

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA
(rbST) SOBRE A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E
RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS TRATADAS COM
EXTRATO DE PITUITÁRIA EQÜINA (EPE)**

GUSTAVO MENDES GOMES

BOTUCATU-SP
Agosto 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) SOBRE
A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM
ÉGUAS TRATADAS COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQÜINA (EPE)

GUSTAVO MENDES GOMES

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor

Orientador: Professor Adjunto Dr. Marco Antônio Alvarenga

BOTUCATU-SP
Agosto 2007

Dedico meu trabalho a Deus, Jesus Cristo,
Nossa Senhora e aos **meus pais**
que tanto acreditam e me dão força
para continuar meus trabalhos.

Dedico meu trabalho a **minha “grande” e eterna companheira,**
pois sem ela não teria realizado
e terminado este sonho.

A toda minha família que mesmo longe,
sempre esteve perto em espírito e força.

Ao meu orientador Marco Alvarenga pelo
companheirismo, confiança e segurança passados para mim.

Ao embrião mais importante da minha vida “Manuela”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por sempre terem me dado apoio, força, segurança e carinho em todos os momentos, seja longe ou perto.

À minha esposa e cúmplice Letícia, pela paciência, ajuda, compreensão e companheirismo nestes anos de trabalho e pelo maior presente que poderia ganhar (minha filhinha), com quem divido o mérito deste trabalho.

A toda família Patrão de Macedo, pois sempre me dão força e ajuda para seguir em frente.

Ao meu orientador, Marco Alvarenga por acreditar e confiar no meu trabalho, e por todas as oportunidades dadas por ele ao longo destes anos de amizade.

À minha amiga, irmã, Karen Leão (sem comentários).

Ao meu eterno mestre e irmão, Júlio Jacob por ter acreditado e participado da minha criação profissional e pessoal.

Ao Prof. Papa, pela ajuda, paciência, conhecimentos transmitidos e por eu ter a honra de ser seu amigo, obrigado por tudo, pelo exemplo de o que é amar a profissão.

Aos meus amigos e parceiros Coruja e Zé Dell'Aqua por me mostrarem que quando a gente realmente precisa de ajuda, amigos sinceros sempre estão do nosso lado, muito obrigado.

A Professora Fernanda e a Marina por sempre me receberem bem em sua casa hospedado.

À Professora Eunice Oba por ter aberto seu laboratório e ter me ajudado em realizar todas as dosagens hormonais do meu experimento, agradeço a Lú pois me ajudou muito também.

Ao Prof. Nereu, pois cada palavra que ele falou na minha qualificação, serviu e vai servir sempre como força para o resto da minha vida como pessoa e como profissional.

Ao Prof. Meira, pois pelo pouco que eu conheci me mostrou ser um Prof. de grande coração e conhecimentos (Não foi à toa que o Charlie falou tão bem).

Agradeço muito a todos os docentes da Unesp-Botucatu, Prof. Sony, Prof. Maria Denise, Prof. João, muito obrigado por tudo.

À Prof^a. Vera, Três, Osvaldo e Pedro pelos conselhos, companheirismo e força passados ao longo destes anos, e a todos funcionários da UFRRJ.

Ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Unesp-Botucatu, principalmente a Denise e Maria por me proporcionarem mais esta realização profissional.

Aos amigos verdadeiros, Miúdo, DJ, Nego, Mestre, Fofinho, Kalikinha, Dani, Chiquinho, Braszinho, Alexandre entre outros que amo.

Aos meus amigos irmãos da UFRRJ, Ana Paula, Andreíinha, Xará, Buchecha e Jaime, por tudo.

Aos meus amigos e companheiros de Botucatu, Gauchinha, Bió, Luciana, e aos funcionários, Valter e “Miguér”, por terem me ajudado tanto ao longo do meu trabalho.

Aos novos amigos, Marco “Cabeça” e Tati pela ajuda e amizade dados na minha estadia nos EUA, bem como, a família Maé.

Ao Marcio por ter disponibilizado o extrato de pituitária para ser realizado nosso experimento.

Ao casal que amo muito, Marcelo e Elen, pois sem eles....., bom, com certeza ia ser muito, mais muito difícil mesmo ter realizado meu Doutorado.

E a todos que me ajudaram e viveram juntos meu trabalho, principalmente a minha esposa e meus funcionários (Pedrinho e Paulinho), que nunca reclamaram em me ajudar mesmo depois do expediente e por passarem momentos difíceis e maravilhosos durante a estação de monta sempre me dando força.

RESUMO

GOMES, G. M. Efeito da somatotrofina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatória e recuperação embrionária em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE). Botucatu, 2007. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária- Área de concentração em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

A somatotrofina recombinante bovina (rbST) tem sido utilizado com sucesso em bovinos para melhorar resposta superovulatória e produção de embriões. Em função do exposto o objetivo deste estudo, foi o de avaliar o efeito da rbST na resposta superovulatória e recuperação embrionária de éguas superovuladas com EPE (12,5 mg duas vezes ao dia). Também foi estudado seu efeito na dinâmica ovariana de éguas superovuladas bem como determinando sua ação sistêmica através da avaliação dos níveis plasmáticos de insulina. Não foi observado efeito da associação do rbST ao protocolo de superovulação em éguas. Tendo sido a resposta superovulatória (2,93 e 2,86 ovulações, respectivamente para EPE e EPE+rbST), percentual de recuperação de embriões (46,3% x 60%, respectivamente para EPE e EPE+rbST) e número de embriões por égua tratada (1,36 e 1,71 embriões, respectivamente para EPE e EPE + rbST) similares entre os grupos ($p>0.05$). Da mesma forma, não foi observado efeito na dinâmica ovariana. Por outro lado a rbST se mostrou biologicamente ativo em éguas, pois aumentou significativamente os níveis plasmáticos de insulina 24 horas tendo o pico 48 horas após aplicação. Baseado nos resultados do presente experimento pode-se concluir que o rbST a despeito de se mostrar biologicamente ativo quando aplicado em éguas, não interferiu na resposta superovulatória e produção de embriões de éguas tratadas com EPE.

Palavras-chave: Éguas; Superovulação; Extrato de Pituitária Eqüina; Somatotrofina Recombinante Bovina; Insulina.

ABSTRACT

GOMES, G.M. Effect of bovine recombinant somatotropine (rbST) on the superovulatory response and embryo recovery of mares treated with equine pituitary extract (EPE). Botucatu, 2007. Thesis (PHD in Veterinary Medicine- Concentration Área, Animal Reproduction)- Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science- São Paulo State University- Botucatu Campus- Botucatu-Brazil.

The aim of superovulation is to increase the number of embryos from genetically superior animals in embryo transfer program. Many studies showed that mares fail to respond to conventional superovulating drugs used in other species like pFSH and PMSG. The only drugs that are effective in induce superovulation in mares are EPE (equine pituitary extract) and Equine FSH. Recent studies have reported an increase in the number of ovulations using a higher frequency of administration of EPE, but the embryo recovery rates are still low. Growth hormone has been used to improve the superovulatory response in cows. The main objective of this study was to evaluate the effect of bovine growth hormone (ST) in superovulatory response and embryo production of superovulated mares. The utilization of bST did not show any effect on ovarian response and embryo production when used in mares superovulated with EPE. The superovulation answer (2,93 e 2,86 ovulations, respectively for EPE and EPE+bST), embryo recovery rates per ovulation (51% e 66%, respectively for EPE and EPE+bST) and the number of embryos produced per mare (1,36 e 1,71 embryos, respectively for EPE and EPE+bST), were similar between the experimental groups ($p>0.05$). Also no effects on follicular dynamic was observed. However, bST showed to be biologic active for a long time, when injected in mares, inducing an increase on sistemic insulin levels. Based on the results of the present experiment we can cocluded that in spite of biologic active in mares bST did not interfere on superovulatory answer and embryo production of superovulated mares.

Key words: mare;superovulation; Equine Pituitary Extract; Recombinant Bovine Somatotropin; insulin

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fatores que influenciam a resposta superovulatória em éguas	3
2.1.1. Tipo de hormônio e protocolo	3
2.1.2. Status ovariano e fase do ciclo	14
2.2. Atuação do sistema IGF e insulina na fisiologia reprodutiva	16
2.3. Influência da ST em fêmeas superovuladas	23
OBJETIVOS	27
MATERIAL E MÉTODO.....	28
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da ST no trato reprodutivo feminino	20
Figura 2: Função da ST no controle ovariano	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da aplicação da somatotrofina recombinante bovina (rbST) no número de ovulações e recuperação de embriões entre os grupos controle e tratamento	36
---	-----------

Tabela 2: Número total de folículos maiores que 5 mm no D4 (dia de aplicação de rbST no grupo tratamento), no dia do início do tratamento superovulatório com EPE (D7), até o dia da última ovulação (DOV) nos grupos controle (EPE) e tratado (EPE + rbST)	36
--	-----------

Tabela 3: Dias de tratamento com EPE, intervalo entre a primeira ovulação e a última ovulação (IOV), intervalo entre início de tratamento e última ovulação (ITOV) diâmetro folicular médio (DMFOV) dos folículos que culminaram em ovulação (média $\pm$ desvio padrão)	37
--	-----------

Tabela 4: Médias e desvios-padrão referentes ao diâmetro dos folículos (mm) que culminaram em ovulação segundo momento e grupo experimental	39
--	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil de crescimento dos folículos que culminaram em ovulação no grupo controle e no grupo tratado..... 38

Gráfico 2: Níveis plasmáticos de insulina coletada do D4 (dia da aplicação do rbST no grupo tratamento) até a última ovulação nos grupos controle (EPE) e Tratado (EPE + rbST)38

Gráfico 3: Médias dos níveis plasmáticos de insulina do grupo tratado (EPE+ rbST) do D4 (momento de aplicação do rbST) até a última ovulação 39

Gráfico 4: Médias dos níveis plasmáticos de insulina do grupo controle (EPE) do D4 até a última ovulação39

LISTA DE ABREVIATURAS

bGH – Hormônio do Crescimento de origem bovina

bST – Somatotrofina bovina

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

E.P.E. - Extrato de Pituitária Eqüina

eCG - Gonadotrofina Coriônica Eqüina

eFSH - Hormônio Folículo Estimulante Eqüino

eGH – Hormônio de Crescimento de origem eqüina

et al. - colaboradores

FHRU - Fevold-Hisaw rat-units

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GH - Hormônio do Crescimento ou Somatotrofina

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

GIFT – Transferência Intrafalópio de Gametas

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

hMG - Gonadotrofina da Menopausa humana

ICSI - Injeção espermática intra-citoplasmática

IGF - Fator de Crescimento semelhante à insulina

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF-2 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2

IGFBP - Proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina

I.M. – intra-muscular

kg - quilograma (10^3)

kDa - quilodalton

LH - Hormônio Luteinizante

mg - miligrama (10^{-3})

ml - mililitro (10^{-3})

ng - nanograma (10^{-9})

pg = picograma (10^{-9})

pFSH – Hormônio Folículo Estimulante de origem suína

pGH - Hormônio de Crescimento de origem suína

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}

PMSG - Gonadotrofina Sérica da Égua Prenhe

UI - Unidade Internacional

rbST – somatotrofina recombinante bovina

OT – transferência de ovócito

TE – transferência de embrião

μg - micrograma (10^{-6})

μm - micrometro (10^{-6})

μUI – micro-unidade internacional

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A transferência de embriões (TE) tem como objetivo maior, suprir a demanda existente em relação a produtos com elevado potencial genético nos sistemas de produção eqüina. A superovulação em éguas visa elevar a taxa de embriões recuperados por colheita, aumentando a eficiência dos programas de TE e diminuir desta forma, despesas envolvendo um programa de transferência de embriões, já que, a manutenção das receptoras em receber embrião ao longo da estação de monta (vários ciclos), é o que mais encarece a técnica.

Atualmente em um programa de TE são necessários em média três ciclos por égua para se conseguir uma gestação, baseados nas taxas encontradas na literatura tanto de recuperação (média de 60%) quanto de gestação pós-transferência (média de 60%). O aumento de ovulações por ciclo através da superovulação é altamente desejável para que possamos conseguir em um único ciclo, obter três ovulações, dois embriões por lavado e pelo menos uma gestação, desta forma estaríamos garantindo sempre uma gestação por ciclo.

O estímulo para maturação de múltiplos folículos também é interessante para aumentar o número de ovócitos a serem aspirados (aspiração folicular), servindo para estudo e desenvolvimento de biotecnologias subseqüentes como: fertilização *in vitro* (FIV), transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), transferência de ovócitos (OT) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Outro fator benéfico, seria o aumento da oportunidade de prenhez ao usar sêmen congelado, utilizando sêmen de garanhão subfértil e/ou égua subfértil por aumentar o número de ovócitos, na tentativa de elevar a chance de ocorrer fertilização.

Estudos demonstram que as éguas são refratárias às drogas convencionais utilizadas para a superovulação em outras espécies, tais como o FSH suíno e o PMSG. Os únicos compostos que regularmente induz superovulação em éguas é o extrato de pituitária eqüina (EPE) e o FSH purificado eqüino (FSHe). Apesar de estudos recentes apresentarem índices satisfatórios relacionados à indução de múltiplas ovulações (4 a 5,0 ovulações/égua) quando administradas duas aplicações diárias de EPE, os índices de recuperação embrionária estão sempre abaixo do

esperado (30-40% recuperação/ovulação). Estudos recentes demonstraram haver um distúrbio no transporte e maturação oocitária quando da superovulação de éguas, o que pode explicar a baixa taxa de recuperação embrionária.

Sabe-se que o desenvolvimento folicular nas diferentes espécies de animais domésticos é controlado pelas gonadotrofinas produzidas pela hipófise, esteróides produzidos pelos ovários e fatores de crescimento (ST, IGF-1, IGF-2) produzidos tanto pelos ovários como por outros órgãos.

Recentes observações indicam que a somatotrofina (ST) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) promovem aumento da população de folículos antrais, melhora da maturação ovocitária, aumento de embriões transferíveis de fêmeas bovinas superovuladas. Além disso, auxiliam o desenvolvimento nos estágios embrionários iniciais e aumentam as taxas de prenhez em vacas superovuladas quando utilizados de forma exógena.

Estudo inédito comprovou que o uso de somatotrofina bovina recombinante (rbST) em eqüinos teve efeito semelhante ao ST eqüino aumentando a concentração de IGF-1 e de insulina circulante, sem efeitos colaterais para o animal. O uso desta ST bovina para éguas seria uma alternativa mais adequada pela sua meia vida mais prolongada e menor custo quando comparado ao ST eqüino.

O presente experimento teve como proposta verificar o efeito da rbST na resposta superovulatória e produção de embriões em éguas superestimuladas com EPE.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fatores que influenciam a resposta superovulatória em éguas

2.1.1. Tipo de hormônio e protocolo

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

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

Squires et al. (1987) também estudaram a ocorrência de múltiplas ovulações espontâneas, e observaram que duplas ovulações ocorrem uni e bilateralmente com a mesma frequência. Contudo, um maior número ($p < 0,05$) de embriões gêmeos foi recuperado quando houve uma ovulação em cada ovário.

Inúmeros protocolos e drogas foram estudados com o objetivo de induzir múltiplas ovulações na espécie eqüina sem a espera de múltiplas ovulações espontâneas. A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), GnRH, imunização contra inibina, FSH de origem suína, E.P.E. (IRVINE, 1981; SQUIRES *et al.*, 1986; MCCUE, 1996) e o FSH eqüino purificado (ALVARENGA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2003) já foram testados.

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

O eCG é usualmente utilizado na superovulação de ruminantes, porém sem efeito benéfico sobre o desenvolvimento folicular ou ovulação na égua (ALLEN, 1982; GINTHER, 1992), mesmo quando usado em altas doses não induz ovulações múltiplas, cuja causa, foi atribuído a limitada ligação do eCG aos receptores de FSH ovarianos de éguas não gestantes (STEWART & ALLEN, 1979; MCCUE, 1996).

Outra droga utilizada para tentar superestimular folículos de éguas é o GnRH. Contudo, a administração de GnRH em éguas ciclando não foi efetiva para a indução de múltiplas ovulações (IRVINE, 1981; SQUIRES *et al.*, 1989) obtendo resultado somente em éguas em anestro (ALLEN *et al.*, 1987; JOHNSON, 1986, 1987; JOHNSON & BECKER, 1988; GINTHER & BERGFELT, 1990). MCCue (1996) acredita que esta falha do GnRH durante a estação ovulatória deve-se a retroalimentação (“feedback”) negativa ocasionada pela inibina secretada pelos folículos. A inibina reduz a liberação do FSH pituitário, e conseqüentemente, acaba bloqueando o crescimento de pequenos folículos da onda folicular.

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

Evans & Irvine (1977) obtiveram ovulação em éguas que estavam na fase transicional utilizando três injeções de GnRH por dia, durante dez dias. A administração repetida ou prolongada de GnRH ou de seus análogos também foi utilizada com sucesso para induzir o crescimento folicular durante a estação anovulatória (EVANS & IRVINE, 1979; JOHNSON, 1986, 1987; ALLEN *et al.*, 1987; FITZGERALD *et al.*, 1987; HYLAND *et al.*, 1987; PALMER & QUELLIER, 1988).

Johnson (1986, 1987) e Palmer & Quellier (1988) utilizaram um sistema de liberação pulsátil através de bombas de infusão. Hyland *et al.* (1987) e Palmer & Quellier (1988) testaram minibombas osmóticas para uma liberação constante de GnRH natural. Já para os análogos, os sistemas de liberação testados que foram

eficientes incluem os implantes de baixa liberação (ALLEN *et al.*, 1987) e as injeções a cada 12 horas (FITZGERALD *et al.*, 1987).

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

Em outro estudo, éguas em anestro receberam 100, 200 ou 400 μ g de um análogo de GnRH, a cada 12 horas e exibiram taxas de múltipla ovulação de 24%, 32%, e 37%, respectivamente, sendo que o efeito da dose não foi significativo (GINTHER & BERGFELT, 1990).

A inibina é um hormônio gonadal não esteróide, solúvel em água, que regula a secreção do FSH através do “feedback negativo” (MCCUE, 1996), com pouca ou nenhuma ação sobre a secreção de LH (GINTHER, 1992). É uma glicoproteína que consiste de duas subunidades dissimilares, alfa (α) e beta (β) (BURGER & IGARASHI, 1988). A principal fonte de inibina é o folículo dominante, que através da inibição da secreção de FSH, promove a supressão dos folículos subordinados (IRVINE, 1981).

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

As primeiras tentativas utilizando a imunização ativa contra a inibina em bovinos e ovinos foi o uso de uma proteína (antígeno) parcialmente purificada do fluido folicular (HENDERSON *et al.*, 1984; CUMMINS *et al.*, 1986; PRICE *et al.*, 1987). Após o isolamento e a determinação da seqüência de aminoácidos da inibina, os estudos subseqüentes utilizaram fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade α da inibina como antígeno (MCCUE, 1996).

MCCue *et al.* (1992) e McKinnon *et al.* (1992) foram os primeiros a imunizarem éguas ciclantes contra a subunidade alfa (α) da inibina. Em 1992, McKinnon *et al.*

imunizaram éguas com a subunidade α recombinante bovina, observando um aumento de 1,18 para 1,86 ovulações após a primeira aplicação, e para 2,29 após a injeção de reforço, enquanto que as éguas controle tiveram um número de ovulações igual a 1,2. Já McCue et al. (1992) imunizaram éguas administrando um fragmento sintético da subunidade α da inibina suína. As éguas imunizadas ovularam um número significativamente maior de folículos por ciclo (2,8) do que as éguas não imunizadas (1,1). As taxas de recuperação embrionária (D7) também tenderam a ser maiores para as éguas imunizadas ($1,6 \pm 0,5$) em relação às não imunizadas ($0,7 \pm 0,2$), enquanto que a porcentagem de recuperação embrionária por ovulação foi similar para ambos os grupos, 58% e 57%, respectivamente.

A principal desvantagem em relação ao uso da imunização ativa contra a inibina em éguas diz respeito a necessidade de se realizar várias inoculações (MCCUE, 1996). Adicionalmente, a imunização ativa contra a inibina pode não ser eficaz e apropriada para todas as éguas (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Outros empecilhos são as reações adversas que variam de edema a abscessos, e que ocorrem ocasionalmente no local da imunização, porém, o efeito a longo prazo sobre a função ovariana, não é conhecido (MCCUE, 1996).

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

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

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

A administração do FSH suíno, duas vezes ao dia, a partir do final do diestro até a ovulação resultou em um número de ovulação de 1,2 (FORTUNE & KIMMICH, 1993), 1,5 (VESELINOVIC et al., 1994) e 1,7 folículos por ciclo (IRVINE, 1981). SQUIRES et al. (1986) utilizando 150 mg de FSH-p por dia, conseguiram em média 1,6 ovulações por égua. Resultado semelhante foi obtido por Sirois et al. (1992).

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

A dose de FSH-p administrada para as éguas é aproximadamente 70 vezes maior do que a dose normalmente utilizada para bovinos no intuito de promover múltiplas ovulações. E como observado, a resposta obtida com éguas é muito menor do que as reportadas para vacas. Os ovários das éguas parecem ser pouco sensíveis ao FSH suíno. Portanto, o uso do FSH-p tem limitada aplicação prática na reprodução eqüina devido a sua baixa eficácia e alto custo (MCCUE, 1996).

Inúmeros estudos observaram que as éguas são refratárias às drogas convencionais utilizadas para a superovulação em outras espécies tais como o FSH suíno e o PMSG (MCCUE *et al.*, 1996). Os únicos compostos que regularmente induzem superovulação em éguas são o extrato de pituitária eqüina (EPE) e, mais recentemente, o FSH eqüino (MACHADO *et al.*, 2003).

O primeiro relato de êxito da utilização de E.P.E. para a superovulação de éguas foi descrito por Douglas *et al.* em 1974. Foram tratadas éguas pôneis em anestro com duas injeções diárias de E.P.E. durante 14 dias, obtendo ovulação em aproximadamente 87% (25/29) dos animais e múltiplas ovulações (≥ 2) em 58%.

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

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

Além das taxas de ovulação já revisadas, outros trabalhos descrevem as taxas de ovulação alcançadas com aplicações diárias de 750 FHRU: $4,6 \pm 0,5$ (WOODS & GINTHER, 1984), $3,4 \pm 0,3$ (WOODS & GINTHER, 1985) e 2,2 ovulações por égua (SQUIRES *et al.*, 1986).

A otimização da dose de EPE para aumentar o número de ovulações por égua superovulada é o objetivo de diversos estudos. Inúmeros pesquisadores avaliaram a influência da dosagem e freqüência da aplicação de EPE em éguas no intuito de se

melhorar o número de ovulações (DOUGLAS, 1974 e 1979; LAPIN & GINTHER, 1977; WOODS & GINTHER, 1983; ALVARENGA *et al.*, 1999 e 2001).

Um dos grandes avanços da técnica de superovulação de éguas foi o aumento significativo no número de ovulações e embriões (7,1 ovulações e 3,5 embriões/égua) obtidos ao administrar duas vezes ao dia EPE comparado à aplicação única diária de EPE (2,4 ovulações e 1,5 embriões/égua), relatado por Alvarenga *et al.*, (2001).

Scoggin *et al.* (2002) concluíram que a melhora da resposta superestimulatória utilizando duas aplicações diárias de EPE seria devido ao aumento na frequência da administração da droga e não por consequência do aumento da dose total. Neste estudo, foi observado que a administração de 25 mg de EPE duas vezes ao dia elevou o número de ovulações (4,7 ovulações) por égua no entanto, apresentou uma baixa taxa de recuperação embrionária (2,1 embriões/égua). Os autores hipotetizaram que a maturação ovocitária seria o principal fator responsável por estes resultados. Ao administrar duas aplicações diárias de uma dose mais baixa de EPE (12,5 mg) estes autores observaram um declínio no número de ovulações/égua (3,4 ovulações) havendo contudo, um aumento na recuperação de embriões por colheita (2,6 embriões/égua), melhorando assim, o percentual de embriões por ovulação. Nesse estudo concluiu-se que possivelmente a redução da dose tenha sido um fator benéfico para a maturação ovocitária. Contudo este autor obteve uma menor resposta superovulatória (3,4 *versus* 4,7) e menor número de éguas respondendo ao tratamento (60% *versus* 90%) quando comparado ao protocolo 25 mg duas vezes ao dia.

Apesar de grande parte dos protocolos utilizados em bovinos utilizar tratamentos com duas aplicações diárias de FSH em doses decrescentes (MONNIAUX *et al.*, 1983), apenas em 2002, Scoggin *et al.* (2002) avaliaram a eficácia de um método similar em éguas. Neste experimento, iniciou-se o tratamento com 35 mg de E.P.E. duas vezes ao dia, e então diminuíram a dose em 10 mg por dia, até alcançar a dose de 10 mg. O número de folículos maiores ou iguais a 35 mm e o número de ovulações por égua foi de 4,0 e 3,3 respectivamente. O percentual de éguas com no mínimo duas ovulações foi de 88,9%; o número de embriões

recuperados por égua foi de 2,3; o percentual de embriões recuperados por ovulação foi igual a 60%, sendo que, este índice não foi significativamente superior ao grupo controle não tratado (41,7%).

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

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

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

Embora experimentos ao longo dos anos apresentem um aumento no número de ovulações por égua ao utilizar EPE, os índices de recuperação embrionária ainda estão abaixo do esperado (PALMER *et al.*, 1993; SQUIRES & SEIDEL, 1995; ALVARENGA *et al.*, 1999; CARMO *et al.*, 2002).

A baixa recuperação embrionária em éguas superestimuladas pode ser devido aos seguintes aspectos: deficiência no desenvolvimento folicular (DIPPERT *et al.*, 1994), produção de ovócitos de baixa qualidade (anormalidade na maturação folicular e ovocitária), falha na liberação do ovócito pelo folículo ovulatório (PALMER *et al.*, 1993), falha na captação dos ovócitos para o interior do oviduto (DIPPERT *et al.*, 1994), alteração no transporte do espermatozóide e/ou ovócito; tempo de trânsito dos embriões no oviduto influenciado por um desequilíbrio hormonal de estradiol e/ou progesterona (ALVARENGA *et al.*, 2001).

Embora nenhuma afirmativa concreta foi determinada quanto a retenção do ovócito na fímbria do infundíbulo, alguns pesquisadores (ONUMA & OHNAMI, 1975) encontraram uma massa gelatinosa globular em 76% dos ovidutos estudados e hipotetizaram que esta massa possa ter um papel de reter o ovócito não fertilizado no oviduto. Dippert *et al.* (1994) descreveram esta massa, como sendo um filamento de secreção de muco das células da granulosa próximo da ovulação. Durante a ovulação, esta secreção adere a fímbria do oviduto, ou migra para o interior do mesmo com o oócito, envolvendo-o sobre uma camada gelatinosa de origem folicular (LIU *et al.*, 1991). Onuma & Ohnami (1975) relataram que ovócitos ficam retidos no oviduto com maior frequência quando à presença desta massa globular. Por este motivo, Liu *et al.* (1991) teorizaram ser esta massa a responsável por obstruir o lúmen do oviduto, interferindo no transporte, bem como na aderência do ovócito na fímbria do infundíbulo, impedindo sua migração para o oviduto.

As falhas na fertilização têm sido atribuídas a anormalidades na maturação de oócitos (MOOR *et al.*, 1985) e a assincronia entre os eventos de maturação do oócito e do folículo (LOOS *et al.*, 1991), incluindo o tempo de ovulação (CALLESEN *et al.*, 1987) como uma consequência do estímulo hormonal. O efeito deletério dos altos níveis de LH foi observado por Donaldson & Ward (1986) em vacas superovuladas utilizando fármacos com altas concentrações de LH.

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

Lapin & Ginther (1977) encontraram 24 corpos lúteos em seis éguas que foram previamente tratadas com doses superestimulatórias de gonadotrofinas, inseminadas e que foram então necropsiadas três ou quatro dias após as ovulações. Somente 14 dos corpos lúteos mostraram traços na fossa da ovulação. Ainda, lavados dos ovidutos das éguas produziram apenas seis embriões e um oócito.

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

Alvarenga *et al.* (2001) relataram que um grande número de ovulações resultou em corpos lúteos funcionais, devido ao aumento nas concentrações de progesterona, e também não observaram diferença na taxa de recuperação de oócitos para éguas tratadas uma ou duas vezes por dia com E.P.E.

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

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

Carmo (2007) observou um maior acúmulo de sangue coagulado na fossa de ovulação nas éguas que apresentaram mais de três ovulações por ovário, concluindo

que este acúmulo de sangue coagulado provavelmente impede, em determinado momento, a migração de alguns ovócitos para o oviduto durante o processo de ovulação. Este mesmo autor conclui que além desse sangue coagulado, outros fatores interferem nos índices de recuperação embrionária associados ou não a este fato como: alterações nos mecanismos de maturação folicular e ovocitária e migração do ovócito para o oviduto.

2.1.2. Status ovariano e fase do ciclo

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

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

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

Pierson & Ginther (1990) iniciaram o tratamento com E.P.E. em quatro momentos diferentes, quando o maior folículo apresentou um tamanho de 15, 20, 25 ou 30 mm. Eles determinaram que a seleção ocorreu quando o diâmetro do maior folículo alcançou de 25 a 30 mm, pois a administração do E.P.E. quando o maior folículo tinha 15, 20 ou 25 mm no início do tratamento, resultou em uma resposta superestimulatória, o que não ocorreu quando o folículo já havia atingido 30 mm,

provavelmente porque, neste momento, o estabelecimento da dominância por parte do maior folículo e repressão dos demais já havia ocorrido.

Orlandi et al., (2006) aspiram todos os folículos em éguas durante a estação de monta (éguas ciclando) para iniciar o tratamento com E.P.E. duas vezes ao dia utilizando 12,5 mg. Estes autores iniciaram o tratamento nas éguas dividindo por grupo em relação ao tamanho do maior folículo após aspiração e concluíram que o melhor momento para se iniciar o tratamento superovulatório seria quando o maior folículo estivessem com o diâmetro entre 20-23mm comparando com outros diâmetros (13mm e 26mm), ou seja antes ou durante o momento da fase do desvio folicular.

Métodos para regularizar a atividade folicular e suprimir o desenvolvimento folicular antes do início do tratamento com E.P.E. incluem o uso de progesterona e estradiol (PIERSON & GINTHER, 1990; HOFFERER *et al.*, 1991) e análogos do GnRH (DIPPERT *et al.*, 1992; SCOGGIN *et al.*, 2002).

Alguns estudos também têm comparado as taxas de ovulação resultante de tratamentos com E.P.E. em diferentes momentos durante o ciclo estral. Woods & Ginther (1983) reportaram que o tratamento nos dias 15 ou 19 do ciclo resultou em um número de ovulação mais alto quando o tratamento iniciou no D15 ($2,9 \pm 0,5$) *versus* o D19 ($1,3 \pm 0,2$) com uma grande porcentagem de éguas exibindo múltipla ovulação (85,7% *versus* 28,7%), do que o tratamento realizado nos dias D15 a D19. Estes autores, observaram maior sincronismo das ovulações nas éguas tratadas com EPE e número de ovulações maiores para aquelas que receberam hCG.

2.2. Atuação do sistema IGF e insulina na fisiologia reprodutiva

Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, acumulam-se evidências de que o desenvolvimento de folículos pré-antrais independe da ação das gonadotrofinas, cuja participação é fundamental em estágios posteriores deste processo (MONNIAUX *et al.*, 1997).

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

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.

Possivelmente fatores de crescimento como o hormônio de crescimento (ST) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) participam da seleção de folículos dominantes, como sugerido em humanos e vacas, devido ao aumento das

concentrações de IGF-1 encontrado nos folículos maiores destas espécies (SPICER & ENRIGHT, 1991).

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, além de ter função estimulante na 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 (F₁, F₂ e F₃) de uma onda folicular induzida foi colhido em diferentes momentos, de acordo com o diâmetro do F₁. 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 no F₁ momentos antes do desvio, permanecendo mais elevadas no F₁ do que no F₂ e F₃ nas fases subseqüentes do desenvolvimento folicular (DONADEU & GINTHER, 2002).

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 são influenciadas pela concentração de IGF-I livre no fluido folicular (GINTHER *et al.*, 2004 a,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).

Davidson *et al.* (2002) concluíram que IGF-1, IGF-2 e IGFBP-2 e a IGFBP-5 são produzidas pelas células da granulosa em eqüinos e que a insulina, FSH e estradiol possuem uma importante função na regulação da esteroidogênese e do sistema IGF nas células da granulosa.

O hormônio de crescimento (GH) ou somatotrofina (ST) é um polipeptídio formado predominantemente por uma cadeia de 191 aminoácidos de massa

molecular de 22 kDa, sintetizado, armazenado e secretado por exocitose em células especializadas da hipófise anterior. Uma ST de tamanho molecular menor (20 kDa) também é secretado pela hipófise, totalizando 5 a 10% da ST presente na circulação, possuindo a mesma potencia que ao de 22 kDa em humanos (DE LUCIA & OLIVEIRA-FILHO, 2004).

Na espécie eqüina, a ST é liberado de forma pulsátil, aumentando de valores basais de cerca de 1-2 ng/ml a picos de 8 ng/ml e retornando a valores iniciais em aproximadamente 3 horas (CHRISTENSEN *et al.*, 1997). Essas liberações ocorrem duas a cinco vezes a cada 24 horas (THOMPSON *et al.*, 1992).

A ST é responsável pelo aumento dos níveis hepáticos do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), uma somatomedina que apresenta maior número de mRNA no fígado (FURLAN, 1998).

O sistema IGF é constituído pelos fatores de crescimento (IGFs) IGF-1 e IGF-2, e pela família das proteínas (IGFBPs) e proteases de IGFBP (WEBB *et al.*, 1999). Fatores de crescimento são polipeptídeos que possuem função parácrina, autócrina e/ou endócrina regulando crescimento e diferenciação celular (WEBER *et al.*, 2007). A atuação das IGFs é mediada por três receptores específicos: receptor IGF tipo 1, receptor IGF tipo 2 e receptor de insulina. A biodisponibilidade (transporte e meia-vida) das IGFs é modulada por um grupo de seis IGFBPs que seriam proteínas ligadoras de IGFs de alta afinidade (IGFBP1 a IGFBP 6) extremamente dispersas no meio extracelular de muitos tecidos (MACPHERSON *et al.*; 2002). Estas proteínas ligadoras de IGF's regulam a interação e o mecanismo de ação das IGF's com a matriz extracelular e a superfície das células nos tecidos (STEWART & ROTWEIN, 1996), bem como as proteases específicas (RAJARAM *et al.*, 1997).

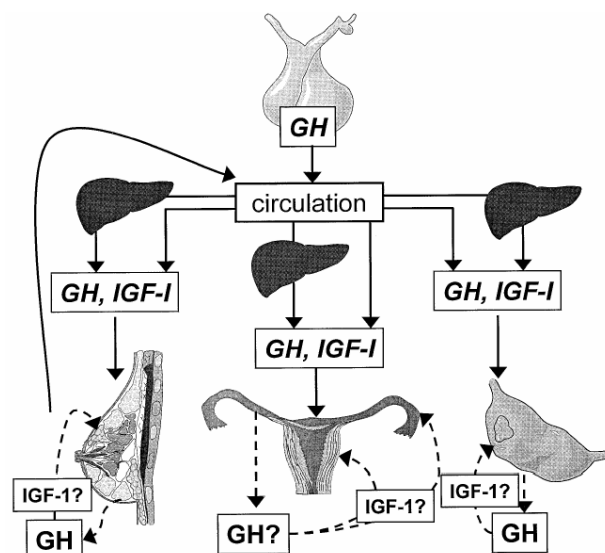
O IGF-1, também conhecido como somatomedina C, é um peptídeo de 70 resíduos de aminoácidos, que regula as ações do hormônio de crescimento (ST). O IGF-1 é sintetizado como um pró-hormônio, consistindo de cadeias A, B, C, D e E. O peptídeo IGF-1 maduro consiste nas cadeias A, B e C sendo estruturalmente homólogo ao IGF-2 e insulina (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989).

In vivo, o IGF-1 é secretado pelo fígado e por vários outros tecidos e, postula-se que possua ações mitogênicas e metabólicas no local da síntese ou próximo

destes; isto foi denominado como função parácrina do IGF-1 (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989). Por meio do IGF-1, diretamente ou indiretamente, os processos anabólicos, como a divisão celular, o crescimento do esqueleto e a síntese de proteínas, são estimulados.

Evidências clínicas e laboratoriais levam a crer que o sistema IGF está envolvido em eventos reprodutivos exercendo importantes funções no controle da função ovariana, embora o ST não seja considerado classicamente um hormônio da reprodução (HULL & HARVEY, 2000). Além disso, é provável que a ST esteja envolvido em outros eventos importantes como: diferenciação sexual, início da puberdade, nutrição fetal, crescimento fetal e desenvolvimento glandular mamário. As ações exercidas pelo ST nestes eventos podem ser reflexos de uma ação endócrina exercida pela ST hipofisário ou mediados por produção local ou hepática de IGF-1. A ST também é sintetizado nas gônadas, placenta e tecidos mamários e, talvez, este também exerça ação parácrina ou autócrina por vias reguladas pela ST hipofisário (HULL & HARVEY, 2000 - Figura 1).

Figura 1: Efeito da ST no trato reprodutivo feminino. ST hipofisário estimula a produção de IGF-1 hepático e ambos atuam no estímulo das glândulas mamárias, ovário, útero e/ou oviduto.



Segundo Hull and Harvey (Journal of Endocrinology, v. 168, p. 1-23, 2001)

Mulheres durante o ciclo menstrual apresentam um aumento de ST no momento da ovulação (HANSE & WEEKE, 1974) e as que apresentam folículos anovulatórios parecem apresentar insuficiência de ST quando comparado com mulheres normais (OVESEN *et al.*, 1996)

Estudos vêm sendo realizados para melhor definir os efeitos promovidos pelo ST na fisiologia reprodutiva das espécies domésticas. Pesquisas em humanos e vacas sugerem que o ST tem ação direta na atividade ovariana baseada na identificação de receptores de ST e proteínas ligadoras encontradas nos ovários (AMIT *et al.*, 1993; COHICK *et al.*, 1996).

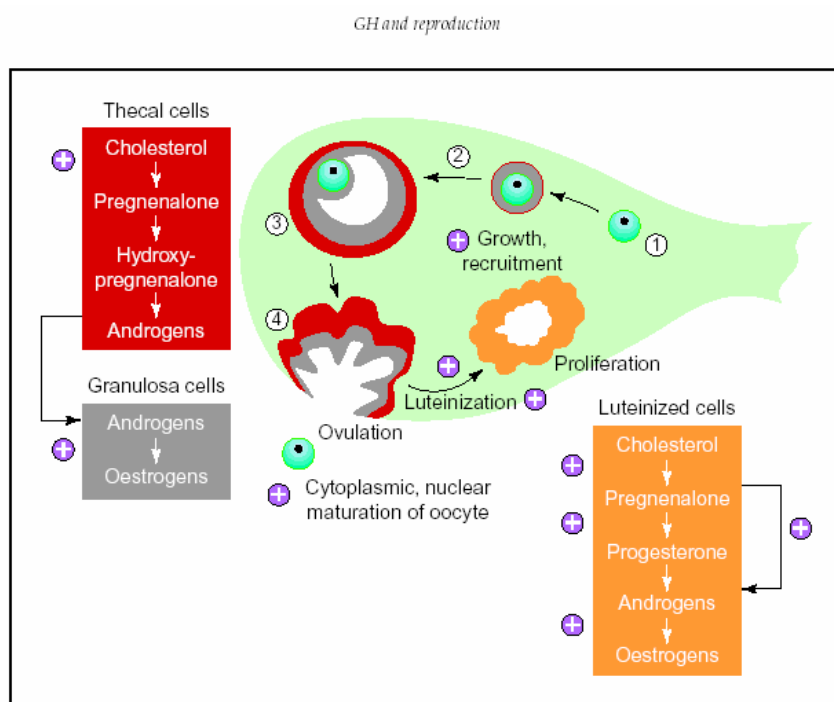
Muitos dos estudos em relação à função do Sistema IGF no controle intraovariano têm sido desenvolvidos *in vitro*. Uma das principais dificuldades encontradas é em relação à variação de espécie para espécie no que diz respeito aos padrões de localização e dos momentos em que ocorre a expressão de ST durante a foliculogênese. Por este motivo não é indicado se basear em alguns modelos experimentais e extrapolar para outras espécies animais (ARMSTRONG *et al.*, 1998).

Hoje já se sabe que em vacas, porcas, mulheres e éguas, o hormônio de crescimento é um importante regulador de síntese de IGF-1 em muitos tecidos (BUONOMO *et al.*, 1996) sendo administrado de forma exógena, leva ao aumento de IGF-1 circulante (BUONOMO *et al.*, 1996; BURATINI *et al.* 2000; DE KOCK *et al.* 2001).

Estudos em humanos demonstraram que o aumento de ST/IGF-1 eleva a produção de estradiol pelas células da granulosa e o sinergismo com FSH estimula a secreção de progesterona (Figura 2) em células da granulosa cultivadas *in vitro* (ADASHI *et al.*, 1989). Foi-se demonstrado que o ST/IGF-1 aumentam a secreção de progesterona no tecido luteal, confirmando a participação dos mesmos na regulação da produção de progesterona no corpo lúteo (LIBERMANN *et al.*, 1996). Receptores para IGF-1 e ST foram localizados nas grandes células lúteas, portanto podem ser importantes para a manutenção de altos níveis de progesterona secretados nessas células. Adicionalmente o ST pode influenciar indiretamente a função luteal pelo aumento da expressão de IGF-1, que é sintetizado pelo corpo lúteo e estimula a

secreção de progesterona, além de inibir a morte celular, permitindo a manutenção do peso luteal (LUCY *et al.*, 1993).

Figura 2: Função da ST no controle ovariano. A ST hipofisário e de origem ovariana se ligam a receptores de ST nas células da teca, granulosa e células lúteas para promover a esteroidogênese e gametogênese (+).



Segundo Hull and Harvey (J. Reprod. and Fert., v. 5, p. 175-182, 2000)

A presença de insulina e fatores de crescimento no ovário foi relatada pela primeira vez em porcas, como revisado por Spicer & Echternkamp (1995). Desde então, a presença de IGFs no fluido folicular de varias espécies tem sido documentada, em bovinos, ovinos, eqüinos e humanos (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995; SPICER *et al.*, 2002).

Mais de vinte anos após a determinação da seqüência de aminoácidos da insulina, em 1955, sugeriu-se o envolvimento da insulina como regulador da atividade ovariana (Spicer & Echternkamp, 1995). A insulina também foi apontada

como provável mediadora do rbST sobre o desenvolvimento folicular. A associação entre o aumento dos níveis circulantes de insulina e o aumento do número de folículos após tratamento com bST sustenta esta hipótese (GONG *et al.*, 1993; GONG *et al.*, 1997). A insulina também estimula a esteroidogênese e a proliferação de células da granulosa bovinas *in vitro* (GONG *et al.*, 1993; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995).

Em geral, os efeitos da insulina nas células ovarianas são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa e a produção de progesterona. Estudos realizados com suínos, ovinos e bovinos demonstraram os efeitos estimulantes da insulina e IGF-1 na proliferação das células da granulosa e síntese de DNA (SPICER *et al.*, 1993).

As estruturas da insulina, IGF-1 e IGF-2 foram determinadas e aproximadamente 45% dos aminoácidos que compõem essas moléculas são idênticas (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995).

Estudos realizados demonstraram que a insulina e o IGF-1 apresentam efeitos benéficos similares no desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, sugerindo que esse efeito deve ser mediado por uma reação cruzada com seus receptores (MATSUI *et al.*, 1997).

Molento *et al.* (2005), observaram que há uma interação entre a insulina e o rbST no mesmo padrão que os níveis de IGF-1 circulante, indicando que este possa ser um possível mediador dessa interação.

2.3. Influência da ST em fêmeas superovuladas

Estudos realizados em fêmeas domésticas têm demonstrado que a ST quando administrada associada aos hormônios comerciais de superovulação, promove melhora no protocolo superovulatório. Esta associação em vacas tem apresentado aumento na população de folículos antrais, melhora da maturação ovocitária, bem como, aumento no número de embriões transferíveis e ainda auxilia no desenvolvimento embrionários nos estágios iniciais (GONG *et al.*, 1993; HERRLER *et al.*, 1994; GONG *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 2002).

Alguns autores observaram aumento somente número de folículos pequenos, sem influência nos folículos médios e grandes, bem como no número de ovulações, sugerindo que o ST e o IGF-1 têm função de maior relevância no momento de recrutamento folicular que propriamente no crescimento folicular e ovulação (BUONOMO *et al.*, 1996). Pavlok *et al.* (1996) ao trabalhar com vacas, não observaram aumento no número total de folículos com a administração de rbST três dias antes da colheita dos ovários em abatedouro.

Um dos primeiros relatos da utilização de ST em vacas superovuladas foi realizado por Gong *et al.* (1991) onde foi observado aumento na população de folículos antrais ao administrar hormônio de crescimento, mediado por aumento da concentração de IGF-1 e insulina circulante (GONG *et al.*, 1993). Este aumento dos níveis circulantes de IGF-1 devido ao estímulo da produção hepática. De fato, por expressar grande quantidade de receptores para ST e produzir IGF-1 em resposta ao tratamento com ST, o fígado é reconhecido como o principal sítio de síntese de IGF-1 (GLUCKMAN *et al.*, 1987; PEEL *et al.*, 1987).

Quanto ao mecanismo pelo qual o bST influencia a atividade ovariana, primeiramente, deve-se destacar que a ação direta sobre o desenvolvimento folicular é bastante improvável. Esta afirmação baseia-se nos resultados de Lucy *et al.* (1993) que detectaram fraca expressão tanto do receptor para somatotrofina como do RNAm que o codifica em folículos ovarianos bovinos, hipotetizando ser uma ação indireta via IGF-1. Isto contradiz o achado de Cohick *et al.* (1996), já que estes detectaram receptores de ST em ovários de novilhas. Com Base nestes achados é

provável que a ST atue diretamente e indiretamente via IGF-1 nos ovários (Cochran et al, 1999).

Neves et al. (2005) observaram que não houve aumento no número de estruturas totais colhidas, ao utilizar o bST (doses de 250 e 500 mg) em vacas antes do início do protocolo superovulatório, porém, houve um aumento no número de embriões viáveis, independente da dose utilizada, sem alterar as taxas de gestação das receptoras, fato este decorrente provavelmente pela ação direta ou indireta do bST no estímulo metabólico de folículos antrais que normalmente entrariam em atresia (GONG et al., 1996).

A manipulação da dinâmica folicular em bovinos pode permitir maior disponibilidade de oócitos pela técnica de aspiração folicular por auxílio do ultra-som em programas de FIV. Essa maior disponibilização de oócitos pode ser obtida pelo uso do rbST, já que este apresenta efeito no crescimento folicular em vacas (GONG et al., 1991, 1993, 1996; DE LA SOTA et al., 1993).

O bST aumenta a população de folículos em vacas de origem européia (GONG et al., 1991, 1993, 1996; DE LA SOTA et al., 1993; WEBB et al., 1994) e em vacas nelores (CARTER et al., 1998; BURATINI et al., 1999). Crystal et al. (1997) relataram que o efeito deste hormônio seria primeiramente na fase de recrutamento do crescimento folicular, não sendo afetadas a seleção de folículos grandes e o número de ovulação.

Alguns trabalhos indicam que o bST aumenta o número de ovócitos e embriões (GONG et al., 1993; GONG et al., 1997; RIEGER et al., 1991), devido ao aumento de número de folículos pequenos e do número de ovulação (GONG et al., 1993). Entretanto Gray et al. (1993) não obtiveram aumento no número de embriões transferíveis, após tratamento com bST.

Ramos et al. (2007) observaram que a administração de somatotropina em vacas superovuladas antes de aspirar os folículos, aparentemente levou a uma melhora na qualidade dos ovócitos, pois houve um aumento nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos, bem como, uma melhora no desenvolvimento embrionário.

Folch et al. (2001) ao utilizarem pFSH e pST (origem suína) para superovular ovelhas observaram uma maior taxa de oócitos não fertilizados e embriões não transferíveis no grupo controle (sem aplicação de ST, somente FSH) quando comparado às ovelhas em que receberam FSH associado com ST, e concluíram que a ST teve efeito benéfico devido a ação direta sobre a maturação ovocitária ou indireta sobre o ambiente do oviduto. Ao utilizar rbST em búfalas, Soogsasen et al. (1999) também observaram aumento no número de embriões transferíveis por colheita demonstrando uma significativa melhora no protocolo de superovulação com a associação de ST e FSH em fêmeas bubalinas.

Alguns autores têm estudado a possibilidade de melhorar a resposta superovulatória nas fêmeas domésticas com a adição da ST aos protocolos visando aumentar o recrutamento de folículos antrais no início da onda folicular e conseqüentemente o número de ovulações. Buratini et al. (2000) observaram aumento na população de folículos pequenos ao administrar 320 mg de bST subcutâneo em vacas após ablação do folículo dominante, porém, este aumento no número de folículos médios não foi detectado, fato já detectado por Deaver & Bryan (1999).

Particularmente na espécie eqüina, pouco se sabe sobre os efeitos da ST no desenvolvimento folicular, bem como os efeitos de outros fatores de crescimento (IGF-I e II), receptores e proteínas ligadoras encontradas nos ovários sobre o crescimento folicular (COCHRAN, *et al*, 1999)

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

Gerárd et al. (1999) relataram queda na concentração intrafolicular de estradiol e aumento nos níveis de progesterona nos folículos pré-ovulatórios. Os folículos subordinados foram caracterizados por níveis baixos de estradiol e progesterona. Entretanto, folículos pré-ovulatórios que entraram em atresia, verificou-se a associação de uma concentração muito baixa de estradiol com um aumento

exacerbado nos níveis de progesterona. Neste estudo, foi observado que o desenvolvimento folicular é caracterizado por declínio de IGFBP-2 intrafolicular e IGFBP-5 antes da aplicação de hCG, e logo após administração, um aumento de IGFBP-2.

Cochran et al. (1999) administraram 25µg (IM) de eST por quilo de peso corpóreo, a fim de verificar seu efeito no desenvolvimento folicular. Estes autores observaram aumento somente na população de folículos pequenos nos ovários destas éguas tratadas.

Buonomo et al (1996) e De Kock et al (2001) utilizando bST, comprovaram que o hormônio de crescimento bovino foi biologicamente ativo em cavalos com a possibilidade de igual efeito do ST eqüino, ou seja, foi capaz de induzir a um aumento na concentração de IGF-1 e insulina circulante. Esta seria uma alternativa para facilitar o acesso à compra e baratear os custos, dada à dificuldade da comercialização da ST eqüina.

O único relato da administração de ST com objetivo de se melhorar o protocolo superovulatório foi realizado por Hofferer et al. (1991). Estes autores introduziram esponja intravaginal contendo trembolone + benzoato de estradiol, e após 7 dias retiram as esponjas e dividiram as 12 éguas em dois grupos. Um grupo foi submetido a superovulação (25 mg de EPE uma vez ao dia) e o outro grupo foi administrado 0,25 mg do hormônio do crescimento suíno (pST) diariamente associado ao tratamento superovulatório com E.P.E. Foi reportada um número de ovulação média de 2,2 ovulações para as éguas tratadas apenas com E.P.E., comparada com 2,3 ovulações para o grupo tratado com E.P.E. mais a ST. Portanto, a adição do hormônio não representou nenhum aumento aparente da efetividade do tratamento com E.P.E.

Na literatura consultada não foi encontrado nenhum estudo que tenha utilizada a rbST em éguas associada ao protocolo superovulatório, porém, em função de sua resposta quando utilizada em bovino, justifica ser estudada em éguas com base na hipótese que a rbST pode aumentar o número de ovulações e de embriões recuperados por égua.

3. OBJETIVOS

- 1- Verificar se a incorporação da somatotrofina recombinante bovina (rbST) ao protocolo de tratamento com EPE (12,5 mg duas vezes ao dia) melhora a resposta superovulatória e recuperação embrionária na espécie eqüina;
- 2- Verificar se o protocolo de superovulação com a dose 12,5 mg duas vezes ao dia independente da associação ou não com rbST, seria eficiente em induzir resposta superovulatória com boa taxa de recuperação de embriões;
- 3- Verificar o efeito da somatotrofina recombinante bovina na dinâmica folicular de éguas superovuladas;
- 4- Verificar se o rbST tem efeito sistêmico quando aplicado em éguas através da avaliação dos níveis plasmáticos de insulina;

MATERIAL E MÉTODO

PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQÜINA (EPE)

As pituitárias foram adquiridas no matadouro de eqüinos da cidade de Pelotas/RS e preparadas no laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, conforme metodologia descrita por Guillou e Combarous (1983).

ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado no Centro Avançado de Reprodução Eqüina, localizado no município de Vassouras–RJ (Latitude de 22°24'14" S; Longitude de 43°39'45" W; Altitude de 434 m) durante os meses de setembro à março. Foram utilizadas 15 éguas (n=30 ciclos) da raça Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista reprodutivamente normais com idade entre 4-12 anos e peso corporal entre 350-500 kg, durante a estação reprodutiva 2004/2005. Os animais foram submetidos a controle folicular, através de exames ultrassonográficos transretais diários, para que fosse detectada a ovulação. Após quatro dias da ovulação (D4), os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, respeitando o intervalo de um ciclo entre os tratamentos. As 15 éguas serviram como próprio controle, ou seja, passaram por todos os grupos, ao longo do estudo proposto, conforme descrito abaixo:

DINÂMICA FOLICULAR E ENSAIO HORMONAL

Das 15 éguas, 7 (n=7 por grupo) foram selecionados aleatoriamente com intuito de verificar a dinâmica folicular bem como realizar coleta de sangue para dosagem sérica de insulina com intuito de indiretamente verificar a atividade sistêmica biológica da rbST em eqüinos.

As éguas foram submetidas a os exames ultrassonográficos transretais diários a partir do início do tratamento (Grupos GC e GT) para monitoramento da atividade ovariana e da condição uterina. Para tanto, foi utilizado um aparelho de ultra-som da Pie Medical modelo Falcon 100 Vet[®] com transdutor linear de 6 Mhz de frequência. Todos os folículos com diâmetros maiores ou iguais a 6 mm eram medidos. Os diâmetros dos dois maiores folículos foram determinados por meio da média aritmética das duas maiores distâncias transversais do antro folicular em uma única imagem congelada no monitor do aparelho de ultra-sonografia (GINTHER, 1995).

A designação dos folículos se baseou no máximo diâmetro atingido pelos mesmos, sendo o folículo 1 (F₁) aquele que atingiu maior diâmetro; folículo 2 (F₂) o de segundo maior diâmetro; folículo 3 (F₃) o de terceiro e assim sucessivamente dependendo de quantas ovulações a égua tenha apresentado.

Após o acompanhamento ultrassonográfico eram coletadas amostras de sangue (Grupos GC e GT) obtidas por punção da veia jugular, em tubo contendo EDTA. As amostras eram coletadas no mesmo horário (parte da tarde), iniciando-se no quarto dia de ovulação (D4) até a última ovulação para dosagem de insulina.

As amostras eram identificadas e centrifugadas e o plasma era separado e armazenado a -15°C até o momento das dosagens.

DOSAGEM SÉRICA DE INSULINA

As dosagens de insulina foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista. A concentração plasmática de insulina foi avaliada a fim de verificar se o rbST tem efeito sistêmico em éguas, uma vez que em vacas a somatotrofina aumenta níveis séricos IGF-1, glicose e insulina (BREIER & SAUERWEIN, 1995).

A insulina foi dosada através de Radioimunoensaio (RIA) utilizando o Kit Coat-A-Count do Diagnostic Products Corporation® (DPC) em fase sólida onde a insulina marcada com iodo ¹²⁵I compete, por um período fixo de tempo, com a insulina da amostra do animal para os sítios específicos do anticorpo anti-insulina. Em razão do anticorpo estar imobilizado na parede de tubo de polipropileno, uma simples decantação do sobrenadante é suficiente para determinar a competição e isolar a fração de insulina radiomarcada ligada ao anticorpo. A análise foi realizada em contador GAMMA, o qual gerou um número, ao ser convertido pela curva de calibração na medida de insulina presente na amostra do animal.

METODOLOGIA EMPREGADA PARA DOSAGEM DE INSULINA

Foram rotulados quatro tubos de polipropileno 12x75mm em tubos T (contagem total) e NSB (ligação não específica) em duplicata, e mais quatorze tubos revestidos de insulina Ab em A (ligação máxima) e de B a G em duplicata, para controle e amostras dos animais. Foram pipetados 200 µl do calibrador zero A nos tubos NSB e A, e 200 µl de cada calibrador remanescente, controle e amostra de paciente nos tubos pré-preparados. Logo após, foi adicionado 1 ml de insulina ¹²⁵I a todos os tubos e agitados em Vórtex, foram incubados por 24 horas à temperatura ambiente. Após 24 horas de decantação foi removido todo o líquido de todos os tubos, usando uma estante de espuma para decantação. Todos os tubos (exceto os tubos T) foram deixados escorrer por 2 ou 3 minutos, eliminando todas as gotas residuais em papel absorvente. Era contado 1 minuto em contador gama por cada amostra lida. A leitura foi feita e o resultado foi dado em µUI/ml de insulina.

- Coeficiente de variação intra e interensaio igual a 0,87

Grupo GC- controle (12,5 mg/IM de EPE, duas vezes ao dia)

As éguas foram superovuladas com Extrato de Pituitária Equina (EPE), de acordo com o seguinte protocolo:

-Primeiro dia de tratamento (sétimo dia pós-ovulação): início da administração de EPE (12,5 mg/I.M.) pela manhã (7:00h.) e à tarde (18:00h.). Após uma hora e meia de início de tratamento (manhã), era aplicada PGF_{2α} (Dinoprost, 10mg).

-Segundo dia de tratamento: Foram administrados pela manhã (7:00 horas) 12,5mg/I.M. de EPE e uma hora e meia depois, PGF_{2α} (Dinoprost, 10mg). Na parte da tarde (18:00h.), foram aplicados 12,5mg/IM de EPE.

-Terceiro dia a no máximo doze dias de tratamento: Foram aplicados 12,5mg/IM de EPE no período da manhã e da tarde (7:00 e 18:00h.).

Grupo GT- tratado (12,5 mg/I.M. de EPE, duas vezes ao dia + bST)

As éguas foram superestimuladas com Extrato de Pituitária Eqüina (EPE) associada com aplicação da somatotrofina recombinante bovina (250 mg Boostin® Schering Plough-São Paulo-SP), conforme o seguinte protocolo:

-Quarto dia de ovulação (D4): Foi administrada (única aplicação) da somatotrofina recombinante bovina (250 mg Boostin®) I.M. dividido em dois pontos de aplicação (0,5 ml em cada ponto) três dias antes (D4) ao início da aplicação de EPE.

-Primeiro dia de tratamento com EPE (D7): início da administração de EPE (12,5 mg/I.M.) pela manhã (7:00h.) e à tarde (18:00h.). Após uma hora e meia de início de tratamento (manhã), foi aplicada PGF₂∞ (Dinoprost, 10mg).

-Segundo dia de tratamento com EPE: Foram administrados pela manhã (7:00 horas) 12,5mg/I.M. de EPE e uma hora e meia depois, PGF₂∞ (Dinoprost, 10mg). Na parte da tarde (18:00h.) foram aplicados 12,5mg/I.M. de EPE.

-Terceiro dia a no máximo doze dias de tratamento com EPE: Foram aplicados 12,5mg/I.M. de EPE no período da manhã e da tarde (7:00 e 18:00h).

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E COLHEITA DOS EMBRIÕES

O tratamento dos dois grupos foi interrompido quando a maioria dos folículos atingia 35 mm de diâmetro, administrando neste momento, 2500 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG- Vetecor®) por via endovenosa.

As éguas foram inseminadas diariamente após aplicação de hCG até detecção da última ovulação, utilizando a dose de sêmen a fresco de 1 bilhão de espermatozoides viáveis proveniente de três garanhões de fertilidade conhecida (Anexo A) sendo utilizado o mesmo garanhão para as mesmas fêmeas nos dois grupos.

As éguas foram inseminadas com metodologia convencional (pipeta ultrapassando o cérvix e depositando o sêmen no corpo uterino) utilizando o diluente comercial a base de leite desnatado Botu-sêmen[®].

As colheitas dos embriões foram realizadas no oitavo dia após a última ovulação depois do tratamento superovulatório, utilizando-se 03 lavados uterinos de 1 litro cada de ringer com lactato de sódio (Alvarenga et al. 1993). Era realizado um rasteamento minucioso em lupa pela placa de petri contendo o lavado uterino para a identificação dos embriões.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da dinâmica folicular ovariana obtidas através de ultrassonografia foram calculados por análise de perfil (grupos e momentos). Para comparação dos diâmetros médios dos folículos que ovularam; dias de tratamento de EPE e números de folículos em relação ao tamanho médio no dia da aplicação do bST (D4) e início do tratamento superovulatório (D7) e chegaram a ovular, foi usado o Teste T de Student não pareado.

A comparação entre os grupos experimentais em relação ao número de ovulações e número de embriões recuperados, foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

Os níveis plasmáticos de insulina foram submetidos à análise de perfil para grupos e momentos.

As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Vetecor[®] - Laboratorio CALIER do Brasil Ltda - São Paulo-SP

Botu-sêmen[®] - Biotech- Botucatu-SP

RESULTADOS

Os folículos do grupo controle e tratado apresentaram uma taxa de crescimento similar, não havendo diferença estatística em relação ao crescimento folicular entre ambos os grupos (Gráfico 1).

O intervalo entre ovulações em ambos os grupos foram similares, onde as ovulações ocorreram de forma sincrônica, ou seja, 24 a 48 hs após a indução da ovulação com hCG (tabela 3) não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

A primeira ovulação ocorreu em média após 9,21 e 9,27 dias do início do tratamento no grupo controle e tratado respectivamente, não havendo diferença ($p > 0,05$) entre os grupos.

O diâmetro dos folículos pré-ovulatórios foi menor ($p < 0,05$) no grupo tratado com rbST ($33,68 \pm 2,58$) comparado ao grupo controle ($36,05 \pm 2,27$) (tabela 3).

Houve um aumento sérico significativo de insulina ($p < 0,05$) já detectado 24 horas após aplicação do rbST, ocorrendo um pico em 48 horas (Gráfico 2).

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) dos níveis de insulina circulante no grupo controle (Gráfico 4).

Ao analisarmos o grupo controle podemos observar que a égua 6 apresentou maiores variações nos níveis séricos de insulina contudo estas variações foram significativas ($p < 0,05$) somente quando comparado com outras duas éguas (égua 1 e égua 3) do seu grupo (anexo D).

Ao analisarmos as éguas do grupo tratado (anexo E) podemos observar que as éguas 3 e 8 apresentaram uma resposta modesta ao tratamento do rbST pelo menos via mensuração de insulina sérica, não diferindo estes valores ($p > 0,05$) dos outros dias de dosagem.

Foram recuperados 19 embriões no grupo controle (EPE) de 41 ovulações (46,3% recuperação por ovulação) e 24 embriões no grupo tratado (EPE + rbST) de 40 ovulações (60% recuperação por ovulação), totalizando 28 ciclos estrais. Não houve diferença estatística entre os grupos associando ou não o rbST ao protocolo

de superovulação, entretanto, as diferenças numéricas foram evidentes entre os grupos: 14 pontos percentuais superior no grupo tratado com rbST (tabela 1).

Também não houve diferença ($p > 0,05$) entre o grupo controle e o grupo tratado em relação às taxas de ovulação por égua ($2,93 \pm 0,83$ e $2,86 \pm 0,86$, respectivamente) e a taxa de embriões recuperados por égua ($1,36 \pm 0,63$ e $1,71 \pm 0,61$).

Todas as éguas responderam ao tratamento com duas ou mais ovulações, e em 100% das éguas do grupo tratado foi recuperado pelo menos um embrião.

Em relação ao número de ovulações obtidas no estudo, observamos que no grupo tratado, 42,9% das éguas apresentaram dupla ovulação e 57,1% apresentaram tripla ovulação (tabela 1) e no grupo controle, 39,3% das éguas apresentaram dupla ovulação e 64,3% apresentaram tripla ovulação, ou seja, a resposta ao EPE com o rbST para estimulação ovariana foi de 100% das éguas para múltiplas ovulações (≥ 2 ovulações) em ambos os grupos experimentais.

No grupo controle houve uma égua com dupla ovulação, porém não houve recuperação de embrião, caracterizando em 7% o índice de éguas com lavados negativos. Apesar de não ter tido diferença significativa ($p > 0,05$), o grupo tratado com rbST apresentou 21% a mais de lavados com dois ou mais embriões do que o grupo controle (64,3% *versus* 42,9%, $p = 0,27$).

Uma égua do grupo tratado foi descartada pelo fato de ter apresentado uma hiperestimulação ovariana com 6 folículos de diâmetro pré-ovulatório, embora nenhum tenha ovulado (anexo B).

Não houve aumento na população de folículos e no número de ovulações ($p > 0,05$) ao administrar o rbST conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 1: Efeito da aplicação da somatotrofina recombinante bovina (rbST) no número de ovulações e recuperação de embriões entre os grupos controle e tratamento.

	GRUPO	
	CONTROLE EPE	TRATAMENTO rbST + EPE
Nº de éguas (n)	14	14
Nº Ovulações	41	40
Total de embriões recuperados (n)	19	24
Percentual de recuperação por ovulação	46,3% ^a	60,0% ^a
Número médio de ovulações/égua	2,93 ± 0,83 ^b	2,86 ± 0,86 ^b
Número médio de embriões/égua	1,36 ± 0,63 ^c	1,71 ± 0,61 ^c
Éguas com 2 ovulações	5/14 (39,3%) ^d	6/14 (42,9%) ^d
Éguas com ≥ 3 ovulações	9/14 (64,3%) ^e	8/14 (57,1%) ^e
Nenhum embrião recuperado	1 (7,1%) ^f	0 (0%) ^f
1 embrião por colheita	7/14 (50%) ^g	5/14 (35,7%) ^g
2 embriões ou mais por colheita	6/14 (42,9%) ^h	9/14 (64,3%) ^h

Valores na mesma linha, com letras diferentes diferem estatisticamente.

^a (p = 0,93); ^b (p = 0,99); ^c (p=0,97); ^d (p = 0,70); ^e (p = 0,71); ^f (p = 0,31); ^g (p = 0,26); ^h (p = 0,27)

Tabela 2: Número total de folículos maiores que 5 mm no D4 (dia de aplicação de rbST no grupo tratamento), no dia do início do tratamento superovulatório com EPE (D7), até o dia da última ovulação (DOV) nos grupos controle (EPE) e tratado (EPE + rbST).

	D4 Nº folículos	D7 Nº folículos	D ovulações Nº ovulações
Controle	30 ^a	32 ^b	21 ^c
Tratado	34 ^a	35 ^b	20 ^c

Valores na mesma coluna, com letras diferentes, diferem estatisticamente.

Obs.: D4 dia de aplicação do rbST (grupo tratado); D7 dia de início do protocolo de superovulação com EPE em ambos os grupos

Tabela 3: Dias de tratamento com EPE, intervalo entre a primeira ovulação e a última ovulação (IOV), intervalo entre início de tratamento e última ovulação (ITOV) diâmetro folicular médio (DMFOV) dos folículos que culminaram em ovulação (média $\pm$ desvio padrão).

	CONTROLE EPE	TRATAMENTO rbST + EPE
Dias de tratamento	8,14 $\pm$ 1,1 ^a	8,29 $\pm$ 1,2 ^a
IOV	0,86 $\pm$ 0,8 ^b	0,71 $\pm$ 0,4 ^b
ITOV	9,21 $\pm$ 1,2 ^c	9,27 $\pm$ 1,3 ^c
DMFOV	36,05 $\pm$ 2,27 ^d	33,68 $\pm$ 2,58 ^e

Valores na mesma linha, com letras diferentes, diferem estatisticamente.

^a (P = 0,811); ^b (P = 0,718); ^c (P = 0,891); ^{d,e} (P=0,003)

Tabela 4: Médias e desvios-padrão referentes ao diâmetro dos folículos (mm) que culminaram em ovulação segundo momento e grupo experimental.

Grupo	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Controle	10,2gh $\pm$ 3,1	11,0gh $\pm$ 3,1	11,8fg $\pm$ 2,9	12,5fg $\pm$ 3,1	14,2f $\pm$ 2,9	16,8f $\pm$ 3,5	20,3e $\pm$ 4,4	23,4d $\pm$ 4,8	27,3c $\pm$ 4,1	30,6b $\pm$ 4,3	33,9a $\pm$ 3,3
Tratado	10,0gh $\pm$ 3,6	10,7gh $\pm$ 3,8	11,4g $\pm$ 3,9	12,1eg $\pm$ 4,2	14,6ef $\pm$ 3,8	17,4de $\pm$ 3,5	20,0cd $\pm$ 3,3	22,4c $\pm$ 3,8	25,5c $\pm$ 4,2	29,0b $\pm$ 4,3	31,3a $\pm$ 5,2

Médias de cada grupo seguidas de diferentes letras diferem estatisticamente

Não houve diferença entre os grupos em cada momento.

Gráfico 1 – Perfil de crescimento dos folículos (mm/dia) que culminaram em ovulação no grupo controle e no grupo tratado

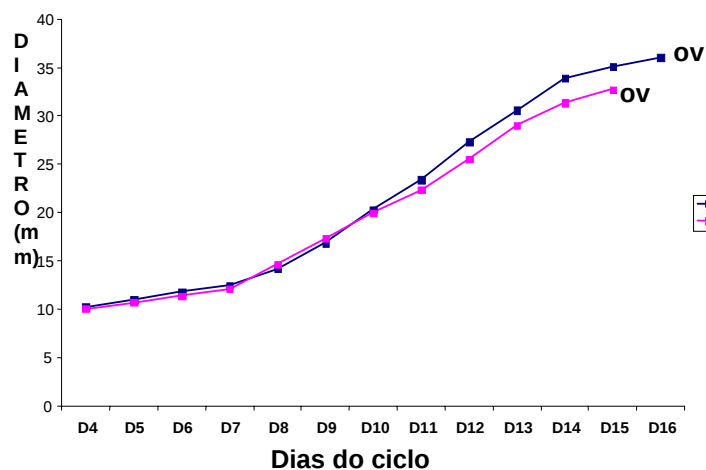


Gráfico 2 - Níveis plasmáticos de insulina coletada do D4 (dia da aplicação do rbST no grupo tratamento) até a última ovulação nos grupos controle (EPE) e Tratado (EPE + rbST).

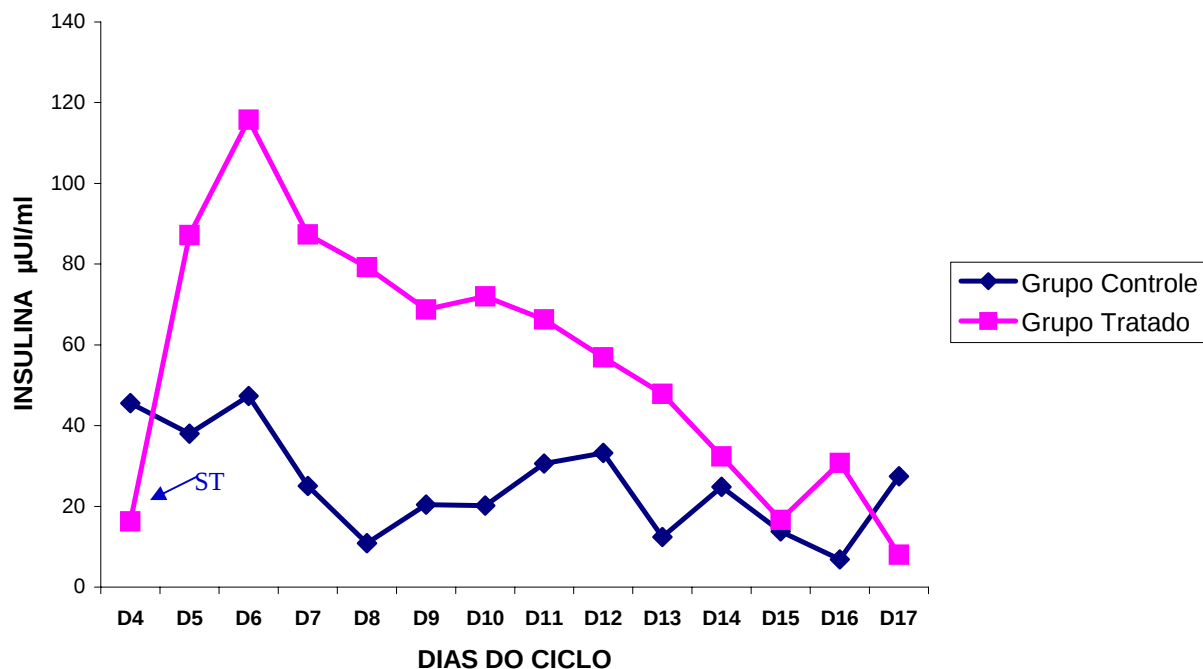
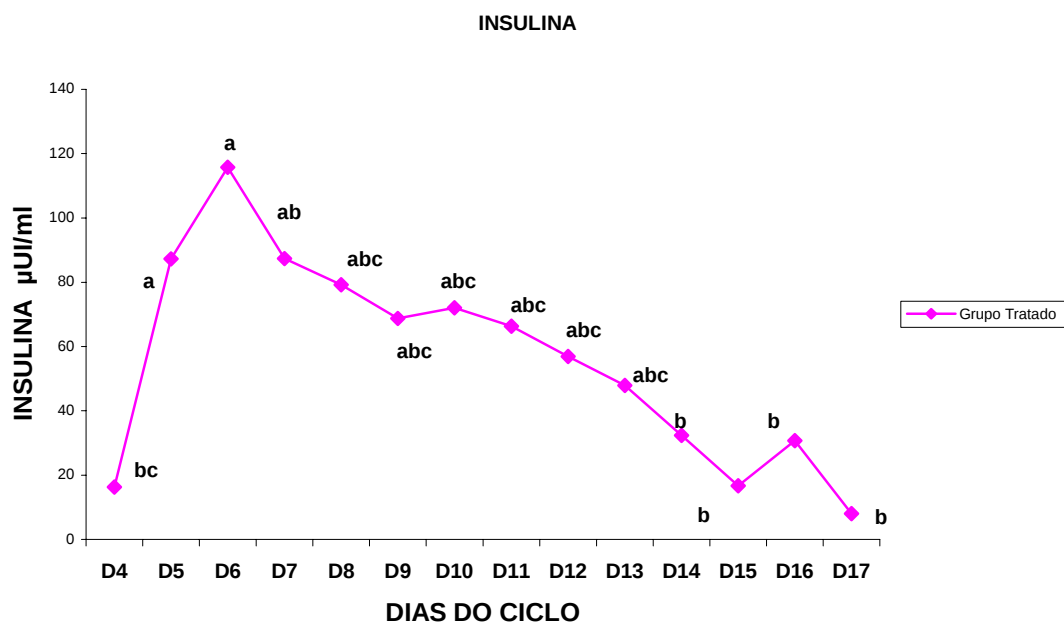
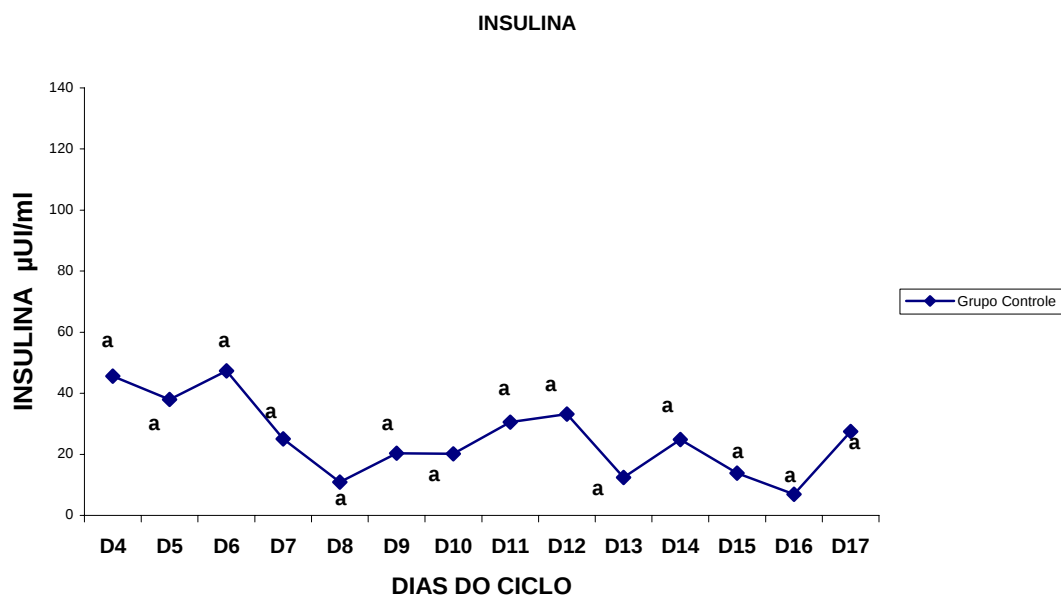


Gráfico 3 – Médias dos níveis plasmáticos de insulina do grupo tratado (EPE+ rbST) do D4 (momento de aplicação do rbST) até a última ovulação.



* Médias seguidas de diferentes letras diferem estatisticamente

Gráfico 4 – Médias dos níveis plasmáticos de insulina do grupo controle (EPE) do D4 até a última ovulação.



* Médias seguidas de diferentes letras diferem estatisticamente

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que não houve efeito do rbST sobre a população dos folículos, no número de ovulações e nem no número de embriões recuperados em éguas superovuladas com EPE.

Pavlok et al. (1996) ao trabalhar com vacas, também não obtiveram aumento no número total de folículos com a administração de rbST três dias antes da colheita dos ovários em abatedouro. Esses autores atribuíram este achado a possíveis fatores como: dosagem utilizada, condição nutricional dos animais e a diferença entre raças, contrariando, assim, os achados de Gong et al (1993), que relataram o dobro de ovulações ao administrar rbST em vacas superovuladas comparado com animais sem administração da droga.

Cochran et al. (1999) foram os únicos a estudar os efeitos da aplicação de ST eqüino na dinâmica ovariana em éguas. Estes autores utilizaram a dose de 25 µg/kg diariamente entre os dia D6 até D12 do ciclo (Grupo A) e D13 até D19 do ciclo (Grupo B), não observando aumento do número de folículos maiores ou igual a 8 mm, porém, ao analisar os momentos, os autores puderam observar um aumento somente no número de folículos pequenos no sétimo dia de tratamento e nos dias 3 e 7 pós tratamento, não tendo sido observada influência nos folículos médios e grandes. Estes achados são discordantes dos presentes resultados, pois não observamos alteração na dinâmica ovariana, independente do tamanho dos folículos.

A dose empregada no presente estudo poderia ser um fator determinante para a ineficiência do rbST. Contudo, a opção de usar a dose de 250 mg e não a dose de 500mg foi decorrente dos relatos do Buonomo et al. (1996) que ao utilizarem 500 mg de rbST em éguas observaram uma reação inflamatória local muscular intensa e também pelos resultados obtidos por De Kock et al (2001) onde estes autores ao utilizarem 250 mg, observaram efeito sistêmico similar a 500 mg. A reação inflamatória seria indesejável por se tratarem de éguas doadoras de embriões de alto valor financeiro. Não foi observada reação inflamatória nos animais utilizados no presente experimento após aplicação intramuscular de 250 mg de rbST.

Em relação à opção pelo momento do início do tratamento com rbST, ou seja, três dias antes do início do protocolo superovulatório, foi-se baseado em experimentos anteriores realizados em vacas e éguas os quais demonstraram que após três dias de aplicação de ST foram detectados níveis altos de IGF-1 circulante (GONG *et al.*, 1991; BUONOMO *et al.*, 1996; DE KOCK *et al.*, 2001).

Ficou claro através da avaliação dos níveis séricos de insulina que o tratamento com rbST provocou efeito metabólico sistêmico desejado, a despeito de não ter interferido na dinâmica folicular, nem na resposta estimulatória do EPE.

Houve um aumento sérico significativo de insulina já detectado 24 horas após aplicação do rbST ocorrendo um pico em 48 horas, concordando com o aumento de insulina observado por outros autores em éguas quando da aplicação do bST e pST (BUONOMO *et al.*, 1996); e de IGF-1 observado por Cochran *et al.* (1999) ao aplicar eST em éguas e em vacas da mesma forma Gong *et al.*, (1993) ao aplicar ST bovino. Este efeito indicou pronta absorção do rbST logo após sua aplicação, aumentando os níveis de insulina, por decorrência de uma hiperglicemia (mobilização de glicose hepática) provocado pela ST exógena (GOPINATH & ETHEERTON, 1989) no intuito de reverter o quadro de aumento de glicose sanguínea. Este achado vai contra a afirmação de Spinosas *et al.*, (1999), pois estes autores mencionaram que a maioria das espécies de animais domésticos não são responsivas à somatotrofina de outras espécies animais.

Comprovadamente as mudanças nos níveis plasmáticos séricos de IGF-1 são muito similares a mudanças nas concentrações de insulina em vacas (RADCLIFF *et al.*, 2003) e em éguas (BUONOMO *et al.*, 1996).

Molento *et al.* (2005), observaram que há uma interação entre a insulina e o rbST no mesmo padrão que os níveis de IGF-1 circulante, indicando que este possa ser um possível mediador dessa interação. Esta observação vem de encontro aos resultados obtidos, pois a concentração plasmática de insulina aumentou significativamente após 24 horas de aplicação do rbST tendo o pico 48 horas. Após tratamento, o perfil de insulina foi similar ao de IGF-1 circulante observado por Gong *et al.* (1993) frente à administração de rbST em vacas superovuladas e semelhante ao observado por De Kock *et al.* (2001) usando a mesma dose (250 mg de rbST),

onde os níveis de IGF-1 aumentaram dois dias depois da administração se mantendo elevados por mais 6 dias. Este resultado é de suma importância para o presente estudo, pois a idéia seria iniciar o protocolo superovulatório com os níveis altos de IGF-1 circulante e que este se mantivessem altos durante todo o protocolo de superovulação.

Quando analisado o grupo controle foi observado que a égua 7 apresentou maiores variações nos níveis hormonais comparadas com as outras éguas do seu grupo, tendo sido esta diferença estatisticamente significativa somente quando comparado com outras duas éguas (égua 1 e égua 3).

Quando analisadas as éguas do grupo tratado foi observado que a égua 3 aparentemente não respondeu ao tratamento do rbST pelo menos via mensuração de insulina sérica, e a égua 8 apresentou somente um ligeiro aumento de insulina após aplicação do rbST, porém sem diferir estatisticamente dos outros dias de dosagem. Estes dois animais apresentaram: égua 3 – duas ovulações e dois embriões e égua 8 – quatro ovulações e 3 embriões.

Buratini et al. (1999) após aplicar ST em vacas observou aumentos intensos dos níveis circulantes de IGF-1 acompanhados de respostas foliculares modestas, enquanto outras apresentaram aumentos suaves das concentrações plasmáticas de IGF-1 acompanhadas de respostas foliculares mais evidentes, como observado em nosso estudo. Portanto, estas observações sugerem que a intensidade da resposta folicular ovariana aos aumentos dos níveis de insulina e IGF-1 decorrentes do tratamento com bST varia entre indivíduos. Esta variação pode envolver diferenças individuais relativas ao grau de expressão dos receptores para IGF-1 e/ou insulina ou então a atividade plasmática da IGFBP.

Quando foram analisadas as concentrações de insulina plasmática circulante pode-se observar que o rbST aumentou em sete vezes os níveis de insulina iniciais no grupo tratado enquanto no grupo controle os níveis plasmáticos praticamente se mantiveram o mesmo desde a aplicação até o dia dos lavados.

Não houve variação significativa dos níveis de insulina circulante no grupo controle, tendo apresentado o mesmo perfil hormonal de insulina observados em outros trabalhos em vacas (GONG *et al.* 1993) e éguas (BUONOMO *et al.* 1996).

A insulina e IGF-1 tem sido apontada como provável mediadora do rbST sobre o desenvolvimento folicular. A associação entre o aumento dos níveis circulantes de insulina e o aumento de folículos após tratamento com bST sustenta esta hipótese (GONG *et al.*, 1993; GONG *et al.*, 1997). Além disso, assim como o IGF-1, a insulina também estimula *in vitro* a esteroidogênese e a proliferação de células da granulosa bovinas (GONG *et al.*, 1993; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995).

No presente estudo não foi observada relação entre a população folicular existente no início do tratamento e o número de ovulações; ao contrário do relatado por Woods & Ginther (1985). Estes autores sugeriram que o número de folículos com mais de 10 mm, no 15º dia do diestro, pode indicar o número de ovulações; tendo sido observado um número maior de folículos > 10 mm em éguas com cinco ou mais ovulações do que em éguas com uma ou duas ovulações ($6,5 \pm 0,6$ versus $3,6 \pm 0,7$), e uma tendência a ser maior ($p < 0,1$) quando comparado com éguas com três ou quatro ovulações. Da mesma forma Carmo (2003) verificou uma correlação positiva entre a população de folículos com diâmetro de 16 a 20 mm, no início do tratamento, e o número de ovulações. Machado *et al.*, (2003) observou que a população de folículos com diâmetro entre 16-20mm no segundo dia de tratamento com EPE tem boa correlação com o número de ovulações em éguas submetidas ao estímulo ovariano com FSH eqüino ou EPE.

O intervalo entre o início do tratamento e ovulação obtida neste estudo foi de $9,21 \pm 1,2$ e $9,27 \pm 1,3$ dias no grupo controle e tratado, respectivamente, não apresentando diferença ($p > 0,05$) entre os grupos. Estes achados estão de acordo com os encontrados por Machado *et al.* (2003) utilizando o eFSH durante a estação ovulatória (intervalo da primeira ovulação após $9,0 \pm 0,9$ dias do início do tratamento), próximo ao encontrado por Carmo (2003) $9,8 \pm 2,9$ dias e Alvarenga *et al.* (2001) que relataram um período de 8,3 dias entre o início do tratamento à primeira ovulação. Entretanto, Rosas *et al.* (1998) relataram um período mais longo de tratamento (10,2 dias).

Nenhuma ovulação ou luteinização foi observada antes da administração do hCG. Este dado mostra que mesmo com a interrupção das administrações de EPE

os folículos continuaram a crescer e que eles já estavam responsivos ao LH. Esta observação é amparada pelos achados de Fay & Douglas (1987) que relataram estar elevado o número de receptores de LH nas células da teca, quando o folículo possuía 29 mm de diâmetro. Wiepz et al. (1988), trabalhando com éguas em final de transição, relataram que o folículo dominante torna-se responsivo à administração do hCG, ao atingir um diâmetro de 30 a 35 mm. Outros autores (GINTHER, 1992; BERGFELT, 1998), por sua vez, descrevem que o momento mais adequado para a aplicação do hCG deve se basear na identificação das principais características pré-ovulatórias do folículo dominante, como tamanho, alterações de formato e espessura da parede folicular.

Ao aplicar somatotrofina em suínos Echternkamp et al. (1994) observaram um aumento no diâmetro de folículos pequenos e médios nos ovários, discordando dos resultados encontrados já que não foi observada diferença significativa no crescimento médio dos folículos quando comparados os dois grupos. Rosas et al. (1998) descrevem a presença de folículos pré-ovulatórios com o diâmetro médio de 38,1 mm em éguas superovuladas, sendo próximos aos achados bem como Carmo (2003) quando utilizou em as éguas doses decrescentes de EPE (37,2 mm), porém, maiores do que as éguas tratadas em doses constantes (30,9 mm).

Os folículos dominantes do grupo controle e tratado apresentaram taxa de crescimento similar (2,25 mm/dia) ao relatado na literatura em éguas superovuladas durante a estação ovulatória (GINTHER, 1992; MACHADO *et al.*, 2003; CARMO, 2003, PERES, 2004), demonstrando que o ST não tem influência no crescimento dos folículos grandes.

Também não foi observada diferença entre o grupo controle e o grupo tratado quando comparadas o número de ovulações por égua ($2,93 \pm 0,83$ e $2,86 \pm 0,86$, respectivamente). Estas taxas de ovulações são similares aos encontrados por Woods & Ginther (1983), Rosas et al., (1998) e Bézard et al., (1995) os quais obtiveram 2,9; 3,0 e 2,39 ovulações por égua respectivamente, porém estes autores aplicaram EPE uma vez ao dia em doses mais altas (25 mg). Contudo, o número de ovulações foi inferior às encontradas por Carmo (2003) e Carmo (2007) que foi 4,0 e

4,7 ovulações por égua, respectivamente, utilizando o dobro de dose usada no presente experimento (25 mg de EPE duas vezes ao dia). O número de ovulações observado no presente estudo foi próximo ao encontrado de Scoggin et al. (2002); (3,4 ovulações) utilizando a mesma dose e frequência de EPE (12,5 mg duas vezes ao dia).

Peres (2004) utilizando eFSH em éguas transicionais obteve um número médio de ovulações por égua tratada de $5,57 \pm 4,54$ sendo superior ao relatado por Rosas et al. (1998), Machado et al. (2003) e Alvarenga et al. (2003) que utilizaram o eFSH em éguas ciclando e alcançaram taxas de 4,6, 4,2 e 4,0, respectivamente; e também foi superior ao relatado por Niswender et al. (2004), que obtiveram apenas $2,5 \pm 1,7$ ovulações por égua, utilizando protocolo semelhante ao do presente estudo.

Em relação ao número de múltiplas ovulações obtidas neste estudo, observamos que no grupo tratado, 42,9% das éguas apresentaram duplas ovulações e 57,1% apresentaram triplas ovulações (tabela 1) e no grupo controle, 39,3% das éguas apresentaram duplas ovulações e 64,3% apresentaram triplas ovulações, ou seja, a resposta ovariana foi de 100% das éguas para múltiplas ovulações (≥ 2 ovulações) em ambos os grupos experimentais. Estes dados são compatíveis com os encontrados por Woods & Ginther (1977), Douglas (1979), Squires et al., (1987), Scoggin et al., (2002), Carmo (2003) e Carmo (2007), onde 70%, 86%, 92%, 84%, 90% e 92% de éguas apresentaram múltiplas ovulações, respectivamente, após tratamento com EPE.

Neste estudo foram recuperados em média 1,36 embriões por égua no grupo controle e 1,71 embriões no grupo tratado com o rbST. O número de embriões obtidos no grupo tratado com rbST foi similar aos encontrados por Dippert et al. (1992) os quais obtiveram $2,0 \pm 1,8$ embriões por égua, quando utilizaram uma dose mais alta de EPE (40mg) por dia e superiores aos observados por Carmo (2003) e Machado et al., (2003), que relataram 1,2 e 1,0 embriões de média respectivamente por égua quando do tratamento com dose mais elevadas de EPE (25 mg duas vezes ao dia).

No presente estudo não houve diferença estatística significativa em associar o hormônio de crescimento recombinante bovino ao protocolo de superovulação, entretanto, a diferença numérica foi evidente entre os grupos (14% superior no grupo tratado com rbST). A utilização de um maior número de éguas em experimentos futuros talvez possa tornar estatisticamente significativa a melhora numérica observada no número de embriões recuperados quando do uso do rbST. Hofferer et al. (1991) foram os únicos autores a estudar o efeito do uso da somatotrofina suína em éguas superovuladas com EPE. Estes autores concluíram que a adição do hormônio de crescimento suíno não levou a nenhum aumento aparente da efetividade do tratamento com EPE, a dose utilizada de pST neste experimento foi baixa quando comparada às doses utilizadas para outras espécies, conforme conclusão dos autores.

Os resultados do presente experimento são contraditórios aos encontrados em vacas por Neves et al. (2005); Gong et al. (1993); Gong et al. (1997). Estes autores observaram um aumento no número de embriões viáveis ao associar o bST ao tratamento superovulatório (39,37% *versus* 63,11%; 48,2% *versus* 90,0%; 66% *versus* 92%, respectivamente), entretanto Gray et al. (1993) não observaram este aumento (49% *versus* 58%).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa, o grupo tratado com rbST apresentou 21% a mais de lavados com dois ou mais embriões do que o grupo controle (64,3% *versus* 42,9%). Ramos et al. (2007) observaram que ao administrar somatotropina em vacas superovuladas antes de aspirar os folículos, observaram uma melhora no desenvolvimento dos ovócitos de grau 1 (20,67% *versus* 32,37%), havendo também um aumento nas taxas de clivagem (46,11% *versus* 60,47%) e de produção de blastocistos (7,78% *versus* 19,38%).

Neves et al. (2005) observaram que não houve aumento no número de estruturas totais colhidas ao utilizar o bST (doses de 250 e 500 mg) em vacas antes do início do protocolo superovulatório, porém, houve um aumento no número de embriões viáveis, independente da dose utilizada, sem alterar as taxas de gestações das receptoras. Fato este decorrente provavelmente da ação direta ou indireta do

bST no estímulo metabólico de folículos antrais que normalmente entrariam em atresia, como sugerido por Gong et al. (1996).

Uma égua do grupo tratado foi descartada por ter apresentado uma hiperestimulação ovariana com 6 folículos de diâmetro pré-ovulatório, que não culminaram com ovulação. Este fato também foi observado por Machado et al. (2003) e Scoggin et al. (2002), onde em ambos os estudos houve éguas que não responderam ao agente indutor de ovulação.

A dose utilizada no presente experimento (12,5mg duas vezes ao dia) demonstrou ser um excelente protocolo para superestimular éguas, uma vez que tanto no grupo controle quanto no grupo tratado, os índices de recuperação embrionária (51,0% e 66,0%) estão dentro da média de recuperação encontrada em ciclos normais sem superestimulação (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Em ambos os grupos o índice de recuperação embrionária apresentou resultado superior a maioria dos trabalhos com EPE aplicando-se 25 mg duas vezes por dia, devendo este fato estar relacionado a menor dose utilizada (ALVARENGA *et al.*, 2001; SCOGGIN *et al.*, 2002) .

Uma das hipóteses do presente trabalho foi a de que o rbST pudesse potencializar o efeito do EPE quando utilizado nesta dose mais baixa (12,5 mg duas vezes ao dia) no intuito de aumentar o número de ovulações obtidos por Scoggin et al. (2002). Sabidamente o rbST aumenta a resposta ovariana frente as gonadotrofinas, sugerindo que este hormônio aumente ligação de receptores para LH nos folículos e previna atresia folicular (HOMBURG *et al.*, 1990), bem como pode contornar distúrbios ovulatórios (KIRKWOOD *et al.* 1990). Também foi demonstrado em cultura de células da granulosa de ratos que o estímulo do FSH é aumento quando da incubação com IGF-1 (JIA *et al.*, 1986), e que, a adição do hormônio recombinante humano aumentou a resposta ovariana em mulheres superovuladas com gonadotrofina da menopausa humana (HOMBURG *et al.*, 1988).

Gong et al. (1993) observaram um maior número de ovulações (23,2 *versus* 12,5 ovulações) e de embriões recuperados (7,4 *versus* 3,8 embriões) ao associar o rbST ao protocolo superovulatório em vacas, corroborando com a melhora numérica, porém sem diferença estatística observada no presente estudo.

O protocolo usado no experimento (12,5 mg duas vezes ao dia) provocou uma resposta superovulatória ($2,93 \pm 0,83$ e $2,86 \pm 0,86$, ovulações grupo controle e tratado, respectivamente) aquém do reportado quando utilizado a dose de 25 mg duas vezes ao dia (ALVARENGA et al., 2001; CARMO, 2003; SCOGGIN et al., 2003), contudo o número de embriões recuperados ($1,36 \pm 0,63$ e $1,71 \pm 0,61$ embriões grupo controle e tratado, respectivamente) foram próximos aos encontrados utilizando o protocolo de 25mg duas vezes ao dia. Isto é explicável, pois as taxas de recuperação por ovulação (51% grupo controle e 66% grupo tratado) foram superiores às encontradas por Alvarenga et al. (2001) de 49%; Machado et al. (2003) de 26%; Carmo (2003) de 30%; Peres (2004) de 44%, indicando que este protocolo por utilizar uma dose mais baixa de EPE deve ter proporcionado uma melhora na maturação oocitária. Conforme citado anteriormente Carmo (2007) observou alterações estruturais na maturação citoplasmática e nuclear de ovócitos oriundos de éguas superovuladas com altas doses de EPE.

CONCLUSÕES

- 1- A aplicação da somatotrofina recombinante bovina em éguas submetidas à superovulação não teve efeito na dinâmica folicular;
- 2- O uso da somatotrofina recombinante bovina não melhorou a resposta superovulatória nem a recuperação de embriões em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina;
- 3- O protocolo de superovulação com a dose 12,5 mg duas vezes ao dia independente da associação ou não com rbST, foi eficiente em induzir resposta superovulatória com boa taxa de recuperação de embriões;
- 4- A somatotrofina recombinante bovina foi biologicamente ativa em éguas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A somatotrofina recombinante bovina provou ser biologicamente ativo em eqüinos. A partir desse achado, o rbST pode ser usado como uma ferramenta para modelo experimental no intuito de avaliar outras aplicações em eqüinos, como:

- Repetir o mesmo experimento com um maior número de éguas.
- Definir se existe um melhor momento do ciclo para a aplicação da rbST em éguas no intuito de recrutar um maior número de folículos.
- Utilizar a rbST em éguas idosas (melhorar ovulação e qualidade dos ovócitos)
- Associar a rbST a protocolos com doses mais altas de EPE (melhorar a maturação oocitária e aumentar o número de embriões produzidos).

REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y. et al. 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.

ADASHI, E. Y. et al. Somatomedin-C as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: enhance accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology*, v.118, p.149-155, 1986.

ALLEN, W.R., et al. Induction of ovulation in anoestrous mares with a slow-release implant of a GnRH analogue (ICI 118 630). *J. Reprod. Fertil.*, v.35 (suppl), p.469-78, 1987.

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

ALVARENGA, M.A. et al. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH eqüino purificado. *Acta Scientiae Vet.*, v.31, p.216-217, 2003.

ALVARENGA, M.A. et al. Improvement of ovarian superstimulatory and response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. *Theriogenology*, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; et al. Improvement of ovarian superstimulation in mares treated with EPE twice daily. *Arq.Fac.Vet. UFRGS*, suppl 27, p.197, 1999.

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

AMIT, T. et al. Growth hormone –binding protein (GH-BP) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles: Correlation with serum GH-BP levels. *J. Clin. Endocr. Metabol.*, v.77, p.33-39, 1993.

ARMSTRONG, D.G. et al. Insulin-like growth factor binding protein- 2 and –4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*, v.139, n.4, p.2146-2154, 1998.

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

BERGFELT, D.R.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduce 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. *Bio. Reprod.*, v.1, p.261-71, 1995.

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

BOLS, P.E.J. et al. Effect of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in OPU-IVF program. *Theriogenology*, v.49, p.983-995, 1998.

BREIER, B.H.; SAUERWEIN, H. Regulation of growth in ruminants by the somatotropic axis. In: International Symposium on Ruminant Physiology, 8., 1995. Willinger, Ger. *Proceedings...*, Willinger, Ger. p.451-474, 1995.

BRUCK, I., LEN-JENSEN, H. Multiple conception after spontaneous multiple ovulation in a mare. In: International Symposium on Equine Transfer and Other Advanced Technique, 4, 1997, Reims. *Proceedings...* Reims, 1997.

BUONOMO, F.C.; et al. The effects of bovine somatotropin (bST) and porcine somatotropin (pST) on growth factor and metabolic variables in horses. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.886-894, 1996.

BURATINI Jr., J.; et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54, p.421-431, 2000.

BURATINI Jr., J. et al. Os efeitos do bST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. *Arq. Fac. Veterinária UFRGS*, v.27, p.147-170, 1999.

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

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

CARMO, M.T. *Estudo da maturação oocitária de éguas superovuladas com extrato de pituitária equina*. 2007. 215p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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. et al. Superovulatory response of mares treated twice daily with equine pituitary extract utilizing constant and decreasing doses- preliminary results. In: Annual Conference & Symposium of Society for Theriogenology, 2002, Colorado Springs. *Proceedings...* Colorado Springs, 2002.

CARMO, M.T. et al. 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.

CARNEIRO, G.F. et al. Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vitro maturation of equine oocytes during follicular growth. *Theriogenology*, v.58, p.685-688, 2000.

CARTER, J.A. et al. The effect of rbST on follicle populations of nelore heifers during the dry season in Brazil. *Theriogenology*, v.49, p.342-352, 1998.

COCHRAN, A. A. et al. The effects of equine somatotropin (eST) on follicular development and circulating plasma hormone profiles in cyclic mares treated during different stages of the estrus cycle. *Domest. Anim. Endocr.*, v.16, p.57-67, 1999.

COHICK, W.S. Ovarian expression of IGF-I, IGF binding proteins, and growth hormone receptor in heifers actively immunized against GH-releasing factor. *Endocrinology*, v.137, p. 1670-1677, 1996.

CHRISTENSEN, R.A. et al. Pulsatile release of somatotropin related to meal feeding and somatotropin response to secretagogues in horses. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.2770-2777, 1997.

CRYSTAL, J.K. et al. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy Science*, v.80, p.273-285, 1997.

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

DAUGHADAY, E.; ROTWEIN, P. Insulin like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrin. Review*, v.10, p.68-91, 1989.

DAVIDSON, T.R., et al. Effect of follicle size on in vitro production of steroids and insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF II, and the IGF-binding proteins by equine ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.*, v.66, p. 1640-1648, 2002.

DAVIS, S.R.; SMITH, J.F.; GLUCKMAN, P.D. Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod. Fertl. Dev.*, v.2, p.173-178, 1990.

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

DE KOCK, A. et al. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: effect on insulin-like growth factor-I and select IGF binding proteins. *J. Endocrin.*, v.171, p.163-171, 2001.

De LA SOTA, R.L. et al. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatostatin) on ovarian function in lactating and non-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.1002-1013, 1993.

DE LUCIA, ROBERTO; OLIVEIRA-FILHO; RICARDO MARTINS. *Farmacologia Integrada*. 2 ed. Revinter, 2004. p. 569-572.

DIPPERT, K.J. et al. Fertilization rate in superovulated and spontaneously ovulating mares. *Theriogenology*, v.41, p.1411-23, 1994.

DIPPERT, K.J. et al. 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.

DRIANCOURT, M.A. & DISENHAUS, C. Lack of effects of growth hormone administration on ovarian function of lactating goats. *Anim. Reprod. Sci*, v.46, p.123-132, 1997.

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.

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

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

DOUGLAS, R.H. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally anovulatory mares with equine pituitary fraction. *Theriogenology*, v.2, p.133-142, 1974.

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

FITZGERALD, B.P., et al. Investigation of the potencial of LHRH or na agonist to induce ovulation in seasonally anoestrous mares with observations on the use of the agonist in problem acyclic mares. *J. Reprod. Fertil.*, suppl.35, p.683-4, 1987.

FOLCH, J. et al. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, v.55, p.1777-1785, 2001.

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

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

FURLAN, L.R. *Efeito do hormônio de crescimento bovino recombinante (rbst) sobre o desempenho e expressão gênica do IGF-I, do hormônio de crescimento e seu receptor em bovinos de corte*. 1998. 86f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

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

GASTAL, E.L. et al. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1320-1327, 1997.

GERÁRD, N.; et al. Relationships between follicular fluid composition and follicular/oocyte quality in the mare. *Theriogenology*, v.60, p.243-253, 1999.

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

GINTHER, O.J. et al. 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. et al. 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. et al. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. *Biol. Reprod.*, v.67, p.862-867, 2002.

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

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

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

GONG, J.G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.A. ET AL. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotropin: a dose-response study. *J. Reprod. Fertil.*, v.110, p. 91-97, 1997.

GONG, J.G.; et al. Pretreatment with recombinant somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, v.45, p.611-622, 1996.

GONG, J.G.; et al. The effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnancy mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod.*, v.48, p.1141-1149, 1993.

GONG, J.G.; et al. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol. Reprod.*, v.45, p.941-949, 1991.

GOPINATH, M.; ETHERTON, T.D. Effects of porcine growth hormone on glucose metabolism in pigs: II. Glucose tolerance, peripheral tissue insulin sensitivity and glucose kinetics. *J. Anim. Sci.*, v.67, p.689-697, 1989.

GRAY, B., et al. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, v.39, p. 227,1993.

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

HANSEN, A.P.; WEEKE, J. Fasting serum growth hormone levels and growth hormone responses to exercise during normal menstrual cycles and cycles of oral contraceptives. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.34, p.199-205, 1974.

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

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

HERRLER, et al. Effect of rBST on follicular IGF-I contests and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*, v.41, p.601-611, 1994.

HOFFERER, S. et al. 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.

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.

HOMBERG, R. et al. Co-treatment with human growth hormone and gonadotropins for induction of ovulation: controlled clinical trial. *Fertil. Steril.*, v.53, p.254-260, 1990.

HOMBERG, R. et al. Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotropins. *Clin. Endocrinol.*, v.29, p. 113-117, 1988.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocrinol.*, v.168, p. 1-23, 2001.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev. Reprod.*, v.5, p.175-182, 2000.

HYLAND, J.H., et al. Infusion of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) induces ovulation and fertile oestrus in mares during seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fertil.*, suppl.35, p.211-20, 1987.

HYTTEL, P.; et al. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, v. 35, p.91-108, 1991.

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

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* V.45, p.372-377, 1996.

IZADYAR, F.; HAGE, W.G.; COLENBRANDER, B. et al. The promontory effect of growth hormone on development competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmatic maturation. *Mol. Reprod. Develop.*, v.49, p.444-453, 1998.

JIA, K. C.; et al. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induce differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 118, p. 1401-1409, 1986.

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

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

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

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Science*, v.48, p.137-157, 1997.

KIM, J.H. et al. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semidefined medium. *Theriogenology*, v.39, p.875-886, 1993.

KIRBY, C.J. et al. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy Science*, v.80, p.273-285, 1997.

KIRKWOOD, R.N. et al. Effect of exogenous growth hormone during the follicular phase on hCG binding by porcine luteal tissue. *Can. J. Anim. Sci.*, v.70, p.719-721, 1990.

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. Introduction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine extract. *J. Anim. Sci.*, v.44, p.834-842, 1977.

LIBERMANN J.; et al. Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 1003-1011.

LINDSELL, C.E.; et al. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of estrus cycle. *Theriogenology*, v.26, p.209-219, 1986.

LIU, I.K.M. et al. Clinical observations of oviductal masses in the mare. *Proc. Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract.*, p.41-45, 1991.

LOOS, F.A.M., et al. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology*, v.35, p.537-46, 1991.

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.

LUCY, M.C. Expectativas de índices reprodutivos em vacas leiteiras tratadas com somatotropina bovina. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 6., 2002, Uberlândia: [s.n.], 2002. p.15-24.

LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 1635-1647, 2000.

LUCY, M.C. et al. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J. Dairy Sci.*, v. 76, p. 1014-1027, 1993.

MACHADO, M.S. et al. 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. 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.

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. et al. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. *Theriogenology*, v.38, p.823-831, 1992.

MCKINNON, A.O. et al. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin α -subunit. *Eq. Vet. J.*, v.24, n.2, p.144-146, 1992.

MACPHERSON, M.L., et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. *Biol. Reprod.*, v. 67, p. 648-654, 2002.

MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in cow: practical considerations. *Embryo Transfer Newsl.*, v.11, p.15-24, 1993.

MEIRA, C.; BURATINI, JR. Follicular dynamics and superovulation in mares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, v.26, n.1, p.125-140, 1998.

MOLENTO, C.F.M. et al. Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin (rbST) and their interaction on DMI and milk fat production in dairy cows. *Livestock Product. Sci.*, v.97, p.173-182, 2005.

MONNIAUX, D. et al. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, v.47, p.3-12, 1997.

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

MOREIRA, F. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, v.57, p.1371-87, 2002.

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

NAMBO, Y. et al. 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.

NEVES, E.F.; RAMOS, A.F.; MARQUES JUNIOR, A.P. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v.57, n.2; p.205-209, 2005.

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

NISWENDER, K.D. et al. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *J. Equine Vet. Sci.*, v.23, n.11, 2003.

ORLANDI, C. et al. Resposta ovariana durante a superovulação precedida pela emergencia da onda follicular induzida por aspiração dos folículos em éguas cíclicas. *Anais da XX reunião anual da SBTE*, supl.34; p. 278, 2006.

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

OVENSEN, P. et al. Impaired growth hormone secretion and increased growth hormone-binding protein levels in subfertile males. *Fertil. Steril.*, v.65, p.165-169, 1996

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

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

PAVLOK, A., et al. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.41, p.183-192, 1996.

PEEL, C.J. et al. Somatotropin and lactation. *J. Dairy Sci.*, v.70, p. 474-486, 1987.

PERES, K.R. Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante equino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera. 2004. 134p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PÉREZ, F. P. Avances en transplantes de embriones y su repercusión en la producción de alimentos para el hombre. *Anales de La Academia Nacional de Madri*, v.113, p.115-149, 1996.

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

PRICE, C.A., et al. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. *J. Reprod. Fertil.*, v.81, p.161-8, 1987.

RADCLIFF, R.P. et al. Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Science*, v. 86, p.3920-3926, 2003.

RAJARAM, S., BAYLINK, D.J.; SUBBURAMAN, M. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.*, v.18, p.801-831, 1997.

RAMOS, A.A., et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir. *Rev. Bras. Zoot.*, v.36; n.2; p.380-386, 2007.

REMY, B., et al. Ovulation rates in donor mares treated with purified equine FSH. *Theriogenology*, v.47, n.1, p.394, 1997.

RIEGER, D. et al. Effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, v.35, p.863-868, 1991.

ROSAS, C.A. et al. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Theriogenology*, v.49, p.1257-1264, 1998.

ROTH, Z. et al. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. *J. Dairy Science*, v.85, p.1398-1405, 2002.

SCHEMM, S.R. et al. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol. Reprod.* v.42, p. 815-821, 1990.

SCHIEWE, M.C., et al. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F_{2α} synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology*, v.34, p.469-86, 1990.

SCOGGIN, C.F. et al. Use of a twice-daily step-down dosage of equine pituitary extract for induction of multiple ovulations in mares. *Theriogenology*, v.57, p. 771, 2002.

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

SIROIS, J., et al. FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares. *Theriogenology*, v.37, n.1, p.300, 1992.

SOOGSASEN, N. et al. Effect of treatment with rBST on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo. *Theriogenology*, v.62, p.377-384, 1999.

SPICER, L.J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol. Reprod.*, v.70, p.1223-1230, 2004.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MACIEL, S.M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)- induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.22, p.237-254, 2002.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.12, p.223-245, 1995.

SPICER, L.J., et al. Effects of insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and insulin-like factor production in vitro. *J. Anim. Sci.*, v.71, p.1232-1241, 1993.

SPICER, L.J.; ENRIGHT, W.J. Concentrations of IGF-I and esters in follicular fluid of preovulatory bovine follicles: effect of daily injections of a growth hormone

releasing factor analog and /or thyrotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.1133-9, 1991.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. 2 ed. Guanabara Koogan, 1999. p. 312-314.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.Jr. Superovulation and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin*, n.8, Fort Collins, Colorado, p.32-38, 1995.

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

SQUIRES E.L. et al. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.35, p.399-403, 1987.

SQUIRES, E.L. et al. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology*, v.26, n.5, p.661-670, 1986.

STEWART, C.E.H.; ROTWEIN, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiologic functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.*, v.76, p.1005-1026, 1996.

STEWART, R., TUFFNELL, P.P. Cloning the cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Endocrinol.*, v.6, p.189, 1991.

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

THOMPSON, D.L. et al. Growth hormone in mares and stallions: pulsatile secretion, response to growth hormone releasing hormone and effects on exercise, sexual stimulation and pharmacological agents. *J. Anim. Sci.*, v.70, p.1201-1207, 1992.

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

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

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

WEBB, R., et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J. Reprod. Fertil.*, suppl.54, p.33-48, 1999.

WEBB, R.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in the control of follicle development in cattle. *Theriogenology*, v.41, p.25-30, 1994.

WEBER, M.M. et al. Characterization of human insulin-like growth factor-binding proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and western ligand blot analysis. *The J. Clin. Endocrin. & Metab.*, v.84, n.5, p.1679-1684, 2007.

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

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

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

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

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* v.24, p.305-323, 1998.

ANEXOS

ANEXO A -Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva, teste supravital e teste hiposmótico dos três garanhões utilizados no experimento1

	MOTILIDADE TOTAL	MOTILIDADE PROGRESSIVA	TESTE SUPRA-VITAL	TESTE HIPOSMÓTICO
GARANHÃO 1	82%	46%	68%	63%
GARANHÃO 2	80%	41%	61%	58%
GARANHÃO 3	76%	32%	59%	56%

ANEXO B: Número de ovulações e percentual de recuperação embrionária de cada égua do grupo controle (EPE) e do grupo tratado (EPE + rbST).

GRUPO CONTROLE EPE			GRUPO TRATADO EPE + rbST		
Égua	Nº de ovulações	Nº de embriões recuperados	Égua	Nº de ovulações	Nº de embriões recuperados
E1	3	2	E1	4	2
E2	3	2	E2	2	1
E 3	4	2	E 3	2	2
E 4	2	0	E 4	3	2
E 6	4	2	E 6	3	1
E 7	4	1	E 7	2	2
E 8	2	1	E 8	4	3
E 9	2	1	E 9	3	2
E 10	2	1	E 10	2	2
E 11	4	1	E 11	4	1
E 12	3	2	E 12	4	2
E 13	3	1	E 13	2	1
E 14	2	2	E 14	2	1
E 15	3	1	E 15	3	2
Total	41	19	Total	40	24

OBS.: O animal 5 no Grupo Tratado não ovulou de nenhum dos seis folículos e por isso foi retirado do experimento

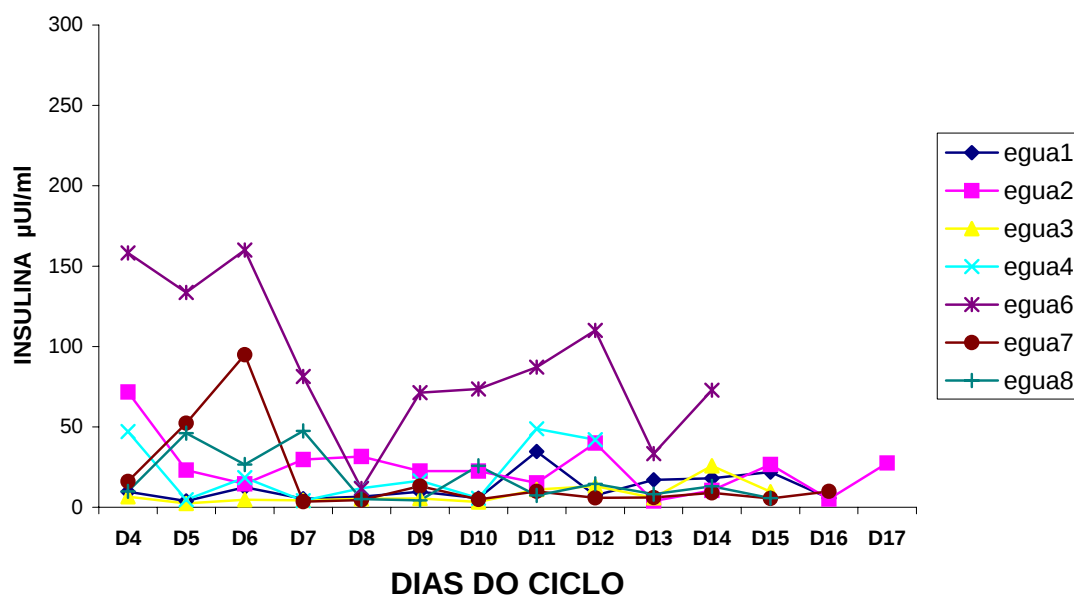
ANEXO C: Número de folículos de acordo com diâmetro (mm) no D4 e D7 (início do tratamento com E.P.E.) nos grupos controle (EPE) e tratamento (EPE+rbST).

	CONTROLE EPE		TRATAMENTO rbST + EPE	
	D4	D7	D4	D7
5-10 mm	16	13	24	17
11-15 mm	14	12	8	12
16-20 mm	0	7	2	6
21-25 mm	0	0	0	0
N. Total de fols.	30	32	34	35

Obs.: D4 dia de aplicação do rbST (grupo tratado); D7 dia de início do protocolo de superovulação com EPE em ambos os grupos

ANEXO D – Níveis plasmáticos de insulina individuais das éguas do grupo controle (EPE) do D4 até a última ovulação.

GRUPO CONTROLE



ANEXO E – Níveis plasmáticos de insulina individuais das éguas do grupo tratado (EPE + rbST) do D4 até a última ovulação.

