtiveram uma taxa de ovulação significativamente maior ($P<0,05$) do que a obtida com uma única aplicação de 25 mg (7,1 vs. 2,4). Posteriormente, Scoggin et al. (2002) concluíram que uma maior frequência de administração do EPE (duas vezes ao dia) propiciou uma melhor recuperação embrionária em éguas.

Atualmente têm sido testados protocolos de superovulação em éguas com doses decrescentes de EPE e administração em duas aplicações diárias. Esses protocolos têm como base as evidências de que em vacas o fracionamento do FSH em duas aplicações diárias, associado à redução gradativa da dose, produz taxas de ovulação e de recuperação embrionária melhores do que a administração em uma única aplicação diária e em doses constantes (MONNIAUX et al., 1983).

Scoggin et al. (2002) trataram éguas a partir dos dias 6 a 11 do diestro com doses decrescentes de EPE duas vezes ao dia, após administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e induziram as ovulações com hCG na presença de folículos de 35 mm de diâmetro. Obtiveram em média 3,3 ovulações por égua e 88,9% (8/9) de animais com duas ou mais ovulações. Em estudo que comparou o tratamento superovulatório a base de doses constantes com o de doses decrescentes de EPE (n=6 animais/grupo), Carmo (2003) encontrou diferenças numéricas favoráveis ao protocolo com doses decrescentes nas taxas de ovulação (5,0 vs. 3,5; $P=0,26$) e de recuperação embrionária (1,8 vs. 1,2; $P=0,24$), mas essas não foram estatisticamente significativas.

Lapin & Ginther (1977) reportaram que o uso de hCG no final do tratamento com EPE reduziu ($P<0,05$) o intervalo do início do tratamento à ovulação em aproximadamente dois dias. Posteriormente, Woods & Ginther (1983a) observaram uma maior ($P<0,05$) taxa de ovulação nas éguas superovuladas que haviam recebido hCG em relação às que não receberam. Um outro método eficaz de apressar e sincronizar as ovulações ao final dos tratamentos superovulatórios em éguas é a administração intravenosa do próprio EPE na dose de 25 mg (HOFFERER et al., 1993; PALMER et al., 1993; ROSAS et al., 1998).

Dippert et al. (1992) compararam as respostas superovulatórias entre éguas tratadas com EPE a partir do dia 5 ou 12 pós-ovulação e concluíram que iniciando-se o tratamento mais precocemente no diestro obtem-se uma melhor resposta no desenvolvimento folicular e no número de ovulações. Iniciando o tratamento superovulatório com EPE em éguas em diferentes estádios do desenvolvimento folicular, Pierson & Ginther (1990) verificaram superestimulação ovariana em resposta aos tratamentos iniciados quando o maior folículo atingiu 15, 20, ou 25 mm em diâmetro. Entretanto, quando o tratamento com EPE foi iniciado após o maior folículo ter atingido o diâmetro de 30 mm não houve resposta superestimulatória, tendo sido isso creditado ao estabelecimento da dominância folicular por parte do maior folículo e comprometimento dos demais folículos com o processo de atresia. Esses achados estão de acordo com a constatação de que na espécie bovina os tratamentos superovulatórios evocam melhores respostas

ovarianas quando iniciados na ausência de um folículo dominante (BUNGARTZ & NIEMANN, 1994).

Woods & Ginther (1983b,1984) divulgaram os primeiros relatos referentes à colheita de múltiplos embriões de éguas superovuladas. Verificaram que o tratamento superovulatório com EPE resultou em um maior ($P<0,01$) número de embriões recuperados por égua, em comparação com os animais não tratados (2,9 vs. 0,7), tendo sido a taxa de recuperação embrionária por ovulação similar ($P>0,1$) entre as éguas superovuladas e as controle. Desde então, essa é uma realidade que tem sido constatada na maioria dos trabalhos, à exceção do desenvolvido por Palmer et al. (1993), em que se relatou a recuperação de apenas 0,6 embriões por égua superovulada. A grande maioria dos autores relata um número de embriões recuperados aquém do esperado quando se leva em conta o número de ovulações com a utilização do EPE e com outros tratamentos superovulatórios.

Palmer et al. (1993) especularam que em éguas superovuladas poderiam haver falhas na liberação do oócito por parte dos folículos durante a ovulação, que os oócitos seriam de má qualidade ou que haveria fecundidade normal seguida de perda embrionária precoce. Porém, Dippert et al. (1994), coletando ovários e ovidutos de éguas superovuladas e não superovuladas dois dias após a última ovulação, não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos de animais no que diz respeito ao número de ovulações que resultaram em embriões e no posterior desenvolvimento embrionário *in vitro*. Posteriormente, Bézard et al. (1995) verificaram que embora o ambiente folicular seja diferente em éguas superovuladas, em comparação às não superovuladas, a maturação ovocitária é alcançada em ambos os grupos de animais. Ainda assim, sabe-se que em vacas o tratamento superovulatório pode causar distúrbios na maturação folicular e ovocitária (MOOR et al., 1984) e no transporte de gametas (HAWK, 1988), fatores que contribuem para a recuperação de um grande número de estruturas não fertilizadas e degeneradas a despeito de se conseguir uma resposta superovulatória satisfatória. Carmo et al. (2005) investigaram a relação entre o número de ovulações e o número de oócitos viáveis recuperados por lavado da tuba uterina, 12 a 24 horas após a primeira ovulação, de éguas superovuladas e não superovuladas, observaram que o percentual de oócitos viáveis recuperados por ovulação nas éguas superovuladas foi inferior quando comparado às éguas não superovuladas (60,38% vs. 85,71%).

Squires et al. (1987a) demonstraram não haver diferenças entre as taxas de prenhez de receptoras de embriões oriundos de éguas com múltiplas ovulações naturais ou induzidas ou com uma única ovulação. Posteriormente, a viabilidade de embriões oriundos de éguas superovuladas foi confirmada por Scoggin et al. (2002), que obtiveram 41,7% (5/12) de prenhez após trasferirem embriões colhidos de éguas superovuladas e refrigerados por 24 horas.

Estudos específicos sobre os efeitos da administração de EPE em ciclos subseqüentes 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, não tendo sido encontrado diferença na resposta superovulatória de éguas entre os tratamentos realizados no primeiro e segundo ciclo estral (WOODS & GINTHER, 1985; PALMER et al., 1993; CARMO, 2003). Hofferer et al. (1991) verificaram apenas uma tendência a uma melhor resposta no segundo ciclo tratado (3,2 vs. 2,2 ovulações/égua; $P=0,07$). No mesmo estudo, observaram também que a administração contínua de EPE a éguas por 94 dias não impediu a ocorrência de crescimento folicular e ovulações, mas perturbou o padrão de ondas característico do desenvolvimento folicular.

Visando a reduzir os custos do tratamento superovulatório e evitar a estimulação ovariana excessiva, Farinasso (2004) trabalhou com doses baixas do mesmo preparado em éguas ciclantes. O referido autor obteve média de 1,92 e 1,84 ovulações por égua com o uso de 4 ou 6 mg de EPE uma vez ao dia, resultado superior ($P<0,001$) ao obtido nos grupos controle (1,08 e 1,15, respectivamente). Os tratamentos com 4 e 6 mg diárias de EPE induziram mais de uma ovulação em 76,9% das éguas tratadas, comparado a 7,7 e 15,4% nos respectivos controles ($P<0,01$). Adicionalmente, o tratamento com 6 mg de EPE possibilitou a recuperação de mais ($P<0,05$) embriões por égua em comparação ao controle (1,31 vs. 0,54).

Aumento na incidência de duplas ovulações em éguas após o uso de FSH de origem suína (FSH-P) já foi reportado. Sirois et al. (1992) administraram 0, 8, 16 ou 32 mg de Folltropin® a cada 12 horas em éguas a partir do dia 6 do ciclo estral (dia 0=ovulação) e obtiveram 40, 80, 60 e 40% de ovulações duplas respectivamente. Devido ao fato da produção comercial e utilização de FSH

purificado eqüino serem muito recentes, ainda não foram testadas doses mais baixas do que a inicialmente utilizada na superovulação de éguas.

Ovulações Múltiplas Naturais em Éguas

É sabido que na espécie eqüina existe uma ocorrência natural de ovulações múltiplas, geralmente dupla ovulação, sendo a incidência de ovulações triplas muito baixa (GINTHER, 1992). A incidência de ovulações duplas é extremamente variável entre raças e indivíduos, tendo sido relatada uma maior freqüência na raça Puro Sangue Inglês do que na Árabe e Quarto de Milha (GINTHER, 1992). Em levantamento recente, Carmo et al. (2002) analisaram 829 ciclos estrais em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e observaram um percentual de 53% de ovulações múltiplas. Outra evidência do caráter genético ligado à incidência de ovulações múltiplas é que a predisposição à múltipla ovulação parece ser herdada e tende a se repetir em um mesmo indivíduo (GINTHER, 1992; LOSINNO et al., 2000).

As freqüências de ovulações múltiplas uni e bilaterais e suas implicações em um programa de transferência de embriões foram recentemente estudadas por Carmo et al. (2003) analisando-se 342 ciclos estrais de éguas da raça Brasileiro de Hipismo. A incidência de ovulações múltiplas unilaterais foi similar ($P>0,05$) à de ovulações bilaterais (53 e 47%, respectivamente), corroborando os achados de Squires et al. (1987b). A freqüência de colheitas com recuperação de pelo menos um embrião foi maior ($P<0,05$) para as ovulações bilaterais do que para as unilaterais (83 vs. 53%), bem como a taxa de recuperação embrionária por ciclo estral (129 vs. 70%). Menor recuperação embrionária associada a ovulações duplas unilaterais em comparação às bilaterais também foi reportada por Squires et al. (1987b) e Riera et al. (2004). Os últimos observaram também que a freqüência de colheitas com recuperação de dois embriões foi maior ($P<0,001$) após ovulações duplas bilaterais do que unilaterais (50 vs. 37%).

Losinno et al. (2000) analisaram 944 ciclos estrais em um programa comercial de transferência de embriões eqüinos e relataram que as taxas de recuperação embrionária para ciclos com dupla ou tripla ovulação foram maiores

($P < 0,05$) do que para ciclos com ovulação simples (1,17 e 1,41 vs. 0,66, respectivamente), demonstrando o impacto positivo das múltiplas ovulações.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de baixas doses de extrato de pituitária ou FSH purificado eqüino no crescimento folicular, taxa de ovulação e de recuperação embrionária em éguas. Visou, adicionalmente, a desenvolver um protocolo de tratamento hormonal com os fármacos supracitados capaz de aumentar a incidência de ovulações duplas e triplas e gerar incremento na recuperação de embriões eqüinos, diminuindo custos e melhorando a eficiência dos programas comerciais de transferência de embriões na espécie.

4. MATERIAL E MÉTODO

Período e Local do Experimento

O presente trabalho foi realizado durante a estação reprodutiva 2004/2005, mais especificamente entre os meses de outubro a dezembro de 2004, nas dependências do Haras Santa Esmeralda, situado no município de Esmeraldas, MG, Brasil (19°45'45" S).

Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizadas 27 éguas doadoras de embrião da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 3 e 20 anos e pesando 350 a 450 Kg. Um grupo de 28 éguas receptoras de embrião pertencentes à mesma raça, com idade entre 3 e 12 anos e peso entre 350 e 450 Kg também foi utilizado. Todas as éguas utilizadas estavam em plena atividade reprodutiva e não possuíam quaisquer anormalidades no trato reprodutivo que pudessem ser detectadas por exame de palpação ou ultrassonografia transretal.

As éguas doadoras eram mantidas em piquetes de capim *coast cross* [*Cynodon dactylon*] com acesso a água e sal mineralizado à vontade, além de receberem suplementação com feno de gramínea (*Cynodon niemfluesis*) e 2 kg de ração comercial peletizada própria para eqüinos duas vezes ao dia. As éguas receptoras eram mantidas em pastagens nativas com livre acesso a água e sal mineralizado, tendo sua alimentação complementada com capim (*Pennisetum purpureum*) picado e 1 Kg de ração comercial peletizada própria para eqüinos uma vez ao dia.

Dois grupos experimentais foram constituídos com base nos tratamentos administrados às éguas doadoras: 1) Grupo EPE (n=13) e 2) Grupo eFSH (n=14).

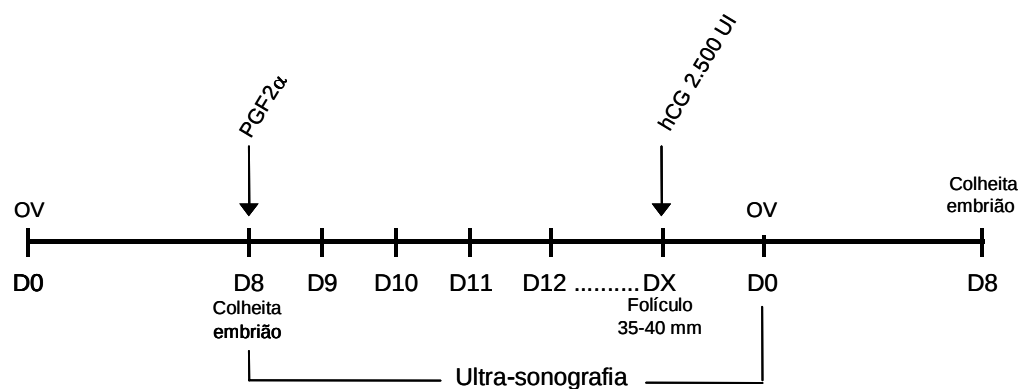
Delineamento Experimental e Tratamentos

Após terem sido monitoradas e inseminadas durante o estro imediatamente anterior ao início do experimento, as éguas doadoras foram submetidas ao procedimento de colheita de embrião no oitavo dia pós-ovulação. Nesse mesmo dia, as mesmas recebiam, por via intramuscular, 7,5 mg de dinoprost-

trometamina (Lutalyse®; Pharmacia & Upjohn, Co., Kalamazoo, MI, EUA) e eram incluídas, de maneira alternada, em um dos grupos experimentais. Dois ciclos estrais consecutivos foram monitorados em todas as éguas pertencentes a cada um dos grupos experimentais, de modo que o primeiro ciclo estudado serviu de controle e no segundo foram realizados os tratamentos a base de extrato de pituitária (EPE) ou FSH purificado eqüino (eFSH). Dessa forma, cada animal utilizado foi o seu próprio controle. Os períodos de monitoramento foram sempre do oitavo dia pós-ovulação (dia da colheita de embrião) até a ovulação seguinte, quer no primeiro ciclo (controle), quer no segundo (ciclo tratado). As colheitas de embrião eram sempre seguidas da administração de agente luteolítico.

Passado o ciclo controle e finalizada a colheita de embrião no oitavo dia pós-ovulação, eram iniciados os tratamentos para indução de ovulações múltiplas a base de extrato de pituitária ou FSH purificado eqüino. Esses tratamentos foram administrados do dia 8 até o dia anterior à indução das ovulações. Os animais pertencentes ao Grupo EPE (n=13) receberam 4 mg de extrato de pituitária eqüina por via intramuscular uma vez ao dia durante o período especificado. O extrato de pituitária utilizado no presente trabalho foi produzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp-Botucatu, SP, Brasil, conforme descrito (CARMO, 2003). As éguas do Grupo eFSH (n=14) receberam 5 mg de FSH purificado eqüino (eFSH; Bioniche Animal Health USA, Inc., Athens, GA, EUA) por via intramuscular, uma vez ao dia, durante o período previamente especificado. As ovulações foram induzidas por meio da administração de 2.500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), mediante a detecção de pelo menos um folículo ovariano com 35 a 40 mm de diâmetro. A Figura 1 mostra esquematicamente o delineamento experimental utilizado no presente trabalho.

A) Ciclo Controle



B) Ciclo Tratado

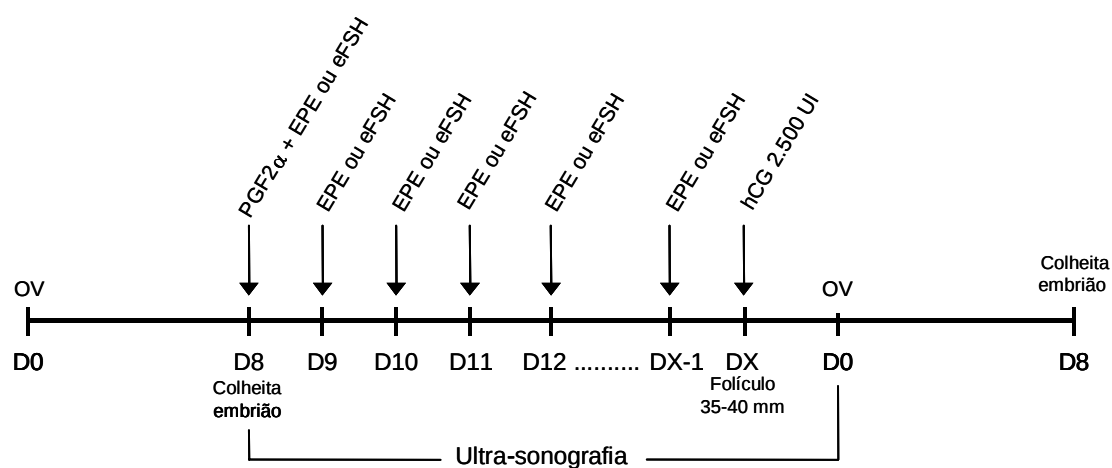


Figura 1: Esquema do delineamento experimental ilustrando a ocorrência dos eventos e intervenções nos ciclos controle (A) e tratado (B). OV = ovulação; DX = dia da indução das ovulações.

Exames Ultra-sonográficos e Definições

Em ambos os ciclos estudados, desde o dia 8 (dia 0 = ovulação) imediatamente antes da colheita do embrião, até a ovulação seguinte, as éguas doadoras tiveram a atividade ovariana e condição uterina monitoradas diariamente por ultra-sonografia transretal com auxílio de um aparelho (SA-600V; Medison Co. Ltd, Daechi-dong, Kangnam-ku, Seul, Coréia) equipado com um transdutor linear de 5 MHz. Os diâmetros dos dois maiores folículos foram determinados por meio da média aritmética entre a maior distância obtida no antro folicular e sua transversal, em uma única imagem congelada no monitor do aparelho de ultra-sonografia (GINTHER, 1995) em somente 10 éguas do Grupo EPE e em 11 éguas do grupo eFSH.

A designação dos folículos se baseou no máximo diâmetro atingido pelos mesmos, sendo o folículo 1 (F_1) aquele que atingiu maior diâmetro máximo e folículo 2 (F_2) o de segundo maior diâmetro. Os folículos foram desenhados em ficha própria de acordo com suas posições nos ovários, sendo usado como referência a presença do corpo lúteo e outros folículos a fim de manter-se a identidade dos dois maiores folículos. O desvio folicular foi definido como o dia que antecedeu o aumento na diferença de diâmetro entre F_1 e F_2 .

As receptoras de embrião tiveram a atividade ovariana e condição uterina monitoradas por palpação ou ultra-sonografia transretal em dias alternados com intuito de detectar a ocorrência das ovulações.

Colheita de Sêmen e Inseminação Artificial

Sêmen proveniente de um único garanhão de fertilidade comprovada foi utilizado para as inseminações. Após a colheita, realizada com auxílio de uma égua em cio, por meio de vagina artificial própria para garanhões, o sêmen era filtrado para a remoção da fração gelatinosa. A concentração espermática era determinada com auxílio de uma câmara de Neubauer, a motilidade espermática avaliada em microscópio óptico e o sêmen diluído na proporção de 1:2 em meio diluente à base de leite desnatado (KENNEY et al., 1975).

Durante o estro, após a detecção de pelo menos um folículo com 35 mm de diâmetro, as éguas eram inseminadas com no mínimo 500×10^6 espermatozoides móveis. As inseminações foram repetidas a cada 48 horas, quando necessário, até que fosse detectada a ovulação. Quando ocorreu o desenvolvimento de mais de um folículo pré-ovulatório as inseminações foram realizadas no máximo até 24 horas após a primeira ovulação. Vale ressaltar que os protocolos de inseminação artificial e indução das ovulações foram os mesmos para os ciclos controle e tratado.

Colheita, Manipulação e Transferência dos Embriões

Os embriões foram recuperados no oitavo dia pós-ovulação por meio de lavagem uterina usando 3 L de solução de Ringer com lactato, a 35 °C, conforme descrito (ALVARENGA et al., 1993). Após a identificação do embrião, o mesmo era lavado e mantido por menos de uma hora em meio de manutenção filtrado (Emcare[®]; ICP, Auckland, Nova Zelândia) até o momento da transferência.

Os embriões foram transferidos através do método não-cirúrgico (transcervical) para receptoras ciclantes que haviam ovulado entre 4 e 7 dias antes da transferência. Os embriões eram acondicionados entre colunas de meio de manutenção e ar no interior de uma pipeta de inseminação artificial com uma seringa de 1 mL acoplada à sua extremidade. A pipeta era recoberta então por uma camisa sanitária plástica. Antes da transferência as receptoras tinham a cauda enfaixada, o conteúdo fecal retirado da ampola retal e as regiões perivulvar e perianal higienizadas. A pipeta contendo o embrião era conduzida através da cérvix da receptora, a camisa sanitária rompida e o embrião depositado lentamente no corpo do útero.

Diagnóstico de Gestação

As receptoras foram examinadas por meio de ultra-sonografia transretal seis a sete dias após a transferência do embrião para se determinar a presença ou não de vesícula embrionária.

Análise Estatística

Valores percentuais para variáveis qualitativas foram comparados pelo teste de Fischer. Variáveis quantitativas (número de folículos, ovulações e

embriões, intervalos, dias de ocorrência, diâmetros e taxas de crescimento foliculares) foram comparadas pelo Teste *t* pareado dentro de um mesmo grupo de animais e pelo Teste *t* não pareado entre grupos de animais diferentes. Para a comparação de diâmetros e taxas de crescimento foliculares diários, os dados foram normalizados para o primeiro dia de monitoramento em cada ciclo (dia 8) e para o dia da ovulação (dia 0), tendo sido analisados somente os dias em que os dados de todos os animais puderam ser incluídos. Dessa forma, foram estudados os períodos do dia 8 ao 13 e do dia -6 a -1. Uma probabilidade de $P < 0,05$ indica que a diferença foi significativa e uma probabilidade de $P \geq 0,05$ a $P < 0,1$ indica que a diferença se aproximou da significância estatística. Os dados observados são apresentados em tabelas e figuras na forma de média $\pm$ EPM.

5. RESULTADO

Taxas de Ovulação, Recuperação Embrionária e Gestação

Conforme mostra a Tabela 1, o tratamento com baixa dose de EPE resultou em tendência ($P<0,1$) ao desenvolvimento de um maior número de folículos ≥ 30 mm de diâmetro em comparação ao controle. No entanto, o número médio de folículos pré-ovulatórios (≥ 35 mm) bem como o número de ovulações por égua foi similar entre os ciclos controle e tratado. O percentual de éguas que apresentaram 2 ou mais ovulações e o número médio de embriões recuperados por égua tenderam ($P<0,1$) à superioridade no ciclo tratado com EPE quando comparado ao controle. Não foram observadas diferenças significativas no número médio de folículos luteinizados, no percentual de éguas que apresentaram luteinização folicular e no percentual de embriões recuperados por ovulação entre os ciclos controle e tratado.

Tabela 1: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros observados em éguas da raça Mangalarga Marchador em um ciclo controle e após tratamento com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.)

Parâmetro	Grupo EPE	
	Controle	Tratado
Número de animais	13	13
Folículos ≥ 30 mm por égua	$1,2 \pm 0,1^y$	$1,7 \pm 0,2^x$
Folículos ≥ 35 mm por égua	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
Ovulações por égua	$0,9 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$
Éguas com ≥ 2 ovulações (%)	0/13 (0) ^y	4/13 (30,8) ^x
Folículos luteinizados por égua	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
Éguas com folículos luteinizados (%)	1/13 (7,7)	1/13 (7,7)
Embriões por égua	$0,6 \pm 0,1^y$	$1,1 \pm 0,2^x$
% embriões por ovulação	66,7	87,5

^{x,y} Letras diferentes na mesma linha indicam tendência à significância estatística ($P<0,1$).

No grupo eFSH foram observados, após tratamento, mais ($P<0,05$) folículos ≥ 30 mm de diâmetro, folículos pré-ovulatórios (≥ 35 mm) e ovulações em comparação ao ciclo controle. O percentual de éguas com duas ou mais ovulações também foi significativamente maior no ciclo tratado quando comparado ao controle.

No entanto, o número médio de embriões recuperados por égua e o percentual de embriões recuperados por ovulação foram similares ($P>0,05$) entre os ciclos, bem como o número de folículos luteinizados e o percentual de éguas que apresentaram luteinização folicular (Tabela 2).

Tabela 2: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros observados em éguas da raça Mangalarga Marchador em um ciclo controle e após tratamento com baixa dose de eFSH (5 mg s.i.d.)

Parâmetro	Grupo eFSH	
	Controle	Tratado
Número de animais	14	14
Folículos ≥ 30 mm por égua	$1,0 \pm 0,0^b$	$1,9 \pm 0,2^a$
Folículos ≥ 35 mm por égua	$1,0 \pm 0,0^b$	$1,7 \pm 0,2^a$
Ovulações por égua	$1,0 \pm 0,0^b$	$1,6 \pm 0,2^a$
Éguas com ≥ 2 ovulações (%)	0/14 (0) ^b	7/14 (50,0) ^a
Folículos luteinizados por égua	0	$0,1 \pm 0,1$
Éguas com folículos luteinizados (%)	0	2/14 (14,3)
Embriões por égua	$0,8 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$
% embriões por ovulação	78,6	60,9

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística ($P<0,05$).

Quando confrontados os resultados dos dois tratamentos (EPE e eFSH), observou-se similaridade ($P>0,05$) no número médio de folículos com diâmetro igual ou superior a 30 mm e no número de ovulações, embora o tratamento com eFSH tenha resultado em mais ($P<0,05$) folículos de diâmetro pré-ovulatório. Apesar de não ter havido diferença significativa no número médio de embriões recuperados por égua, a taxa de recuperação embrionária por ovulação tendeu ($P<0,1$) a ser maior após tratamento com EPE (Tabela 3). Adicionalmente, a duração do tratamento com eFSH tendeu ($P<0,1$) a ser inferior a do tratamento com EPE em aproximadamente um dia.

Tabela 3: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros observados em éguas da raça Mangalarga Marchador após tratamento com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.) ou eFSH (5 mg s.i.d.)

Parâmetro	Tratamento	
	EPE	eFSH
Número de animais	13	14
Duração do tratamento	$6,7 \pm 0,4^y$	$5,6 \pm 0,3^x$
Folículos ≥ 30 mm por égua	$1,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$
Folículos ≥ 35 mm por égua	$1,1 \pm 0,1^b$	$1,7 \pm 0,2^a$
Ovulações por égua	$1,2 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$
Éguas com ≥ 2 ovulações (%)	4/13 (30,8)	7/14 (50,0)
Folículos luteinizados por égua	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
Éguas com folículos luteinizados (%)	1/13 (7,7)	2/14 (14,3)
Embriões por égua	$1,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
% embriões por ovulação	87,5 ^x	60,9 ^y

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística ($P < 0,05$).

^{x,y} Letras diferentes na mesma linha indicam tendência à significância estatística ($P < 0,1$).

No grupo EPE, oito embriões foram transferidos no ciclo controle e 14 no ciclo tratado com taxas de gestação de 87,5% (7/8) e 71,4% (10/14), respectivamente. No grupo eFSH, 11 embriões foram transferidos no ciclo controle e 14 no ciclo tratado, com taxas de gestação de 100% (11/11) e 71,4% (10/14), respectivamente.

Desvio Folicular, Intervalos, Diâmetros e Taxas de Crescimento Pontuais dos Dois Maiores Folículos

Os efeitos dos tratamentos hormonais sobre alguns dos parâmetros foliculares em momentos e intervalos específicos foram estudados. As Tabelas 4 a 7 mostram esses resultados nos diferentes grupos de animais.

O tratamento com baixa dose de EPE não produziu mudanças marcantes, em média, no desenvolvimento dos dois maiores folículos ovarianos (Tabela 4). O intervalo entre o início do experimento (dia 8) e a administração de hCG tendeu a ser

menor no ciclo tratado do que no controle (6,8 vs. 7,8 dias; $P=0,063$). Entretanto, o intervalo interovulatório não foi significativamente alterado.

Não foram observadas diferenças significativas nos diâmetros dos dois maiores folículos entre os ciclos controle e tratado no dia 8, no desvio e ao máximo diâmetro, bem como na diferença de diâmetro entre os dois maiores folículos nos mesmos momentos. Desvio folicular foi detectado somente em 6 animais nos ciclos controle e tratado. No ciclo controle isso se deveu à ocorrência de co-dominância em uma égua e ao não crescimento de um segundo maior folículo em paralelo ao maior em três éguas. No ciclo tratado houve co-dominância em três éguas e ausência de um segundo folículo crescendo em paralelo ao folículo que se tornaria dominante em uma das éguas. Os dias de ocorrência do desvio entre os dois maiores folículos e dos máximos diâmetros de F_1 e F_2 foram similares ($P>0,05$) entre os ciclos controle e tratado no grupo EPE. Adicionalmente, não houve diferença significativa entre os ciclos nas taxas de crescimento de F_1 e F_2 do dia 8 ao 13 e na taxa de crescimento de F_1 do dia -6 à ovulação. Contudo, a taxa de crescimento de F_2 do dia -6 à ovulação foi afetada pelo tratamento com EPE, sendo maior ($P<0,05$) no ciclo tratado do que no controle (1,1 vs. -0,3 mm/dia).

Com relação ao tratamento com baixa dose de eFSH (Tabela 5), embora o diâmetro de F_2 tenha sido similar entre os ciclos no dia 8, o mesmo folículo foi maior ($P<0,05$) no ciclo tratado em comparação ao controle no dia do desvio (28,1 vs. 22,1 mm) e ao máximo diâmetro (32,7 vs. 22,1 mm) em virtude das maiores ($P<0,05$) taxas de crescimento verificadas dos dias 8 ao 13 e -6 à -1. Isso resultou em uma menor ($P<0,05$) diferença entre os diâmetros máximos de F_1 e F_2 no ciclo tratado do que no controle (6,6 vs. 19,8 mm).

No dia do desvio o diâmetro de F_1 tendeu a ser maior no ciclo tratado do que no controle (31,6 vs. 25,4 mm; $P=0,085$). Desvio folicular foi observado em nove éguas durante o ciclo controle e somente em quatro éguas no ciclo tratado com eFSH em virtude do não crescimento de um folículo em paralelo ao folículo dominante (2 éguas no ciclo controle e 1 no tratado) e de co-dominância folicular em seis éguas no ciclo tratado. O desvio ocorreu aproximadamente dois dias mais tarde no ciclo tratado em comparação ao controle, embora a diferença não tenha sido significativa (12,0 e 10,3 dias, respectivamente; $P=0,110$). Os demais parâmetros

referentes ao crescimento do maior folículo, bem como os intervalos estudados foram similares ($P>0,05$) para os ciclos controle e tratado com eFSH.

Quando confrontamos os tratamentos EPE e eFSH (Tabela 6), verificamos tendência a uma maior taxa de crescimento de F_1 do dia 8 ao 13 com o uso do eFSH (3,2 vs. 2,5 mm/dia; $P=0,069$), fazendo com que o maior folículo tendesse a atingir o diâmetro máximo mais precocemente em média (14,5 vs. 15,8 dias; $P=0,082$). Como consequência, os animais tratados com eFSH apresentaram um intervalo interovulatório mais curto ($P<0,05$) do que os tratados com EPE (15,6 vs. 16,9 dias). Outros efeitos observados foram que, no momento do desvio, o diâmetro de F_1 foi superior ($P<0,05$) e o de F_2 tendeu ($P<0,1$) a ser maior no grupo de éguas tratadas com eFSH em comparação às tratadas com EPE (31,6 vs. 27,8 mm e 28,1 vs. 25,2 mm, respectivamente). Adicionalmente, embora os diâmetros máximos de F_1 e F_2 não tenham diferido entre os tratamentos, a diferença entre esses diâmetros tendeu a ser menor nos animais tratados com eFSH (6,6 vs. 12,7 mm; $P=0,070$).

As éguas tratadas com EPE ou eFSH que responderam ao tratamento com duas ou mais ovulações foram agrupadas e seus parâmetros foliculares comparados aos das éguas tratadas que apresentaram somente uma ovulação (Tabela 7). Os parâmetros referentes ao maior folículo foram similares ($P>0,05$) entre os grupos de animais. Entretanto, conforme esperado, o segundo maior folículo cresceu mais rapidamente ($P<0,05$) dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 e atingiu diâmetro máximo superior ($P<0,05$) nas éguas que ovularam dois ou mais folículos em comparação às demais. Conseqüentemente, o máximo diâmetro foi atingido mais ($P<0,05$) tardiamente e a diferença entre os diâmetros máximos de F_1 e F_2 foi menor ($P<0,05$) nas éguas com múltiplas ovulações do que nas de ovulação simples. Vale ressaltar que no início do tratamento (dia 8) os diâmetros de F_1 e F_2 foram similares ($P>0,05$) entre esses dois grupos de éguas.

Tabela 4: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador durante um período controle e após tratamento com baixa dose (4 mg s.i.d.) de EPE a partir do dia 8

Parâmetro	Grupo EPE	
	Controle	Tratado
Número de éguas		
Total	10	10
Com desvio entre F ₁ e F ₂	6	6
Dia de ocorrência		
Desvio entre F ₁ e F ₂	11,5 $\pm$ 0,8	11,8 $\pm$ 0,7
Máximo diâmetro		
Folículo 1	16,2 $\pm$ 0,7	15,8 $\pm$ 0,6
Folículo 2	12,9 $\pm$ 0,9	14,5 $\pm$ 1,0
Intervalos (dias)		
Interovulatório	17,4 $\pm$ 0,7	16,9 $\pm$ 0,5
Dia 8 – hCG	7,8 $\pm$ 0,7 ^x	6,8 $\pm$ 0,5 ^y
Dia 8 – ovulação	9,4 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,5
Diâmetros (mm)		
Dia 8		
Folículo 1	15,7 $\pm$ 2,5	18,9 $\pm$ 2,1
Folículo 2	14,0 $\pm$ 2,3	15,2 $\pm$ 1,5
No desvio		
Folículo 1	27,1 $\pm$ 2,8	27,8 $\pm$ 1,1
Folículo 2	22,2 $\pm$ 2,3	25,2 $\pm$ 1,1
Máximos		
Folículo 1	40,4 $\pm$ 1,0	41,3 $\pm$ 1,5
Folículo 2	23,4 $\pm$ 2,3	28,7 $\pm$ 2,3
Diferença de diâmetro (mm) entre F ₁ e F ₂		
No dia 8	1,7 $\pm$ 1,6	3,7 $\pm$ 2,3
No desvio	4,9 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 1,4
Ao máximo	17,0 $\pm$ 2,9	12,7 $\pm$ 2,2
Taxas de crescimento (mm/dia)		
Dia 8 ao 13		
Folículo 1	3,0 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,3
Folículo 2	1,1 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,4
Dia - 6 à - 1		
Folículo 1	2,7 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2
Folículo 2	- 0,3 $\pm$ 0,2 ^b	1,1 $\pm$ 0,4 ^a

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística (P<0,05).

^{x, y} Letras diferentes na mesma linha indicam tendência à significância estatística (P<0,1).

Tabela 5: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador durante um período controle e após tratamento com baixa dose (5 mg s.i.d.) de eFSH a partir do dia 8

Parâmetro	Grupo eFSH	
	Controle	Tratado
Número de éguas		
Total	11	11
Com desvio entre F ₁ e F ₂	9	4
Dia de ocorrência		
Desvio entre F ₁ e F ₂	10,3 $\pm$ 0,4	12,0 $\pm$ 1,2
Máximo diâmetro		
Folículo 1	14,9 $\pm$ 0,5	14,5 $\pm$ 0,4
Folículo 2	11,7 $\pm$ 0,6	12,8 $\pm$ 0,9
Intervalos (dias)		
Interovulatório	16,1 $\pm$ 0,4	15,6 $\pm$ 0,3
Dia 8 – hCG	5,9 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4
Dia 8 – ovulação	8,1 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 0,3
Diâmetros (mm)		
Dia 8		
Folículo 1	20,7 $\pm$ 1,6	19,0 $\pm$ 1,9
Folículo 2	16,5 $\pm$ 1,4	18,4 $\pm$ 2,1
No desvio		
Folículo 1	25,4 $\pm$ 2,1 ^y	31,6 $\pm$ 1,2 ^x
Folículo 2	22,1 $\pm$ 1,5 ^b	28,1 $\pm$ 0,6 ^a
Máximos		
Folículo 1	41,9 $\pm$ 1,3	39,3 $\pm$ 1,0
Folículo 2	22,1 $\pm$ 1,4 ^b	32,7 $\pm$ 2,3 ^a
Diferença de diâmetro (mm) entre F ₁ e F ₂		
No dia 8	3,3 $\pm$ 2,0	0,5 $\pm$ 1,3
No desvio	3,4 $\pm$ 1,4	3,5 $\pm$ 0,6
Ao máximo	19,8 $\pm$ 1,8 ^a	6,6 $\pm$ 2,2 ^b
Taxas de crescimento (mm/dia)		
Dia 8 ao 13		
Folículo 1	3,0 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2
Folículo 2	0,6 $\pm$ 0,3 ^b	2,1 $\pm$ 0,5 ^a
Dia - 6 à - 1		
Folículo 1	2,9 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2
Folículo 2	- 0,2 $\pm$ 0,3 ^b	1,6 $\pm$ 0,4 ^a

^{a.,b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística (P<0,05).

^{x,y} Letras diferentes na mesma linha indicam tendência à significância estatística (P<0,1).

Tabela 6: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador após tratamento com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.) ou eFSH (5 mg s.i.d.) a partir do dia 8

Parâmetro	Tratamento	
	EPE	eFSH
Número de éguas		
Total	10	11
Com desvio entre F ₁ e F ₂	6	4
Dia de ocorrência		
Desvio entre F ₁ e F ₂	11,8 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 1,2
Máximo diâmetro		
Folículo 1	15,8 $\pm$ 0,6 ^x	14,5 $\pm$ 0,4 ^y
Folículo 2	14,5 $\pm$ 1,0	12,8 $\pm$ 0,9
Intervalos (dias)		
Interovulatório	16,9 $\pm$ 0,5 ^a	15,6 $\pm$ 0,3 ^b
Dia 8 – hCG	6,8 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4
Dia 8 – ovulação	8,8 $\pm$ 0,5 ^x	7,6 $\pm$ 0,3 ^y
Diâmetros (mm)		
Dia 8		
Folículo 1	18,9 $\pm$ 2,1	19,0 $\pm$ 1,9
Folículo 2	15,2 $\pm$ 1,5	18,4 $\pm$ 2,1
No desvio		
Folículo 1	27,8 $\pm$ 1,1 ^b	31,6 $\pm$ 1,2 ^a
Folículo 2	25,2 $\pm$ 1,1 ^b	28,1 $\pm$ 0,6 ^a
Máximos		
Folículo 1	41,3 $\pm$ 1,5	39,3 $\pm$ 1,0
Folículo 2	28,7 $\pm$ 2,3	32,7 $\pm$ 2,3
Diferença de diâmetro (mm) entre F ₁ e F ₂		
No dia 8	3,7 $\pm$ 2,3	0,5 $\pm$ 1,3
No desvio	2,7 $\pm$ 1,4	3,5 $\pm$ 0,6
Ao máximo	12,7 $\pm$ 2,2 ^x	6,6 $\pm$ 2,2 ^y
Taxas de crescimento (mm/dia)		
Dia 8 ao 13		
Folículo 1	2,5 $\pm$ 0,3 ^y	3,2 $\pm$ 0,2 ^x
Folículo 2	1,6 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,5
Dia - 6 à - 1		
Folículo 1	3,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2
Folículo 2	1,1 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,4

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística (P<0,05).

^{x, y} Letras diferentes na mesma linha indicam tendência à significância estatística (P<0,1).

Tabela 7: Média ($\pm$ EPM) dos parâmetros foliculares ovarianos pontuais estudados em éguas da raça Mangalarga Marchador tratadas com baixa dose de EPE (4 mg s.i.d.) ou eFSH (5 mg s.i.d.) a partir do dia 8, agrupadas em função do resultado do tratamento (≥ 2 ovulações ou < 2 ovulações)

Parâmetro	Resultado do tratamento	
	≥ 2 ovulações	< 2 ovulações
Número de éguas	8	13
Dia de ocorrência		
Máximo diâmetro		
Folículo 1	$15,4 \pm 0,6$	$15,0 \pm 0,4$
Folículo 2	$15,6 \pm 0,6^a$	$12,4 \pm 0,9^b$
Intervalos (dias)		
Interovulatório	$16,6 \pm 0,6$	$16,0 \pm 0,4$
Dia 8 – hCG	$6,6 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,4$
Dia 8 – ovulação	$8,6 \pm 0,6$	$7,9 \pm 0,4$
Diâmetros (mm)		
Dia 8		
Folículo 1	$19,5 \pm 2,9$	$18,6 \pm 1,4$
Folículo 2	$17,4 \pm 2,5$	$16,5 \pm 1,6$
Máximos		
Folículo 1	$41,4 \pm 2,0$	$39,5 \pm 0,8$
Folículo 2	$38,1 \pm 1,5^a$	$26,3 \pm 1,5^b$
Diferença de diâmetro (mm) entre		
F ₁ e F ₂		
No dia 8	$2,1 \pm 3,1$	$2,0 \pm 1,4$
Ao máximo	$3,4 \pm 1,2^b$	$13,3 \pm 2,0^a$
Taxas de crescimento (mm/dia)		
Dia 8 ao 13		
Folículo 1	$2,8 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,2$
Folículo 2	$2,8 \pm 0,4^a$	$1,3 \pm 0,4^b$
Dia - 6 à - 1		
Folículo 1	$2,9 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,1$
Folículo 2	$2,6 \pm 0,3^a$	$0,6 \pm 0,3^b$

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística ($P < 0,05$).

^{x, y} Letras diferentes na mesma linha indicam tendência à significância estatística ($P < 0,1$).

Diâmetros e Taxas de Crescimento Folicular Diários

O padrão de crescimento do maior folículo ovariano não foi alterado pelos tratamentos hormonais utilizados, tendo em vista que o diâmetro e a taxa de crescimento de F_1 dia a dia foram similares ($P>0,05$) entre os ciclos controle e tratado dentro de cada grupo após análise dos dados normalizados para o início do tratamento (dia 8) ou para o dia da ovulação (dia 0). Também não observamos diferença significativa no diâmetro e taxa de crescimento de F_1 após compararmos os tratamentos EPE e eFSH, bem como animais com duas ou mais ovulações *versus* animais com ovulação simples pós-tratamento, a não ser uma diferença ($P<0,05$) pontual no dia -5 em favor das éguas com múltipla ovulação. Os diâmetros e taxas de crescimento diários de F_1 nas diferentes categorias de animais podem ser vistos nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Com relação ao desenvolvimento do segundo maior folículo, alguns efeitos de tratamento ou grupo foram observados (Figuras 4 e 5). No grupo EPE, o diâmetro e taxa de crescimento de F_2 foram similares ($P>0,05$) entre os ciclos controle e tratado dos dias 8 ao 13 e -6 a -2, sendo o diâmetro no ciclo tratado maior ($P<0,05$) no dia -1 em função da maior ($P<0,05$) taxa de crescimento verificada entre os dias -2 e -1. Por sua vez, no grupo eFSH, o diâmetro de F_2 foi superior ($P<0,05$) no ciclo tratado a partir do dia 10 e durante os cinco dias que antecederam a ovulação, embora as taxas de crescimento só tenham diferido significativamente do dia 11 ao 13 e entre os dias -4 e -3. A comparação entre os tratamentos EPE e eFSH não revelou diferenças significativas nos diâmetros e taxas de crescimento de F_2 nos períodos estudados. Nas éguas com duas ou mais ovulações após tratamento com EPE ou eFSH o diâmetro de F_2 foi superior ($P<0,05$) a partir do dia 12 e nos cinco dias que antecederam a ovulação, em comparação às éguas com ovulação simples pós-tratamento. As taxas de crescimento de F_2 foram significativamente maiores nas éguas com múltipla ovulação somente entre os dias 11 e 12 e do dia -4 a -1, embora numericamente superiores durante todo o período experimental.

Devido às alterações no crescimento do segundo maior folículo decorrentes dos tratamentos hormonais, o perfil de crescimento de F_1 e F_2 analisados em conjunto variou entre os diferentes grupos ou categorias de animais.

No ciclo controle do grupo EPE, o diâmetro de F_1 foi maior ($P<0,05$) que o de F_2 a partir do dia 9 e durante os seis dias que antecederam a ovulação em decorrência de taxas de crescimento numericamente maiores durante esses períodos, embora as mesmas só tenham diferido significativamente dos dias 11 ao 13 e -5 a -1. Em contrapartida, no ciclo tratado, diferença significativa de diâmetro entre F_1 e F_2 surgiu somente no dia 11, persistindo também dos dias -6 a -1. As taxas de crescimento de F_1 foram numericamente superiores às de F_2 a partir do dia 9 e entre os dias -6 e -1 (Figura 6).

No grupo eFSH, durante o ciclo controle, o diâmetro de F_1 foi maior ($P<0,05$) que o de F_2 a partir do dia 9 e entre os dias -6 a -1. As taxas de crescimento de F_1 , embora numericamente superiores às de F_2 durante todo o período experimental, diferiram significativamente apenas do dia 11 ao 13 e entre os dias -6 e -2. Já no ciclo tratado, F_1 foi significativamente maior que F_2 apenas no dia 13 e entre os dias -4 e -1, com diferença significativa entre as taxas de crescimento dos dois maiores folículos somente entre os dias -5 e -4 (Figura 7).

Nas éguas com ovulação simples pós-tratamento, F_1 foi significativamente maior que F_2 a partir do dia 10 e entre os dias -5 e -1. Nesse grupo de animais, as taxas de crescimento diferiram ($P<0,05$) em favor de F_1 dos dias 9 ao 11 e 12 ao 13, bem como entre os dias -5 e -1 (Figura 8). Já nas éguas com duas ou mais ovulações após tratamento com EPE ou eFSH, o diâmetro de F_1 foi maior ($P<0,05$) que o de F_2 no dia 13 e do dia -4 a -1, embora as taxas de crescimento não tenham diferido significativamente em nenhum momento.

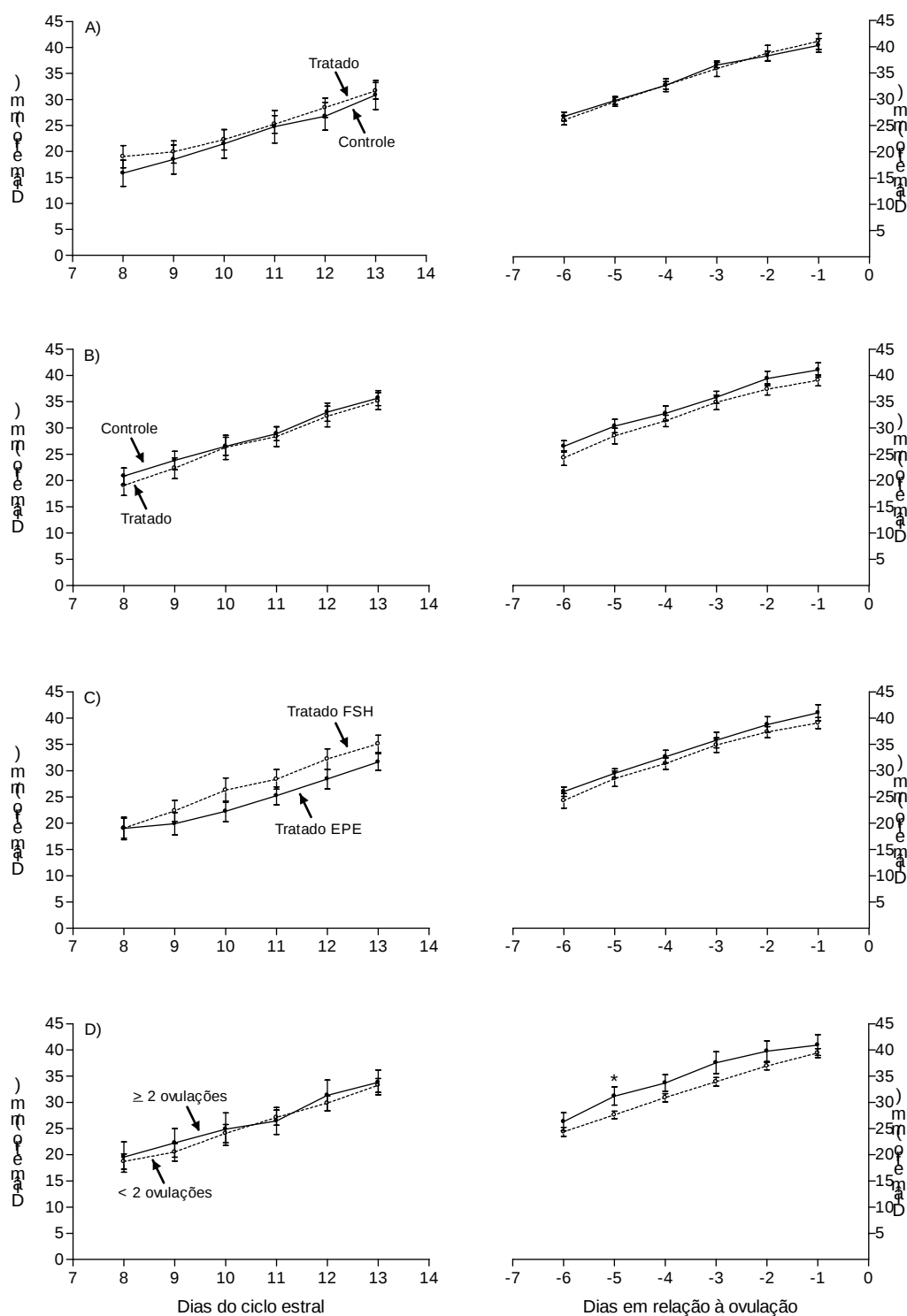


Figura 2: Diâmetro (média $\pm$ EPM) do maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D). O símbolo (*) indica que a diferença entre ciclos ou grupos foi significativa ($P<0,05$) no dia.

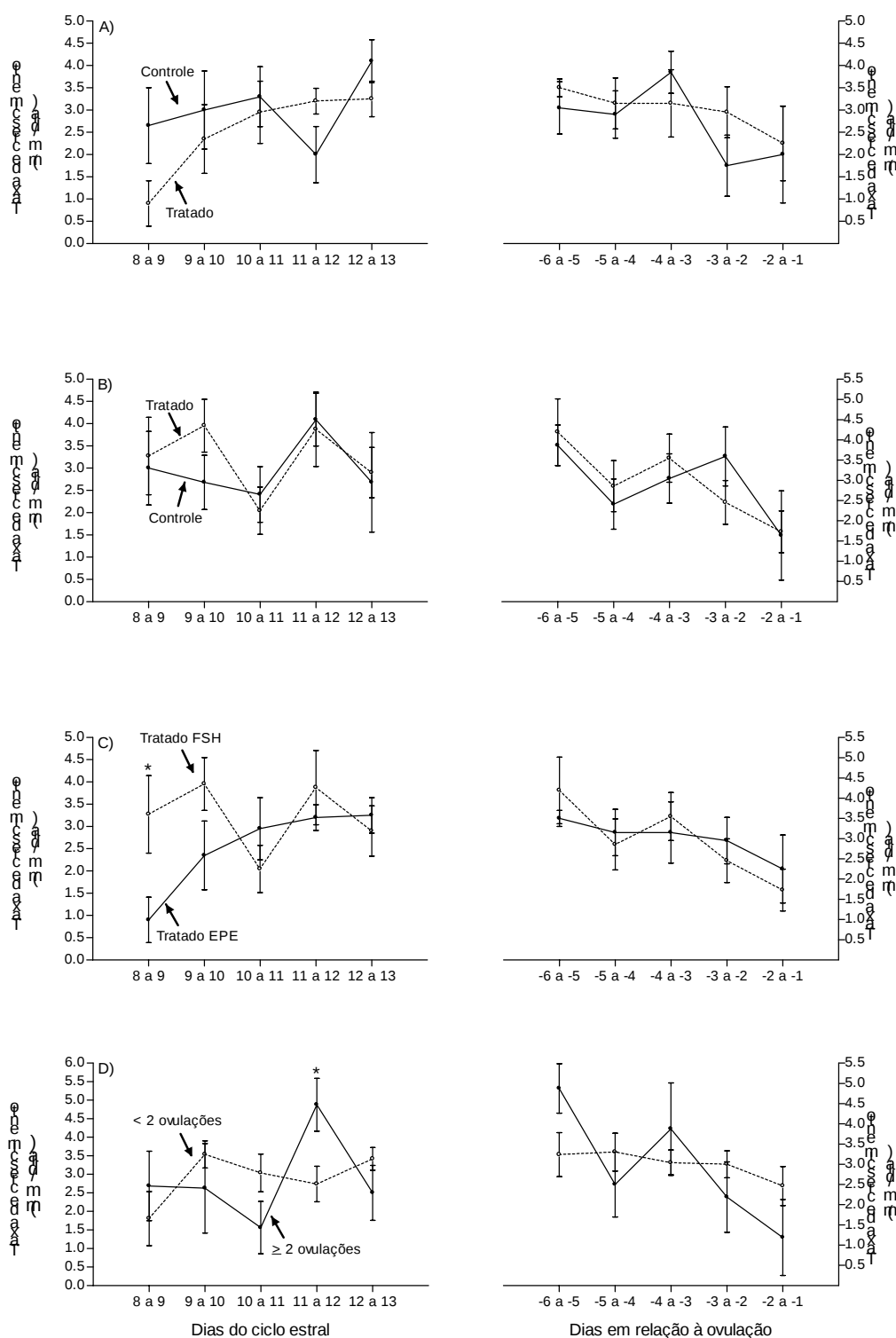


Figura 3: Taxa de crescimento (média $\pm$ EPM) do maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D). O símbolo (*) indica que a diferença entre ciclos ou grupos foi significativa ($P < 0,05$) no dia.

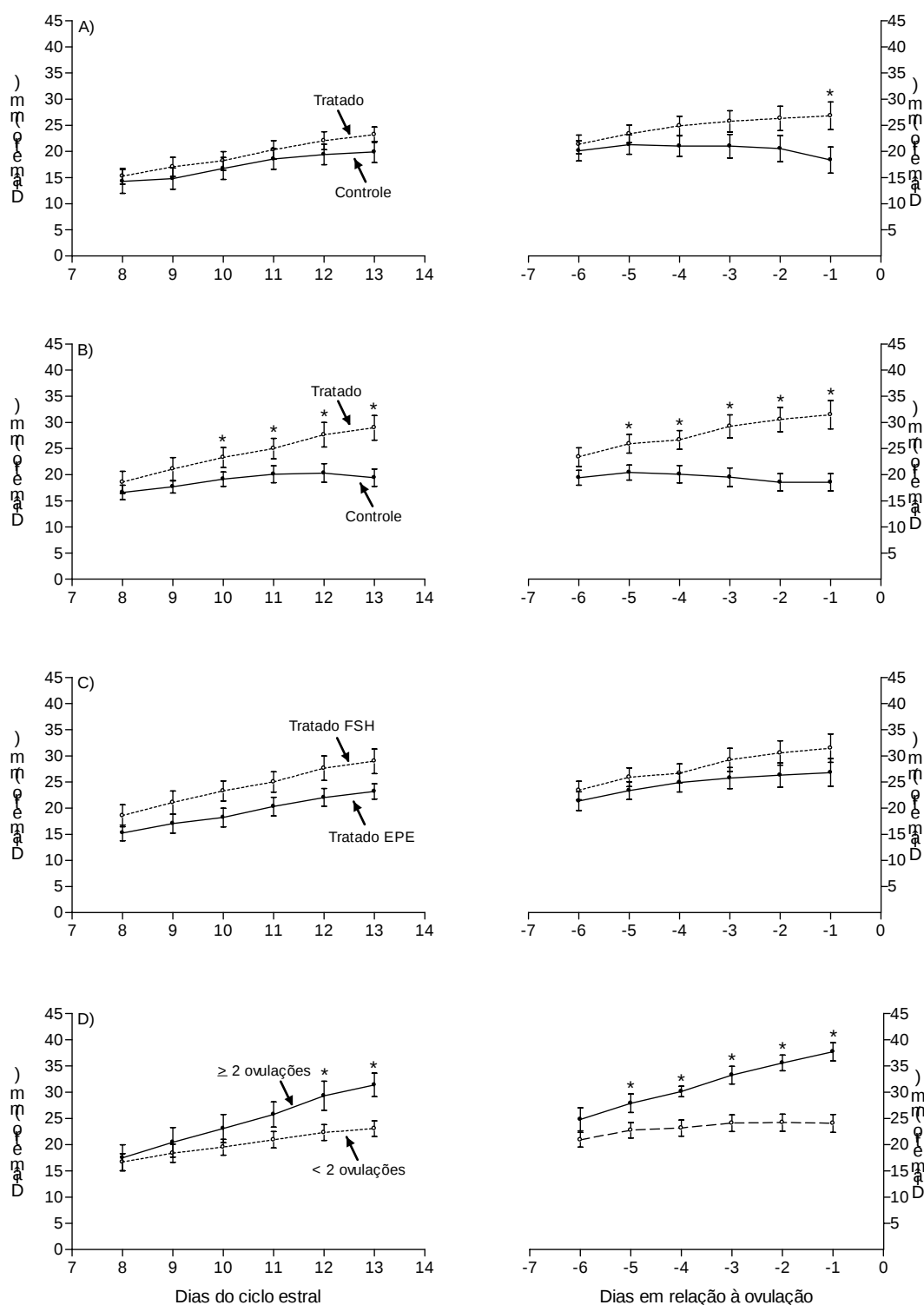


Figura 4: Diâmetro (média $\pm$ EPM) do segundo maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A), eFSH (B), nos tratamentos EPE ou eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D). O símbolo (*) indica que a diferença entre ciclos ou grupos foi significativa ($P < 0,05$) no dia.

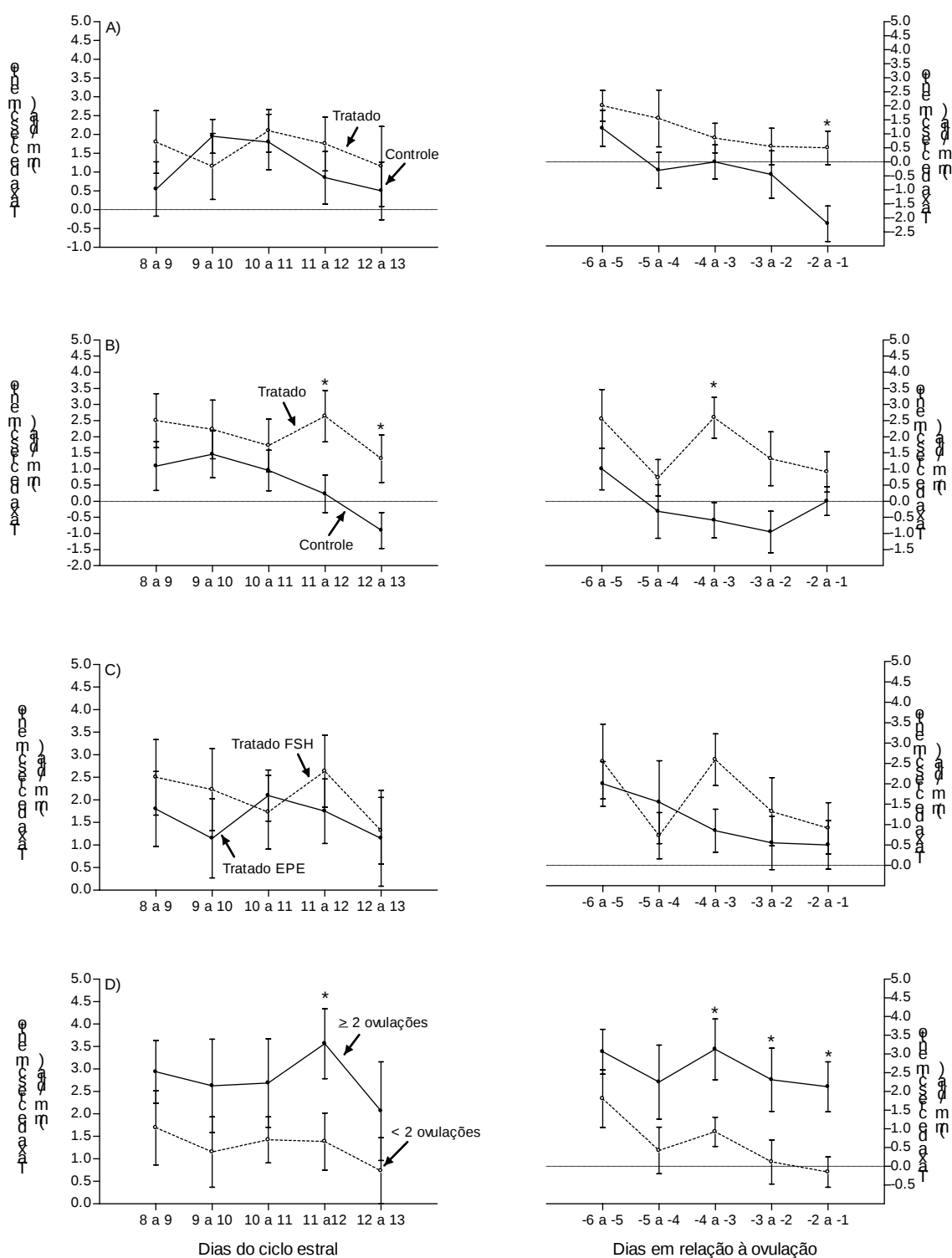


Figura 5: Taxa de crescimento (média $\pm$ EPM) do segundo maior folículo dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE (A) e eFSH (B), nos tratamentos EPE e eFSH (C) e nos animais com ovulações simples ou ovulações múltiplas pós-tratamento (D). O símbolo (*) indica que a diferença entre ciclos ou grupos foi significativa ($P<0,05$) no dia.

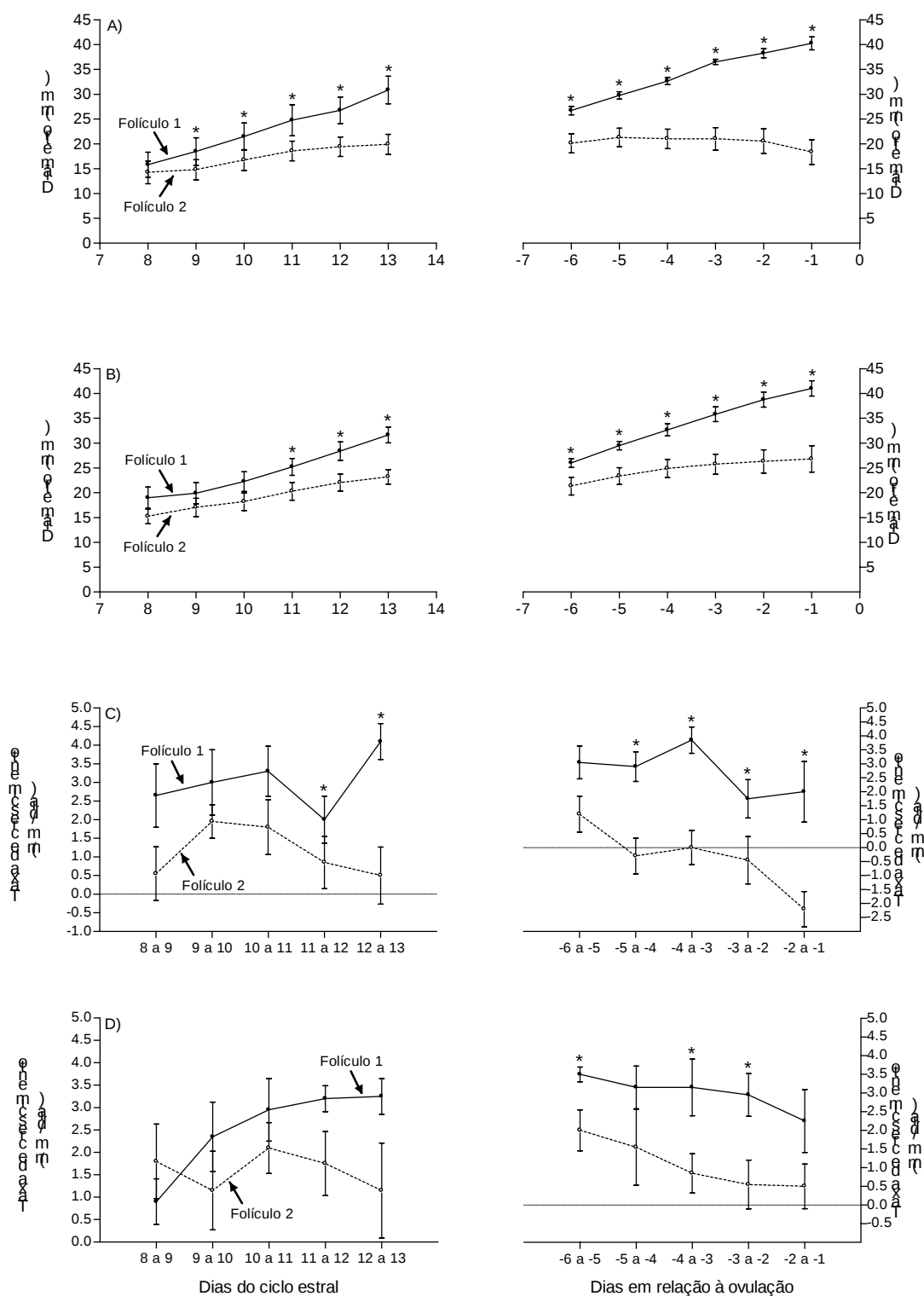


Figura 6: Diâmetros e taxas de crescimento (média $\pm$ EPM) do dois maiores folículos dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle (A e C) e tratado (B e D) do grupo EPE. O símbolo (*) indica que a diferença entre F₁ e F₂ foi significativa (P<0,05) no dia.

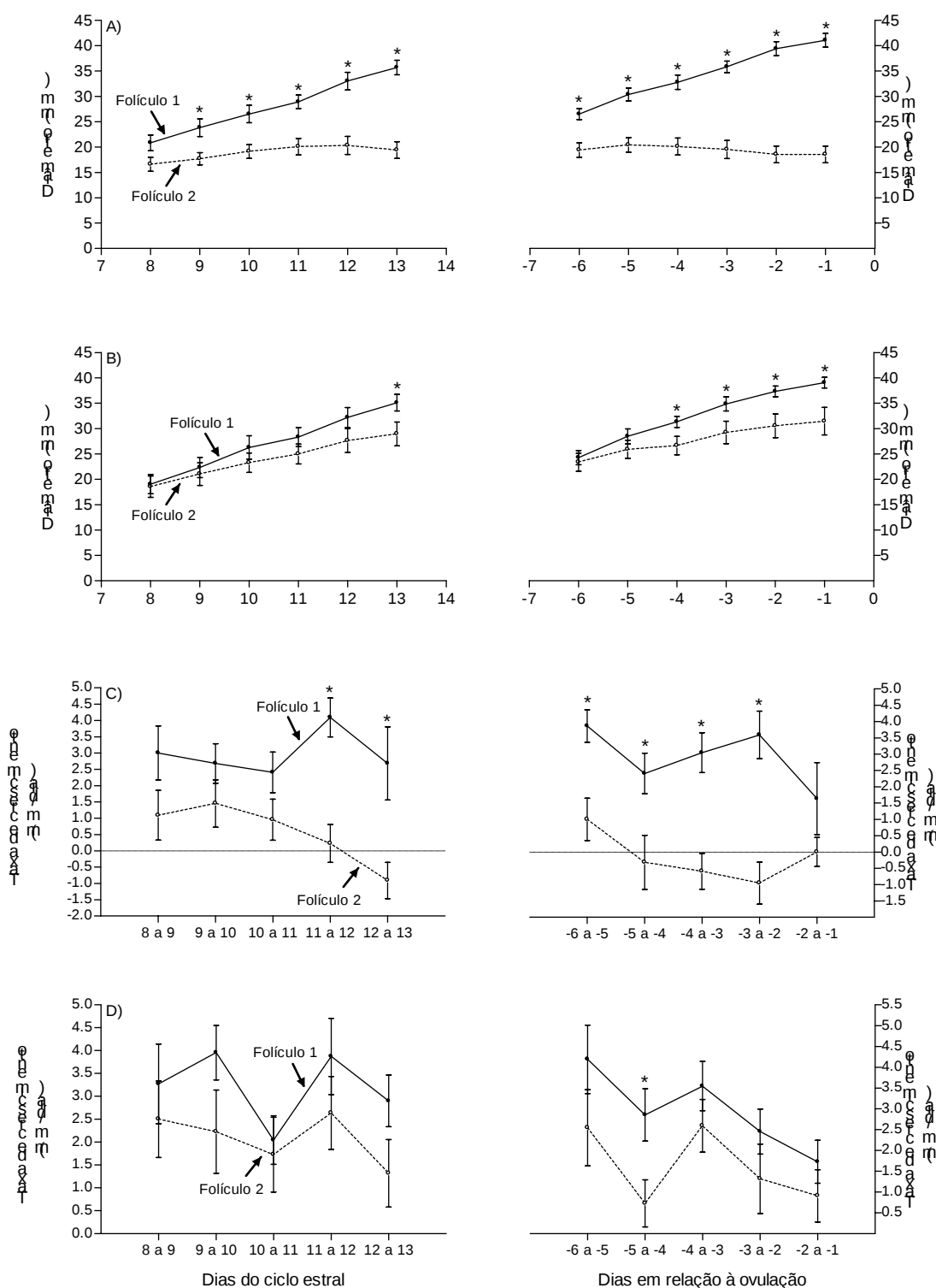


Figura 7: Diâmetros e taxas de crescimento (média $\pm$ EPM) dos dois maiores folículos dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 nos ciclos controle (A e C) e tratado (B e D) do grupo eFSH. O símbolo (*) indica que a diferença entre F₁ e F₂ foi significativa (P<0,05) no dia.

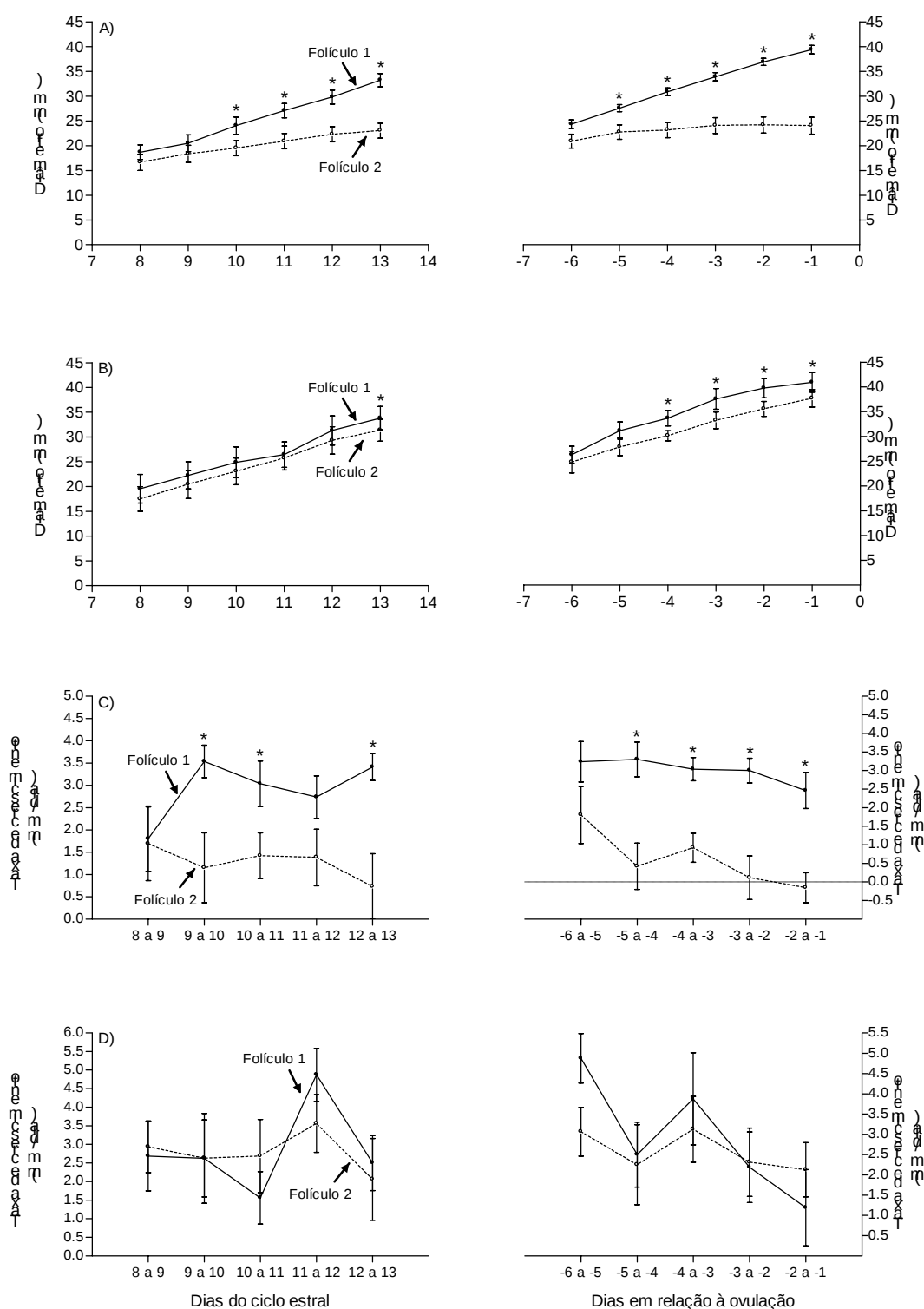


Figura 8: Diâmetros e taxas de crescimento (média $\pm$ EPM) do dois maiores folículos dos dias 8 ao 13 e -6 a -1 em éguas com ovulação simples (A e C) ou ovulações múltiplas (B e D) pós-tratamento com EPE ou eFSH. O símbolo (*) indica que a diferença entre F₁ e F₂ foi significativa (P<0,05) no dia.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um protocolo consistente para aumentar a taxa de ovulação e a recuperação embrionária em éguas teria um impacto extremamente positivo em programas comerciais de transferência de embriões, transferência de ovócitos e no tratamento de alguns casos de subfertilidade (SQUIRES et al., 2003). Com uma taxa de recuperação embrionária média de 50% e taxa de prenhez pós-transferência de 70% tem-se uma eficiência de 35% por ciclo estral, ou seja, aproximadamente três tentativas para se conseguir uma prenhez (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Losinno et al. (2000) reportaram que o número de lavados necessários para se obter uma prenhez de TE em éguas foi significativamente menor quando da ocorrência de ovulações múltiplas naturais em comparação às ovulações simples (1,03 vs. 1,85).

O extrato de pituitária eqüina é comumente utilizado para a superovulação de éguas nas doses de 12,5 ou 25 mg duas vezes ao dia (SCOGGIN et al., 2002), enquanto o FSH purificado eqüino é geralmente utilizado na dose de 12,5 mg duas vezes ao dia (NISWENDER et al., 2003). As doses e freqüência de administração do EPE (4 mg s.i.d.) e do eFSH (5 mg s.i.d.) no presente trabalho foram determinadas com base no estudo de Farinasso (2004), que obteve 76,9% de éguas com duas ou mais ovulações após administrar 4 ou 6 mg de EPE uma vez ao dia durante o diestro.

A administração de 4 mg/dia de EPE no presente estudo propiciou o crescimento de um número maior de folículos com 30 mm de diâmetro em comparação ao ciclo controle, embora não tenha aumentado de forma significativa a taxa de ovulação. Adicionalmente, 30,8% das éguas apresentaram duas ou mais ovulações, percentual inferior ao reportado por Farinasso (2004) com o uso de 4 mg s.i.d. de EPE (76,9%). Isso nos leva a crer que a dose de EPE utilizada no presente experimento foi insuficiente para promover a ovulação de um segundo folículo em um número mais representativo de indivíduos. Farinasso (2004) tratou somente éguas com folículos < 25 mm, o que pode ter determinado a marcante diferença de resultados entre os dois trabalhos. Ainda assim o tratamento com baixa dose de EPE duplicou a recuperação de embriões em comparação ao controle, com média de 1,1 embriões recuperados por égua tratada, taxa bastante próxima da relatada

por Farinasso (2004; 1,31 embriões/égua) e superior às comumente encontradas na literatura (SQUIRES et al., 2003). Adicionalmente, esse tratamento propiciou um incremento de cerca de 20% na taxa de recuperação de embriões por ovulação. No momento não podemos concluir se tal melhora ocorreu somente em virtude da recuperação de dois embriões por colheita em três das quatro éguas com ovulação dupla ou se o tratamento promove melhoria na qualidade dos ovócitos e aumento de fertilidade.

O tratamento com baixa dose de eFSH propiciou aumento significativo no número de ovulações em comparação ao controle, embora inferior ao obtido geralmente com o uso da dose integral (25 mg/dia) na superovulação de éguas (4,2 ovulações/égua; MACHADO et al., 2003). O percentual de éguas com mais de uma ovulação após tratamento (50%) também ficou aquém do geralmente observado com o uso da dose integral de EPE (80-100%; SCOGGIN et al., 2002) e eFSH (87,5%; NISWENDER et al., 2003). Embora a baixa dose de eFSH não tenha gerado melhora na recuperação embrionária em relação ao ciclo controle, propiciou a recuperação de pelo menos um embrião por colheita. Vale ressaltar que a taxa de recuperação de embriões no ciclo controle (0,8 embriões/égua) do presente trabalho foi bastante expressiva e superior às comumente reportadas (ROSAS et al., 1998; MACHADO et al., 2003; FARINASSO, 2004). Adicionalmente, uma das éguas tratadas apresentou três ovulações e nenhum embrião foi recuperado, o que provavelmente influenciou bastante as médias tendo em vista o reduzido número de animais no grupo.

Tendo em vista que um frasco do FSH purificado eqüino utilizado no presente trabalho – contendo 25 mg do produto – custa cerca de U\$ 60, e que o tratamento com 5 mg/dia dura em média 6 dias, tem-se um custo médio de U\$ 72 por animal tratado com expectativa de recuperação de um embrião em média por lavado. O tratamento com a dose convencional durante seis dias custaria cinco vezes mais e traria a expectativa de se recuperar dois embriões em média por lavado (NISWENDER et al., 2003).

No presente estudo, optamos por iniciar os tratamentos em um dia fixo (dia 8) com o intuito de simplificar o protocolo. No entanto, no oitavo dia pós-ovulação algumas éguas apresentaram folículos de diâmetro inferior a 15 mm e

demoraram mais dias para receberem hCG, enquanto outras já apresentavam folículos de diâmetro próximo a 30 mm, o que provavelmente comprometeu a resposta dessas éguas ao tratamento (PIERSON & GINTHER, 1990). Assim sendo, acreditamos ser mais interessante selecionar as éguas antes do início do tratamento com base na população folicular que elas apresentam.

Falha na ovulação não foi um problema no presente trabalho, independente do tratamento, tendo em vista que a maior parte dos folículos pré-ovulatórios respondeu à indução da ovulação com hCG e que o número de folículos que sofreram luteinização e não ovularam foi insignificante, corroborando relatos anteriores (LAPIN & GINTHER, 1977; NISWENDER et al., 2003).

A identificação do momento do desvio entre os dois maiores folículos foi dificultada pelo fato do monitoramento do desenvolvimento folicular ter sido iniciado no oitavo dia pós-ovulação. Houve animais que não apresentaram co-dominância nos quais não conseguimos visualizar o desvio entre F₁ e F₂. A administração de agente luteolítico no dia 8 possibilitou o crescimento e dominância de folículos remanescentes de ondas que emergiram antes do início do experimento, sem que se pudesse notar crescimento de um segundo maior folículo em paralelo ao maior. Quando se trabalha com uma onda folicular induzida experimentalmente por meio de aspiração folicular é possível acompanhar o desenvolvimento de folículos individuais desde a emergência até a ovulação (GASTAL et al., 2004). Os diâmetros de F₁ e F₂ no momento do desvio nos ciclos controle e tratado dos grupos EPE e eFSH foram aparentemente superiores aos previamente descritos em éguas durante ondas foliculares induzidas (22,5 e 19,0 mm, respectivamente; GASTAL et al., 1997). Embora esse fato não tenha sido criticamente analisado, a presença de folículos de médio diâmetro que normalmente sofreriam atresia e tiveram o crescimento retomado após administração de luteolítico pode ter contribuído para os maiores diâmetros de F₁ e F₂ no momento do desvio nos ciclos controle. Nos ciclos tratados, o crescimento prolongado do segundo maior folículo foi responsável pelos maiores diâmetros de F₁ e F₂ no desvio.

A vantagem de um dia na administração de hCG no ciclo tratado com EPE em relação ao controle deveu-se provavelmente a vantagem de 3 mm (equivalente a um dia de crescimento; GINTHER, 2000) no diâmetro do maior

folículo do grupo tratado no início do experimento (dia 8). Embora não tenha havido diferença significativa no diâmetro máximo de F_2 entre o ciclo controle e tratado com EPE, o F_2 do ciclo tratado atingiu diâmetro cerca de 5 mm maior e 1,5 dias mais tarde. A dose de EPE utilizada prolongou o crescimento do segundo maior folículo mas não foi capaz, na maioria dos animais, de torná-lo competente para atingir a ovulação.

O tratamento com baixa dose de eFSH adiou o desvio folicular em cerca de dois dias nos animais que não apresentaram co-dominância, fazendo com que os diâmetros de F_1 e F_2 fossem maiores no desvio em comparação ao ciclo controle. Assim como nas taxas de ovulação, o tratamento com EPE forneceu resultados foliculares pontuais intermediários entre o controle e o tratamento com eFSH. Ao nosso ver, isso se deve a maior proporção FSH:LH contida no FSH purificado eqüino em comparação ao EPE.

Comparamos os dados foliculares pontuais entre éguas com ovulação simples e múltipla com o intuito de identificar condições pré-tratamento que permitam prever a resposta aos tratamentos. Embora Woods & Ginther (1985) tenham relatado que a diferença entre o maior e segundo maior folículo no início do tratamento superovulatório com EPE foi menor ($P < 0,05$) nas éguas com múltipla ovulação do que nas éguas com ovulação simples, não encontramos diferença nesse parâmetro entre esses grupos de animais no dia 8 no presente trabalho. As condições que permitiram que alguns animais respondessem com mais de uma ovulação aos tratamentos hormonais administrados no presente estudo podem estar relacionadas a diferenças nas concentrações circulantes de gonadotrofinas endógenas. Infelizmente não dispomos das dosagens hormonais para investigar essa questão.

A administração de baixas doses de EPE ou eFSH não interferiu no crescimento do maior folículo mas afetou o crescimento do segundo maior folículo, que atingiu diâmetro máximo superior nos animais tratados. Esse efeito foi mais pronunciado e duradouro nas éguas tratadas com eFSH em comparação às tratadas com EPE.

Atualmente sabe-se que o futuro folículo dominante em éguas apresenta diferenças marcantes em relação ao segundo maior folículo nas concentrações de fatores intrafoliculares, tais quais IGF-I, IGFBP-2, estradiol, activina-A e inibina-A (DONADEU & GINTHER, 2002), e que as concentrações da maioria desses fatores é influenciada pela concentração de IGF-I livre no fluido folicular (GINTHER et al., 2004a,b). Sabe-se também que esses fatores atuam aumentando a responsividade das células da granulosa às gonadotrofinas e estimulam a esteroidogênese (GINTHER et al., 2002). Não é claro ainda o mecanismo que desencadeia essa série de alterações no futuro folículo dominante. O FSH é capaz de aumentar a secreção *in vitro* de alguns desses fatores pelas células da granulosa de bovinos (GLISTER et al., 2001) e suínos (HSU & HAMMOND, 1987). Em éguas não há evidências de que o FSH possua esses efeitos. Tampouco se sabe se folículos estimulados a crescer por meio da administração de EPE ou eFSH exibem o mesmo padrão de alteração nas concentrações de fatores intrafoliculares apresentado por folículos dominantes de uma onda folicular natural. Não é difícil imaginar que a administração de gonadotrofinas exógenas possa induzir em folículos que tornariam-se subordinados o desenvolvimento de condições intrafoliculares idênticas às exibidas por um folículo que se torna naturalmente dominante. No entanto, a resposta a essa questão requer a realização de estudos específicos.

7. CONCLUSÃO

Os tratamentos com as baixas doses de EPE ou eFSH utilizados no presente trabalho não interferem no desenvolvimento do maior folículo ovariano, mas prolongam a fase de crescimento do segundo maior folículo. Ambos tratamentos aumentam a incidência de ovulações múltiplas em éguas, sendo o eFSH mais eficiente em aumentar o número médio de ovulações. Adicionalmente, esses protocolos de indução de ovulações múltiplas com baixas doses hormonais propiciam a recuperação de um embrião em média por lavado, o que já torna viável e interessante a aplicação comercial dos mesmos. Ainda assim, acreditamos que aumento nas doses diárias desses preparados hormonais – ainda utilizando doses abaixo das preconizadas na superovulação –, associado à seleção dos animais com base na população folicular pré-tratamento, podem produzir aumentos mais consistentes na incidência de ovulações duplas e triplas em éguas e melhorar a relação benefício/custo dos programas comerciais de transferência de embriões eqüinos.

8. REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; HERNANDEZ, E.R.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. Potential relevance of insulin-like growth factor I to ovarian physiology: from basic science to clinical application. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, v.7, 94-99, 1989.

ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E.; NEVES NETO, J.R.; SQUIRES, E.L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEIRA, C. Modifications in the technique used to recover equine embryos. **Equine Vet. J. Suppl.**, n.15, p.111-112, 1993.

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

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

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **J. Reprod. Fertil.**, v.101, p.583-591, 1994.

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

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M. MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Estudos da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça brasileiro de hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.3, p.252-254, 2002.

CARMO, M.T.; LIMA, M.M.; TRINQUE, C.L.N.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Incidência de ovulações múltiplas unilaterais e bilaterais e suas implicações nos índices de recuperação embrionária em éguas da raça brasileiro de hipismo. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Beberibe, 2003. **Acta Sci. Vet.**, v.31 (suplemento), p.282, 2003.

CARMO, M.T. et al. Efeito da superovulação com extrato de pituitária eqüina no transporte de oócitos para o oviduto de éguas. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis, 2005. **Acta Sci. Vet.**, v.33 (suplemento), p.179, 2005.

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

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

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

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1111-1118, 2002.

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

FARINASSO, A. **Utilização de baixas doses de extrato de pituitária eqüina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas**. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**, v.128, p.417-422, 2004.

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biol. Reprod.**, v.61, p.724-730, 1999.

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.119-126, 1990.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL M.O.; BEG, M.A. Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. **Biol. Reprod.**, v.70, 1374-1379, 2004a.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; MEIRA, C.; KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biol. Reprod.**, v.70, p.99-105, 2004b.

GINTHER, O.J.; MEIRA, C.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biol. Reprod.**, v.67, p.862-867, 2002.

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

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains: Equiservices, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.61-69, 2000.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction**: horses. Book 2. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995. 394p.

GLISTER, G.; TANNETTA, D.S.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1020-1028, 2001.

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

HAWK, H.W. Gamete transport in the superovulated cow. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.125-142, 1988.

HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.44, p.341-349, 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.

HSU, C.J.; HAMMOND, J.M. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor I production by porcine granulosa cells in vitro. **Endocrinology**, v. 120, p.198-207, 1987.

JOHNSON, A.L. Induction of ovulation in anestrus mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, n.5, p.983-986, 1986.

JOHNSON, A.L. Gonadotropin-releasing hormone treatment induces follicular growth and ovulation in seasonally anestrus mares. **Biol. Reprod.**, v.36, p.1199-1206, 1987.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, p.327-336, 1975.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, v.121, p.503-512, 2001.

LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. **J. Anim. Sci.**, v.44, n.5, p.834-842, 1977.

LOSINNO, L.L.; AGUILAR, J.J.; LISA, H. The impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2000, Saari. **Proceedings...**, Saari, 2000, p.39.

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, 2003.

MCCUE, P.M.; CAREY, N.J.; HUGHES, J.P.; RIVIER, J.; VALE, W.; LASLEY, B.L. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, v.38, p.823-831, 1992.

MCCUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASLEY, B.L. Effect on ovulation rate of passive immunisation of mares against inhibin. **Equine Vet. J.**, v.15 (Suppl.), p.103-106, 1993.

MCCUE, P.M. Superovulation. In: SQUIRES, E.L. (Ed). **The veterinary clinics of north america – equine practice**: diagnostic techniques and assisted reproductive technology. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p.1-11.

MCKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASHEN, R.L.; GREENWOOD, P.E.; VASEY, J.R. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin α -subunit. **Equine Vet. J.**, v.24, n.2, p.144-146, 1992.

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

MOOR, R.M.; KRUIP, T.H. A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v.21, p.103-116, 1984.

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

NISWENDER, K.D.; ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; ARDY, Q.P.; SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **J. Equine Vet. Sci.**, v.23, n.11, 2003.

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

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

RIERA, F.L.; ROLDÁN, J.E.; HINRICHS, K. Ipsilateral double ovulation is associated with reduced embryo recovery in mares. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...**, Rio de Janeiro, 2004, p.108-109.

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

SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C.; McCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v.58, p.151-164, 2002.

SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.300, 1992.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR., G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, n.5, p.661-670, 1986.

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

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, n.5, p.609-613, 1987b.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL JR., G.E. Superovulation. In: **Collection and transfer of equine embryos**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biothecnology Laboratory, 1995. p.32-38. (Bulletin, 8).

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

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, v.20, n.3, p.347-355, 1983a.

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Recent studies relating to the collection of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.19, n.1, 1983b.

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.21, n.3, 1984.

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

WOODS, G.L.; SCRABA, S.T.; GINTHER, O.J. Prospects for induction of multiple ovulations and collection of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.17, n.1, 1982.