

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES INDUTORES
DA OVULAÇÃO E ASSOCIAÇÕES SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS UTERINAS, OVARIANAS E
CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LH EM ÉGUAS**

GABRIEL MAKSOUD GRECO

Botucatu – SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES INDUTORES
DA OVULAÇÃO E ASSOCIAÇÕES SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS UTERINAS, OVARIANAS E
CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LH EM ÉGUAS**

GABRIEL MAKSOUD GRECO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor em Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. Marco Antônio Alvarenga

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Greco, Gabriel Maksoud.

Eficiência de diferentes agentes indutores da ovulação e associações sobre as características uterinas, ovarianas e concentrações plasmáticas de LH em éguas / Gabriel Maksoud Greco. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Égua - Reprodução. 2. Gonadotropina coriônica. 3. Ovulação - Indução. 4. Ciclo estral. 5. Hormônio liberador de gonadotropina.

Palavras-chave: Acetato de deslorelina; Égua; LH; Ovulação; hCG.

Nome do autor: Gabriel Maksoud Greco

Título: EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES INDUTORES DA OVULAÇÃO E ASSOCIAÇÕES SOBRE AS CARACTERÍSTICAS UTERINAS, OVARIANAS E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LH EM ÉGUAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu / SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu / SP

Prof. Dr. José Antônio Dell'aqua Júnior
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu / SP

Prof. Dr. André Maciel Crespílho
Membro
Departamento de Bromatologia e Reprodução Animal
Curso de Medicina Veterinária – Universidade de Santo Amaro – UNISA – São Paulo / SP

Prof. Dr. Gustavo Mendes Gomes
Membro
Curso de Medicina Veterinária – Universidade Severino Sombra – USS – Vassouras / RJ

Data da Defesa: 31 de Maio de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por todo apoio, em especial aos meus pais, Ana Maria Maksoud Greco e Leonardo Greco, verdadeiros exemplos de seres humanos. Espelho-me em vocês todos os dias, a cada escolha. Sem vocês nada disto seria possível.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, pela confiança, paciência, orientação e amizade. Aos Professores José Antônio Dell'aqua Júnior e Frederico Ozanam Papa, pelas valiosas colocações realizadas durante meu exame de qualificação, que me nortearam para a finalização deste estudo.

Ao Dr. André Maciel Crespilho, pela significativa ajuda durante a reta final de meu experimento.

Ao Prof. Guilherme de Paula Nogueira, pelo auxílio com as análises hormonais. Aos proprietários de cavalos que gentilmente cederam seus animais para meu experimento.

A todos os membros do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Botucatu, que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste Doutorado, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem (%) de éguas que ovularam após 48 horas do tratamento (Momento 48), de acordo com o grupo experimental.....	34
Tabela 2 – Taxa de incremento (%) nas concentrações circulantes de LH (mediana, percentis 25 e 75) nos Momentos 24 (M24) e 48 (M48) em relação ao Momento 0 (M0), de acordo com o grupo experimental.....	36
Tabela 3 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) nos diferentes momentos, sendo: GC (grupo controle), G1 (DES 1,0 mg), G2 (DES 0,5 mg), G3 (hCG 2.000 UI), G4 (hCG 750 UI), G5 (DES 1,0 mg e hCG 2.000 UI), G6 (DES 0,5 mg e hCG 750 UI) e G7 (ECP 10,0 mg).....	37
Tabela 4 (Primeira Tabela do segundo artigo) – Média e desvio padrão do grau de edema endometrial visualizado ultrassonograficamente nos diferentes momentos, de acordo com o grupo experimental.....	59
Tabela 5 (Segunda Tabela do segundo artigo) – Média e desvio padrão do diâmetro folicular observado ultrassonograficamente nos diferentes momentos, de acordo com o grupo experimental.....	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Taxa de ovulação (%) nos diferentes momentos, de acordo com o grupo experimental..... 35
- Figura 2 – Amplitude de incremento (“fold change”) das concentrações circulantes de LH no Momento 48 (M48) em relação ao Momento 0 (M0), de acordo com o grupo experimental..... 38
- Figura 3 – Média das concentrações circulantes de LH (ng/mL) das éguas do grupo G7 (ECP 10,0 mg) que não ovularam e daquelas em que a ovulação foi detectada nos Momentos 24 (M24), 48 (M48), 72 (M72) e 96 (M96).....39

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
Capítulo 1	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Ciclo estral equino	7
2.2 GnRH e gonadotrofinas	8
2.3 Recrutamento, seleção folicular e ovulação	9
2.4 Papel do LH no desenvolvimento folicular e na manutenção do CL	11
2.5 Influência do estrógeno sobre as concentrações plasmáticas de LH	13
2.6 Características ultrassonográficas que indicam proximidade ovulatória	14
2.7 Principais agentes indutores de ovulação	16
2.7.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	17
2.7.2 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos	20
2.7.3 Associação entre o hCG e o acetato de deslorelina	23
Capítulo 2	25
1. OBJETIVOS	26
1.1 Objetivo geral	26
1.2 Objetivos específicos	26
Capítulo 3	27
ARTIGO 1 - Efeito da aplicação de ECP, hCG e/ou acetato de deslorelina nas concentrações plasmáticas de LH em éguas.	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODO	31
Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultrassonográficos	31

Grupos e coletas de sangue	32
Análise estatística	33
RESULTADOS	34
Taxa de ovulação no Momento 48	34
Concentrações plasmáticas de LH	35
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ARTIGO 2 – Efeito de diferentes protocolos de indução de ovulação sobre o edema endometrial e o diâmetro folicular e sua correlação com a fertilidade pós-tratamento com o hCG.	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODO	55
Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultrassonográficos	55
Grupos experimentais	56
Inseminações artificiais e diagnóstico de gestação	57
Análise estatística	57
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
Capítulo 4	68
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXO 1 – NORMAS EDITORIAIS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO JEVS (JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE)	101

GRECO, G.M. **Eficiência de diferentes agentes indutores da ovulação e associações sobre as características uterinas, ovarianas e concentrações plasmáticas de LH em éguas.** Botucatu, 2016. 100 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A manipulação farmacológica do ciclo estral é rotineiramente utilizada na égua, pelo fato desta apresentar grande variação na duração do estro e no intervalo entre o seu início e a ovulação. Como maiores taxas de concepção decorrem da deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino próximo à ovulação, diversos agentes foram empregados objetivando sua indução e sincronização, em especial a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o acetato de deslorelina. O mecanismo de ação destes fármacos envolve o hormônio luteinizante (LH), sendo que o hCG mimetiza suas ações e o acetato de deslorelina estimula sua liberação pela adenohipófise. Incremento semelhante às concentrações circulantes de LH tem sido observado em vacas com o uso de cipionato de estradiol (ECP), o qual é usualmente empregado na indução e sincronização de ovulações na espécie pelo seu baixo custo. A fim de auxiliar na escolha do protocolo ideal para a indução de ovulação em éguas, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do tratamento com o hCG e/ou com o acetato de deslorelina, nas doses preconizadas ou em subdoses, sobre as concentrações plasmáticas de LH, a indução e a sincronização de ovulação, o grau de edema endometrial, o diâmetro folicular e a sua taxa de desenvolvimento. Ainda, buscou-se verificar o resultado da aplicação de ECP sobre a indução e sincronização da ovulação e as concentrações plasmáticas de LH, bem como a existência de uma correlação entre a taxa de crescimento, o diâmetro folicular e o edema endometrial sobre a fertilidade pós-indução com a dose preconizada de hCG. Os resultados obtidos através do presente trabalho nos permitiram concluir que: a) os protocolos propostos com o hCG e/ou o DES induziram e sincronizaram a ovulação de forma eficaz, estimulando sua ocorrência de folículos pré-ovulatórios menores; b) o DES estimulou maior liberação de LH que o hCG após 24 horas; c) a adição do hCG ao tratamento com DES não promoveu um incremento nas concentrações circulantes de LH, seja nas doses preconizadas ou em subdoses; d) o tratamento com ECP não resultou em aumento nas concentrações circulantes de LH, tendo inibido sua liberação em alguns animais, pré-dispondo ao surgimento de folículos anovulatórios e atresia folicular; e) o uso de subdoses de hCG e/ou DES levaram a um maior incremento nas concentrações circulantes de LH após 48 horas, por um provável mecanismo de “down-regulation” que ocorre após o uso das doses recomendadas destes hormônios; f) os tratamentos com o hCG e/ou o DES não impediram o desenvolvimento folicular ou reduziram o diâmetro folicular após 24 horas; g) a indução de ovulação levou a uma redução no grau de edema endometrial após 24 horas; o qual persistiu à ovulação; h) o grau máximo de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade pós-indução com 2.000 UI de hCG; i) o tamanho e a taxa de desenvolvimento folicular pós-indução com 2.000 UI de hCG tenderam a uma correlação positiva com a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial.

Palavras-chave: égua, ovulação, LH, hCG, acetato de deslorelina e ECP.

GRECO, G.M. **Efficiency of different ovulation inducing agents and combinations on uterine and ovarian characteristics and plasmatic LH concentrations in mares.** Botucatu, 2016. 100 p. Thesis (PhD). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University.

ABSTRACT

Pharmacological manipulation of the equine estrous cycle is routinely applied, due to the fact that mares show great disparity on estrous duration and in the interval between its onset and ovulation. Since higher pregnancy rates are obtained when semen is deposited in the female reproductive tract at a time close to ovulation, several ovulation inducing agents have been used, specially human chorionic gonadotropin (hCG) and deslorelin acetate (DES). The mechanism of action of these drugs involves the luteinizing hormone (LH), for hCG mimics its actions and DES stimulates endogenous adenohipophyseal secretion. Similar increment in circulating LH concentrations has been observed in cows treated with estradiol cypionate (ECP), which is usually administrated as an interesting and cheaper alternative to induce and synchronize ovulations in the bovine species. In order to aid recognition of the ideal ovulation induction and synchronization protocol in the mare, the present study evaluated the effect of treatment with hCG and/or DES, using the recommended or a subdose, on ovulation induction and synchronization, plasmatic LH concentrations, grade of endometrial edema, follicular growth and diameter. Thus, this experiment intended to verify the effect of ECP administration on ovulation induction, synchronization and plasmatic LH concentrations, as well as the existence of a correlation between follicular growth, pre-ovulatory diameter and endometrial edema with fertility of mares induced using the recommended hCG dose. The obtained results led to the following conclusions: a) protocols using hCG and/or DES successfully induced and synchronized ovulations, stimulating smaller pre-ovulatory follicles to ovulate; b) DES stimulated a higher LH secretion than hCG 24 hours post-injection; c) combining hCG to DES treatment did not favor LH secretion; d) estradiol cypionate treatment did not induce ovulation or favor plasmatic LH concentrations, but, instead, lead to a substantial anovulation and follicular atresia rate, possibly due to its decrease in some animals; e) subdoses of hCG and DES stimulated a higher LH increase after 48 hours, possibly due to a down-regulation mechanism upon administration of the recommended dose; f) treatment with hCG and/or DES did not impair follicular development after 24 hours; g) ovulation induction decreased endometrial edema after 24 hours, which persisted at ovulation; h) fertility of mares treated with 2,000 IU of hCG was not influenced by the maximum endometrial edema score observed during estrous or the grade of edema the day an ovulation was detected; i) follicle size and growth rate post-induction with 2,000 IU of hCG tend to bear a positive correlation with fertility.

Key-words: mare, ovulation, LH, hCG, deslorelin acetate and ECP.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O Agronegócio desempenha importante papel na economia brasileira, ao representar 23% de nosso produto interno bruto (PIB) (CEPEA, 2014). Conforme levantamento recente do IBGE (2014), o rebanho equino nacional é composto por, aproximadamente, cinco milhões e meio de animais. As biotecnologias reprodutivas, por sua vez, apresentam importância crescente e significativa, de forma que o número de embriões equinos transferidos no Brasil em 2013, de 19.680, foi 17,1% maior do que os 16.800 embriões do ano anterior (PERRY, 2013).

Devido à singular fisiologia reprodutiva desta espécie, com grande variação na duração do estro e no intervalo entre o seu início e a ovulação (GINTHER et al., 1972), é rotineira a manipulação farmacológica de seu ciclo estral. Como maiores taxas de concepção são obtidas com a deposição do sêmen no trato reprodutivo da égua próximo à ovulação (WOODS et al., 1990), existem relatos do emprego de agentes indutores de ovulação há aproximadamente cinco décadas (LOY e HUGHES, 1966). O uso destes fármacos permite que a grande maioria das éguas ovule de forma sincronizada, dentro de um período pré-determinado, reduzindo o número de avaliações reprodutivas e a mão-de-obra despendida. A indução de ovulação é amplamente utilizada quando o sêmen a ser empregado é limitado, provém de um garanhão muito requisitado, está criopreservado (refrigerado ou congelado) e/ou for utilizado nas éguas com endometrite persistente pós-cobertura, nas quais se almeja somente uma inseminação por cio (McCUE, 2003).

Os agentes indutores de ovulação estão inseridos nas biotecnologias envolvendo a espécie equina. Na transferência de embriões (TE), podem ser utilizados para sincronizar doadoras com receptoras (McKINNON et al., 1988) e as ovulações em protocolos de superovulação (ALVARENGA et al., 2001; NISWENDER et al., 2003) e de criopreservação embrionária (CARNEVALE et al., 2004). Apresentam como potencial benefício secundário o estímulo à produção de progesterona lútea nas receptoras (FLEURY, 2004; SOUSA et al., 2007; KINO et al., 2014) e à ocorrência de múltiplas ovulações nas doadoras (PERKINS e GRIMMET, 2001; AZEVEDO, 2012; NAGAO et al., 2012). Não obstante, Silva et

al. (2006) verificaram que, nas éguas induzidas com a gonadotrofina coriônica humana (hCG), alterações no diâmetro folicular servem de parâmetro para se estimar a probabilidade com que uma égua se tornará gestante, suscitando a importância de novos experimentos analisando esta correlação.

Os principais agentes indutores de ovulação possuem mecanismos de ação em torno do hormônio luteinizante (LH). Enquanto o hCG mimetiza suas ações, os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), como o acetato de deslorelina, estimulam sua liberação pela pituitária. Ginther et al. (2009a) demonstraram que a aplicação de hCG também incita a ocorrência de um pico endógeno de LH, por um susposto “feedback” negativo do estrógeno, cujas concentrações declinam pós-tratamento. São necessários estudos comparando a liberação de LH endógeno resultante da aplicação de análogos de GnRH com àquela indiretamente promovida pelo hCG.

O uso associado destes hormônios é preconizado em éguas (CARNEVALE et al., 2005) e mulheres (DECLEER et al., 2014) submetidas à doação de oócitos, por favorecerem sua maturação. Este sinergismo pode ser explicado pela presença de diferentes isoformas de receptores para LH nestas espécies, com distintas afinidades pelas moléculas de hCG e de LH endógeno (MÜLLER et al., 2003; SAINT-DIZIER et al., 2004). Recentemente, Santos (2013) explanou uma possível vantagem do emprego desta associação, com o aumento no perfil protéico do líquido folicular das éguas tratadas. Apesar das potenciais vantagens obtidas através do emprego conjunto destes fármacos, ainda se desconhece como o seu uso combinado influencia as concentrações plasmáticas de LH na égua.

Apesar de taxas de sincronização e ovulação semelhantes terem sido observadas nas éguas tratadas com diferentes doses de hCG e do acetato de deslorelina (DAVIES MOREL e NEWCOMBE, 2008; GRECO et al., 2012), há evidências na literatura da existência de uma efeito dose-dependente: em mulheres, com o hCG (DU et al., 2006; MA et al., 2015) e em éguas, com o acetato de deslorelina e o LH equino, contido no extrato de pituitária (FLEURY et al., 2004; MELO et al., 2012). São necessários estudos comparando o perfil endócrino de LH após o tratamento com diferentes doses de hCG e do acetato de deslorelina em éguas.

A ineficácia de componentes à base de estrógeno para a indução e sincronização de ovulação na espécie equina (FLEURY et al., 2004; GRECO, 2012) pode ser atribuída ao “feedback” negativo deste hormônio sobre o LH, conforme proposto por Ginther et al. (2009a). Isto se contrapõe aos resultados obtidos em vacas com o benzoato (BARROS et al., 2000; SALES et al., 2012; EDWARDS et al., 2015) e o cipionato de estradiol (ECP) (AMBROSE et al., 2005; SALES et al., 2012). Ainda não foi esclarecido o efeito da aplicação de componentes à base de estrógeno sobre as concentrações circulantes de LH em éguas apresentando um folículo pré-ovulatório no estro.

A fim de auxiliar na escolha do protocolo ideal para a indução de ovulação em éguas, o presente experimento objetivou avaliar o efeito do tratamento com o hCG e/ou com o acetato de deslorelina, nas doses preconizadas ou em subdoses, sobre as concentrações plasmáticas de LH, a indução e a sincronização de ovulação, o grau de edema endometrial, o diâmetro folicular e a sua taxa de desenvolvimento. Ainda, buscou verificar o resultado da aplicação de ECP sobre a indução e sincronização da ovulação e as concentrações plasmáticas de LH, bem como a existência de uma correlação entre a taxa de crescimento, o diâmetro folicular e o edema endometrial sobre a fertilidade pós-indução com o hCG.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral equino

As éguas são animais poliéstricos sazonais. Sua atividade reprodutiva, regulada pelo fotoperíodo, é mais intensa nos meses com maior luminosidade, durante o final da primavera e o verão (GINTHER, 1992; GUILLAUME, 1996). Já no inverno, a maioria das éguas encontrar-se-á no anestro, com mínima atividade ovariana. Às fases intermediárias, entre o anestro e a ciclicidade regular, dá-se o nome de transição. Na fase de transição, seja ela de primavera ou de outono, a égua apresenta períodos variáveis de comportamento de estro, sem efetivamente desenvolver estruturas foliculares significativas ou ovular. A ciclicidade regular se inicia a partir da primeira ovulação da estação de monta (LEY, 2006).

O ciclo estral equino pode ser dividido em duas fases: o estro e o diestro (HUGHES et al., 1972; AURICH, 2011). Durante o estro (cio), há predomínio do estrogênio. Este hormônio é secretado pelas células da granulosa folicular (CLAYTON et al., 1981) e estimula a receptividade da égua ao garanhão, a qual aceita a monta (CROWELL-DAVIS, 2007). O estro possui duração extremamente variável: compreende em média sete dias, podendo durar de dois a 14 dias, terminando com a ovulação (McCUE, 2003). Na ovulação, o oócito maduro é liberado do folículo e captado pela tuba uterina, onde poderá ser fertilizado. Após o fim do estro, sinais de intensidade decrescente de receptividade sexual podem ainda ser demonstrados pela égua passadas 12 a 84 horas da ovulação (McCUE, 2003).

A fase seguinte é denominada de fase luteal ou diestro. Possui a duração média de 15 dias e se caracteriza pela presença de um corpo lúteo (CL), originário de uma ovulação (BACK et al., 1974). Ainda que haja folículos ovarianos em desenvolvimento secretando estrogênio, a progesterona produzida pelas células lúteas predomina nesta fase, imprimindo suas características sobre o trato reprodutivo feminino e no comportamento da égua de rejeição ao garanhão (SAMPER, 2008). Em média, a duração do estro, diestro e do ciclo estral equino é de, respectivamente, sete, 15 e 22 dias (GINTHER, 1992).

Para que transcorra a gestação, é necessário que o conceito migre pelo útero equino, realizando o reconhecimento materno-fetal e o bloqueio da luteólise

(ALLEN, 2005). Na ausência de um embrião viável, o endométrio equino produz prostaglandina-F2 alfa (α), a qual é carregada até o ovário mediante a circulação sistêmica. Este hormônio estimula a regressão do CL, a queda nas concentrações plasmáticas de progesterona e o retorno ao cio (GINTHER e FIRST, 1971; NEWCOMBE, 1996). A prostaglandina-F2 α e seus análogos são os hormônios mais utilizados na reprodução equina, sendo administrados com o intuito de reduzir a duração do diestro e induzir o cio em éguas cíclicas (FARIA e GRADELLA, 2010).

2.2 GnRH e gonadotrofinas

O controle exercido pelo cérebro sobre o sistema reprodutivo começou a ser elucidado no início da década de setenta, com a descoberta do GnRH (MATSUO et al., 1971). Este decapeptídeo é produzido no hipotálamo, sendo armazenado pelos seus neurônios em grânulos axonais e secretado de forma pulsátil. O GnRH chega à adenohipófise através do sistema porta-hipofisário, onde se liga a receptores na membrana dos gonadotrófos e estimula a síntese e a secreção das duas gonadotrofinas: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o LH (BLISS et al., 2010).

A produção e a liberação de uma gonadotrofina em detrimento da outra depende da frequência e da amplitude dos pulsos de GnRH, onde os mais frequentes e de maior amplitude favorecem a secreção de LH, enquanto que os mais esparsos e tônicos, a de FSH (HAISENLEDER et al., 1991). Na égua, se o estímulo do GnRH levar à liberação de dois a quatro pulsos gonadotróficos por dia, há predomínio do FSH. Por outro lado, se os pulsos de GnRH forem suficientemente frequentes e de alta amplitude, estes estimularão pulsos gonadotróficos de LH, em intervalos menores ou iguais a duas horas (ALEXANDER e IRVINE, 1987). Observa-se no sangue pituitário, em média, de um a dois pulsos de LH por hora durante o estro (ALEXANDER e IRVINE, 1987; IRVINE e ALEXANDER, 1994), o que faz com que estes não sejam individualmente identificados no sangue jugular, mesmo que o intervalo entre as coletas seriadas seja de apenas cinco minutos (FITZGERALD et al., 1985). Por esta razão, uma venopunção jugular diária é considerada adequada para determinar as concentrações plasmáticas de LH (IRVINE et al., 1998).

O LH eqüino é uma glicoproteína heterodimérica, com 210 aminoácidos (McKINNON et al., 2011) e peso molecular de 30.000 dáltons (BOUSFIELD et al., 1987). Apresenta duas subunidades em sua composição: α e beta (β) (HALASZ et al., 1989), ligadas entre si por pontes dissulfídicas (McKINNON et al., 2011). É a subunidade β que confere ao LH sua especificidade e atividade biológica, já que a α é comum a ambas as gonadotrofinas (BLISS et al., 2010). A longa meia-vida do LH equino, de três a cinco horas, se deve à quantidade de ácido siálico presente neste hormônio (IRVINE, 1979), a qual é cinco vezes maior do que a encontrada no LH humano (JAMES e MARTINI, 1974).

2.3 Recrutamento, seleção folicular e ovulação

Para que um folículo antral inicial continue crescendo, deve ocorrer elevação nas concentrações plasmáticas de FSH (FORTUNE, 1994). Esta gonadotrofina de origem pituitária estimula o recrutamento e o crescimento sincronizado dos folículos ovarianos, originando ondas foliculares que caracterizam a fase final de seu desenvolvimento. Flutuações nas concentrações plasmáticas de FSH são acompanhadas da emergência destas ondas (ADAMS et al., 1992; BERGFELT e GINTHER, 1992). Não obstante, o FSH exerce importante papel na esteroidogênese folicular, ao incitar a expressão de aromatases nas células da granulosa, capazes de converter os andrógenos de origem tecal a estradiol (BLISS et al., 2010).

Os elevados níveis de FSH determinam um incremento intrafolicular na proteína-A plasmática associada à prenhez (PAPP-A). Esta metaloproteinase aumenta a biodisponibilidade local do fator semelhante à insulina (IGF) no microambiente folicular, especialmente naquele que irá se tornar dominante (GINTHER et al., 2004), ao clivar as proteínas ligantes de IGF (IGFBP) (SPICER et al., 2001). O IGF-1 livre estimula o crescimento da granulosa folicular e a sua produção de estrógeno, em sinergismo com o FSH (HANDLER e AURICH, 2005). Em éguas, o pico de FSH ocorre quando o maior folículo da onda possui, em média, 13 milímetros (mm) de diâmetro (GINTHER et al., 2005a).

A secreção de estradiol e de inibina pelos folículos em emergência exerce papel fundamental na seleção do folículo dominante. Por meio de “feedback” negativo, há redução nos níveis plasmáticos de FSH, que se tornam insuficientes

para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (BERGFELT e GINTHER, 1986; TURZILLO e FORTUNE, 1990; DONADEU e GINTHER, 2001). O futuro folículo dominante é aquele cujo estágio de desenvolvimento está melhor sincronizado com o estímulo gonadotrófico durante o recrutamento. Este folículo é, também, o principal produtor de estrógeno (FORTUNE et al., 2001), sendo refratário aos níveis decrescentes de FSH (FORTUNE, 1994), já que apresenta maior expressão de receptores para este hormônio (WEBB et al., 1999). O LH, por sua vez, participa de forma essencial da fase final do desenvolvimento e da seleção folicular, o que é confirmado pela grande presença de seus receptores na granulosa de folículos dominantes antes da divergência (BODENSTEINER et al., 1996; GINTHER et al., 1996). A divergência folicular é caracterizada pelo momento em que os dois maiores folículos da onda cessam seu crescimento sincronizado. Isto ocorre quando o maior folículo, com 22,5 mm de diâmetro, continua se desenvolvendo, a despeito do segundo maior folículo da onda iniciar sua regressão (GINTHER et al., 2005a).

Em éguas, o pico de estrógeno se sucede aproximadamente 24 horas antes da ocorrência de uma ovulação (SQUIRES et al., 2014). Na maioria das espécies domésticas, os níveis elevados de estradiol observados durante o estro estimulam, através de “feedback” positivo, a secreção pré-ovulatória de GnRH e o pico de LH (CRISTIAN et al., 2008). Esta gonadotrofina é necessária para ativar uma cascata de eventos que se propagam no interior do folículo pré-ovulatório, culminando com a ovulação de um oócito maduro (PANIGONE et al., 2008). O LH determina uma redução no diâmetro dos vasos da teca, ativando enzimas responsáveis pelo seu adelgaçamento na região do estigma do folículo dominante (KÖNIG e PROBST, 2005). Na espécie equina, a curva de LH é prolongada, recebendo a denominação de “plateau”. Inicia-se no começo do estro, seis a sete dias antes da ovulação, alcançando o pico um a dois dias após a mesma (WHITMORE et al., 1973). Devido ao “feedback” da progesterona lútea no hipotálamo, a liberação do GnRH é suprimida, fazendo com que as concentrações plasmáticas de LH estejam baixas passados seis a 15 dias da ovulação (GINTHER, 1992).

As éguas são animais mono-ovulatórios; contudo, múltiplas ovulações podem ocorrer. Estas são relativamente comuns em algumas raças nacionais, como o Brasileiro de Hipismo (CARMO et al., 2004) e o Campolina (GRECO et

al., 2005), havendo predomínio das duplas ovulações. Pelo fato do útero equino não comportar mais de um conceito simultaneamente, estas são desejáveis apenas quando a égua em questão é uma doadora de embriões (GINTHER e GRIFFIN, 1994).

2.4 Papel do LH no desenvolvimento folicular e na manutenção do CL

A manutenção do “plateau” de LH é necessária para estimular o desenvolvimento e a maturação folicular, oocitária e a ovulação (HANDLER e AURICH, 2005). A importância desta gonadotrofina no desenvolvimento dos folículos foi demonstrada em éguas acíclicas, nas quais suas concentrações circulantes são mínimas até a ocorrência da primeira ovulação da estação de monta (DONADEU e GINTHER, 2002; GURGEL et al., 2008). Não obstante, observou-se que esse folículo possui menor capacidade esteroidogênica, pelo fato de seu desenvolvimento ter ocorrido sob concentrações plasmáticas de LH inferiores às verificadas nos ciclos estrais regulares subsequentes (DONADEU e GINTHER, 2004). Folículos que se desenvolvem sob estímulo insuficiente de FSH (CHECURA et al., 2010) e de LH (SCHAUER et al., 2013) apresentam baixas concentrações intrafoliculares de IGF-1, o que está associado a falhas ovulatórias (WATSON et al., 2004).

O desenvolvimento de um folículo anovulatório impacta negativamente a eficiência reprodutiva, uma vez que o ciclo estral no qual este surge é perdido; salvo os casos de uma nova onda folicular. Seu aparecimento pode ser decorrente de um processo de atresia folicular, que se caracteriza por uma regressão progressiva do folículo em seu diâmetro, decorrente da apoptose das células da granulosa (HUGHES e GOROSPE, 1991; RAJAKOSKI, 1996; YU et al., 2004). Os folículos em atresia apresentam menores concentrações de IGF-1 no fluido folicular, citocina esta capaz de regular a homeostase celular e inibir a apoptose (YIN et al., 1998). No entanto, na maioria das falhas ovulatórias, há crescimento folicular acompanhado de hemorragia excessiva no interior do seu antro, com o desenvolvimento de estruturas denominadas de folículos hemorrágicos anovulatórios (GINTHER et al., 2007b).

Durante o desenvolvimento folicular, tanto concentrações inferiores (ACOSTA et al., 2004) quanto superiores (GINTHER et al., 2008b; SCHAUER et

al., 2013) de LH influenciam no seu aparecimento. As concentrações de FSH, por outro lado, permanecem inalteradas (DONADEU e GINTHER, 2002; 2003; 2004). Em vacas, níveis elevados e contínuos de LH têm sido associados a falhas de ovulação, culminando com o desenvolvimento de cistos foliculares (HAMILTON et al., 1995), especialmente quando isto ocorre antes do estabelecimento da dominância folicular (VANHOLDER et al., 2006).

Os folículos anovulatórios possuem maior incidência durante o outono: de 23% contra 5 a 8% na primavera (WEEDMAN et al., 1993; GASTAL et al., 1998). Estes folículos apresentam concentrações intrafoliculares inferiores de IGF (ACOSTA et al., 2004; WATSON et al., 2004), estradiol e inibina (WATSON et al., 2002; ACOSTA et al., 2004). São descritos como fatores pré-disponentes ao seu surgimento o uso de anti-inflamatórios esteróides (FERRIS e McCUE, 2010), não esteróides (CUERVO ARANGO e DOMINGO-ORTIZ, 2011; LIMA et al., 2015) e indutores de ovulação no estro, bem como prostaglandinas no diestro do ciclo estral anterior (CUERVO ARANGO e NEWCOMBE, 2009). Ginther et al. (2007b) e Cuervo-Arango e Newcombe (2008) demonstraram que estes folículos, frente à ultrassonografia convencional, apresentam as mesmas alterações na parede folicular e no padrão de edema endometrial até três dias antes da ovulação ou da luteinização. Conforme Acosta et al. (2004), a ultrassonografia com Doppler é uma importante ferramenta na distinção de folículos fadados a se tornarem anovulatórios, já que estes apresentam comprometimento vascular durante o seu desenvolvimento.

A função luteotrófica do LH foi determinada há quase cinco décadas, sendo crucial para a manutenção do corpo lúteo e sua produção de progesterona (DONALDSON e HANSEL, 1965; ARMSTRONG e BLACK, 1966). Poucos anos depois, esta correlação foi evidenciada pela regressão lútea em animais tratados com anticorpos contra esta gonadotrofina (HOFFMANN et al., 1974). As elevadas concentrações de LH fazem com que as células da granulosa folicular iniciem sua luteinização pré-ovulatória e se diferenciem, após a ovulação, em células lúteas produtoras de progesterona (CONCANNON et al., 1977; MARKOVIC et al., 2003). Conforme demonstrado em éguas receptoras ovariectomizadas (HINRICHS et al., 1985) ou em anestro (GRECO et al., 2015), a progesterona é o único hormônio necessário à manutenção da gestação na espécie equina. Falhas na produção de

progesterona pelo corpo lúteo foram associadas à ocorrência de morte embrionária precoce (GINTHER et al., 1985; CANISSO et al., 2013).

2.5 Influência do estrógeno sobre as concentrações plasmáticas de LH

Na maioria das espécies domésticas, o pico de LH observado durante o estro é decorrente de um “feedback” positivo exercido pelo estradiol ovariano (SAUMANDE e HUMBLLOT, 2005; CRISTIAN et al., 2008). Por esta razão, para induzir e sincronizar a ovulação na espécie bovina, são rotineiramente utilizados ésteres de estradiol (HANLON et al., 1997), como o cipionato (AMBROSE et al., 2005; SALES et al., 2012) e o benzoato (BARROS et al., 2000; SALES et al., 2012; EDWARDS et al., 2015). Na vaca, o cipionato e o benzoato de estradiol estimulam e antecipam a ocorrência de picos de LH, os quais são identificados, respectivamente, por volta de 50 (COLAZO et al., 2003; SALES et al., 2012) e 20 horas (MARTINEZ et al., 2007; SALES et al., 2012) após sua administração.

Em éguas, inicialmente, alguns estudos envolvendo a aplicação de estrógeno corroboraram com essa afirmativa, já que o tratamento diário com estradiol resultou na elevação das concentrações circulantes de LH, seja em animais ovariectomizados (GARCIA e GINTHER, 1978; THOMPSON et al., 1991) ou não (BURNS e DOUGLAS, 1981). Thompson et al. (1991) verificaram que a aplicação de estradiol aumentou as reservas de LH na adenohipófise, bem como sua liberação frente a estímulo com GnRH. Em acordo com estes resultados, Sharp et al. (2001) detectaram que, nas éguas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, houve aumento na expressão do ácido ribonucléico (RNA) mensageiro que transcreve as subunidades de LH na pituitária.

Por outro lado, quando da aplicação de uma única injeção de 1,0 miligrama de estradiol, Miller et al. (1981) verificaram a existência de um efeito inibitório transitório, já que a queda nas concentrações plasmáticas de LH observada nas primeiras três horas seguiu-se de aumento entre oito e 12 horas. Esta capacidade do estrógeno de exercer tanto efeito positivo quanto negativo sobre a síntese de LH já foi demonstrada em vacas (MARTINEZ et al., 2007), ratas (LINDZEY et al. 2006) e mulheres (SHAW et al., 2010). Apesar de estudos anteriores terem concluído que o “plateau” de LH na égua se deve ao “feedback” positivo do estradiol, experimentos mais recentes afirmam ocorrer exatamente o contrário no

período de ciclicidade regular, pois as concentrações de LH no “plateau” sofrem maior incremento exatamente quando a quantidade de estrógeno circulante começa a declinar (GINTHER et al., 2005b; 2006). Outros trabalhos suportam esta teoria, já que a aplicação de estrógeno levou a reduções nas concentrações circulantes de LH em éguas durante o desvio folicular (DONADEU e GINTHER, 2002) e estro (GINTHER et al., 2007a). Éguas com múltiplos folículos dominantes, cujas concentrações plasmáticas de estradiol durante o estro são consideravelmente maiores (GINTHER et al., 2008a; MACHADO et al., 2008; RAZ et al., 2009), apresentaram níveis circulantes inferiores de LH antes (MACHADO et al., 2008) e imediatamente após a ovulação (GINTHER et al., 2008a). Conforme Ginther et al. (2007a), o efeito positivo do estrógeno sobre o LH verificado nos primeiros estudos se deve ao emprego de doses suprafisiológicas de estrógeno, que elevaram as concentrações deste hormônio a níveis quatro vezes maiores do que os normais.

2.6 Características ultrassonográficas que indicam proximidade ovulatória

O diâmetro do folículo dominante é um dos principais parâmetros utilizados na determinação do momento em que uma égua irá ovular (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008). Através da ultrassonografia, este é aferido considerando-se a média da máxima área transversal da altura e da largura folicular, de uma simples imagem recuperada em seu monitor. As éguas tendem a repetir o diâmetro folicular com o qual ovulam. Conforme Cuervo-Arango e Newcombe (2008), o diâmetro do folículo pré-ovulatório equino tende a ser semelhante durante dois ciclos estrais espontâneos e consecutivos.

A maioria das éguas ovula horas antes do término dos sinais de estro, quando o folículo dominante mede em torno de, no mínimo, 40 mm de diâmetro (PYCOCK, 2003). Algumas podem ovular com folículos de apenas 35 mm, enquanto que outras só irão fazê-lo com estruturas maiores ou iguais a 50 mm (SAMPER, 1997), fato este particularmente comum às raças de tração (PYCOCK, 2003). De acordo com Pierson e Ginther (1985), a partir do momento em que um folículo de 30 mm é identificado no ovário de uma determinada égua, esta pode ovular momentos ou até sete dias depois.

O diâmetro pré-ovulatório sofre influência de alguns fatores, externos ou inerentes à própria onda folicular. Éguas com mais do que um folículo dominante, por exemplo, ovulam com menores diâmetros, por apresentarem concentrações circulantes inferiores de FSH (McKINNON et al., 2011). Por outro lado, devido à menor intensidade de estímulo luminoso no início da estação de monta, tanto a duração do estro quanto o diâmetro folicular à ovulação são maiores (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

Conforme o folículo se aproxima da ovulação, este sofre reduções na sua taxa de crescimento. Ginther et al. (2009b) verificaram um aumento diário médio de $4,1 \pm 0,2$ mm entre cinco e dois dias antes da ovulação, o qual diminuiu para $2,0 \pm 0,4$ mm nos dois dias que a precederam. De acordo com Koskinen et al. (1989), o folículo pré-ovulatório cresce 3,0 mm por dia até dois dias antes da ovulação, permanecendo constante ou diminuindo 2,0 a 3,0 mm nas últimas 12 horas.

O estímulo do estrógeno determina mudanças histológicas e ultrassonográficas no trato reprodutivo da égua. O útero, sob ação deste hormônio, sofre incremento em sua perfusão (ESTELLER-VICO et al., 2016), com surgimento de edema na lâmina própria e proliferação das glândulas endometriais, cujo epitélio se torna colunar (HAMER et al., 1985). À ultrassonografia, observa-se o aparecimento do edema endometrial, o qual faz com que o útero adote uma aparência típica, descrita como “roda de carro” (SAMPER, 2010). Entretanto, este edema somente é identificado quando as concentrações plasmáticas de progesterona estão baixas (SAMPER, 2008).

A avaliação do edema endometrial é rotineiramente conduzida a fim de auxiliar na determinação do momento ideal para se inseminar uma égua (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008), pois sua intensidade diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (HAYES et al., 1985). Esta queda parece ocorrer por estímulo estrogênico à expressão de receptores endometriais de progesterona (PELEHACH et al., 2000), os quais se ligam à progesterona pré-ovulatória decorrente da luteinização precoce (BELIN et al., 2000). Todavia, a diminuição progressiva do edema endometrial não é observada em todas as éguas, já que algumas podem ovular ainda que o apresentando, enquanto que em outras este não é visualizado durante o período pré-ovulatório (SAMPER, 1997). A persistência de excessivo edema uterino, durante ou após a ovulação,

tem sido associada à endometrite sub-clínica (LEBLANC e CAUSEY, 2009). Contudo, Squires et al. (2014) não verificaram influência negativa da presença de edema endometrial demasiado à ovulação sobre a fertilidade. De acordo com Cuervo-Arango e Newcombe (2008), as éguas tendem a demonstrar padrões similares de edema endometrial durante dois ciclos estrais espontâneos e consecutivos.

Outros parâmetros têm sido utilizados a fim de prever o momento ovulatório na espécie equina. Dentre eles, destacam-se a forma (PIERSON e GINTHER, 1985) e a flutuação folicular (HUGHES et al., 1972), a ecogenicidade (KERBAN et al., 1999), espessura (PIERSON e GINTHER, 1985) e presença de edema na parede folicular (GASTAL et al., 1998; GASTAL et al., 2006), bem como a existência de partículas ecogênicas no antro (GASTAL et al., 1998; PYCOCK, 2003).

2.7 Principais agentes indutores de ovulação

A indução de ovulação é a segunda intervenção mais comum realizada no manejo reprodutivo (SAMPER, 2008). De acordo com o estudo realizado por Sauberli (2013), as éguas cuja ovulação foi induzida apresentaram uma probabilidade aproximadamente duas vezes maior de se tornarem gestantes. Para fins de cobertura ou inseminação artificial, as éguas antes da indução devem apresentar, preferencialmente, um folículo dominante maior ou igual ($\geq$) a 30-35 mm e edema endometrial (McCUE et al., 2002; McCUE et al., 2004; CARNEVALE et al., 2005; McCUE et al., 2014).

Alguns hormônios já foram utilizados para induzir e sincronizar ovulações na espécie equina, dentre os quais se destacam o hCG (LOY e HUGHES, 1966; SULLIVAN et al., 1973; VOSS et al., 1975; McCUE et al., 2004), o GnRH (DUCHAMP et al., 1987; BECKER e JOHNSON, 1992) e o seu análogo acetato de deslorelina (McCUE et al., 2002; MELO et al., 2012), bem como o LH recombinante equino (JABLONKA-SHARIFF et al., 2007; YOON et al., 2007) e o extrato de pituitária equina (DUCHAMP et al., 1987; MELO et al., 2012). Apesar de já terem sido administrados como indutores de ovulação, tanto os análogos de prostaglandina (ARBEITER e ARBEITER, 1985), quanto o cipionato de estradiol (SEGISMUNDO et al., 2003) não produziram resultados consistentes em estudos

subsequentes (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008; SAMPER, 2008; GRECO et al., 2012), razão pela qual seu uso não é recomendado.

Com o intuito de antecipar o início da estação de monta, ao induzir e acelerar a primeira ovulação de éguas acíclicas na fase de transição, tanto o GnRH (JOHNSON, 1987; GINTHER e BERGFELT, 1990; HARRISON et al., 1990), como o acetato de deslorelina (McKINNON et al., 1997; RAZ et al., 2009) e o hCG (CARNEVALE et al., 1989; CUERVO-ARANGO e CLARK, 2010) já foram empregados de forma satisfatória.

2.7.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)

O hCG é o hormônio mais utilizado para induzir ovulações e reduzir a duração do estro equino. Esta gonadotrofina é produzida pela placenta humana, tendo como principais funções estimular a função lútea e a manutenção da gestação na mulher (McCUE et al, 2004). Trata-se de uma molécula dotada de inúmeras peculiaridades. Devido ao seu alto peso molecular, de 46.000 daltons, possui a maior meia-vida dentre todas outras na espécie humana, de 36 horas, sendo a proteína mais ácida e glicosilada do organismo (COLE, 2012).

Da mesma maneira que as demais gonadotrofinas, o hCG é composto por duas subunidades, α e β , sendo a primeira idêntica à do LH humano (COLE, 2012) e a segunda 51% homóloga à subunidade β da gonadotrofina coriônica equina (SUGINO et al., 1987). Pelo fato da subunidade β da gonadotrofina coriônica equina e do LH equino possuírem a mesma sequência de aminoácidos, supõe-se que o LH equino e o hCG são 50% similares em sua subunidade β , responsável pela bioatividade da molécula (GALET et al., 2000).

O hCG se liga aos receptores foliculares de LH, mimetizando suas ações envolvendo a maturação oocitária, folicular e a ovulação (WILSON et al., 1990). Na égua, possui meia vida de oito a 12 horas (VOSS, 1993), sendo eficaz na indução de ovulação mesmo na presença de baixas concentrações de LH endógeno, seja durante o diestro (HEDBERG et al., 2006) ou pelo uso de um antagonista de GnRH (BRIANT et al., 2004). Evans et al. (2006) e Ginther et al. (2009a) demonstraram que a aplicação de hCG no estro também estimula a ocorrência de um pico endógeno de LH entre 24 e 72 horas pós-tratamento, por

uma suposta queda nas concentrações circulantes de estrógeno. Boakari (2014) verificaram aumento semelhante, após 18 e 30 horas.

A administração de 750 a 5.000 unidades internacionais (UI) de hCG pela via intramuscular (I.M.), subcutânea (S.C.) ou intravenosa (I.V.) resulta em ovulação em aproximadamente 80% das éguas dentro de 24 a 48 horas (LOY e HUGHES, 1966; VOSS et al., 1975; BARBACINI et al., 2000; SAMPER et al., 2002; McCUE et al., 2004; BEAL, 2008; DAVIES MOREL e NEWCOMBE, 2008; GRECO et al., 2012; McCUE et al., 2014). Utilizando a dose de 2.500 UI (I.V.), Gastal et al. (2006) e Boakari (2014) obtiveram períodos ovulatórios médios similares, de 36,0 e 37,7 horas, respectivamente. De acordo com McCue et al. (2004), as éguas que ovulam até 24 horas após a administração de hCG não responderam ao tratamento, tendo ovulado espontaneamente em virtude de um pico endógeno de LH. Apesar da aparente flexibilidade existente em relação à dose empregada com o objetivo de sincronizar e induzir ovulações, não há estudos abordando o possível efeito dose-dependente sobre os níveis de LH liberados frente ao tratamento com esta gonadotrofina.

O uso repetido do hCG implica em reduções na sua eficácia, pela formação de anticorpos anti-hCG (SULLIVAN et al., 1973; WILSON et al., 1990). Duchamp et al. (1987) verificaram que as éguas imunizadas contra esta gonadotrofina não ovulavam entre 24 e 48 horas após sua administração. Mais recentemente, Siddiqui et al. (2009) observaram que éguas apresentando anticorpos anti-hCG não sofrem aumento nas concentrações plasmáticas de LH e no fluxo sangüíneo da parede folicular, ou redução nas concentrações plasmáticas e intrafoliculares de estradiol após a aplicação de 2.500 UI (I.V.) de hCG. Por estas razões, recomenda-se utilizar o hCG por apenas dois ciclos estrais em cada estação de monta (McCUE et al., 2004), devendo-se substituí-lo por outros indutores em ciclos subsequentes. Conforme Davies Morel e Newcombe (2008), além de baratear o custo, doses inferiores podem ser especialmente desejadas por, possivelmente, formarem quantidades menores de anticorpos.

O hCG tem sido rotineiramente utilizado nos protocolos de inseminação com sêmen congelado. Após sua administração, recomenda-se avaliar a égua a cada seis a oito horas, realizando-se a inseminação à detecção de uma ovulação (SAMPER e HANKINS, 2001). Squires et al. (2003) propuseram um protocolo alternativo para reduzir o número de avaliações nas éguas inseminadas com

sêmen congelado, sem diminuir sua fertilidade: duas inseminações fixas, 24 e 40 horas após a administração de hCG, para que haja quantidade suficiente de espermatozóides no trato reprodutivo feminino a fim de suprir as ovulações que ocorrerem entre 18 e 52 horas da indução.

Além de acelerar o término do estro, estimulando a ovulação de folículos pré-ovulatórios menores (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008), o hCG parece afetar a taxa de desenvolvimento folicular. Gastal et al. (2006) afirmam que o tratamento com 2.500 UI desta gonadotrofina (I.V.) faz com que os folículos ≥ 35 mm parem de crescer, permanecendo com diâmetro constante até a ovulação. Situação semelhante foi observada por Uliani (2012), com o emprego de 1.500 UI de hCG (I.V.) em éguas de diferentes idades. Já Silva et al. (2006) obtiveram resultados contrastantes, ao verificarem que nem todos os folículos pré-ovulatórios das éguas medicadas com 2.500 UI de hCG cessaram seu desenvolvimento, já que nas que se tornaram gestantes após inseminação artificial houve aumento maior do que 1,0 mm. Segundo estes autores, alterações no diâmetro folicular frente à indução podem servir, futuramente, como um parâmetro para se estimar a probabilidade com que uma égua virá a ficar prenhe.

O estímulo luteotrófico do hCG já foi demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Células lúteas equinas em cultura celular responderam com maior produção de progesterona ao serem estimuladas com o hCG, em comparação ao LH equino (KELLY et al., 1988). Neste mesmo estudo, a aplicação de 1.000 UI de hCG (I.M.) no terceiro, quarto e quinto dia pós-ovulação (D3, D4 e D5) levou a um aumento na produção de progesterona, do sétimo ao décimo quarto dia do diestro. Araújo et al. (2005) detectaram que o uso do hCG como indutor de ovulação levou a um aumento nas concentrações de progesterona no dia de sua ocorrência (D0). Resultados semelhantes foram obtidos por Michel et al. (1986) em 81,5% das éguas medicadas. Não obstante, Sousa et al. (2007) identificaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona no D4 das éguas tratadas com hCG, bem como um maior número de receptoras com elevado tônus uterino, cervical e ausência de edema endometrial, consideradas como aptas à transferência de embriões. Conforme Carnevale et al. (2000), os tônus uterino e cervical são os principais fatores a serem avaliados na seleção de receptoras.

Contudo, estes achados não foram repetidos Alonso (2013), o qual observou aumento na vascularização lútea em somente parte das éguas tratadas com hCG.

Urquieta et al. (2009) também não verificaram concentrações plasmáticas superiores de progesterona nos animais tratados no D1, D2, D3, D4 e D8. Da mesma forma, diferenças nas concentrações deste hormônio no D0 não foram encontradas por Bertoldi et al. (2015), em éguas induzidas com esta gonadotrofina. Recentemente, Köhne et al. (2014) associaram a indução de ovulação com o hCG com um aumento nas concentrações circulantes de progestágenos de éguas gestantes.

Os experimentos realizados em outras espécies nos conferem duas possíveis explicações para esta discrepância de resultados. A primeira está relacionada à dose de hCG utilizada, já que estudos em humanos demonstraram efeito dose-dependente do hCG sobre a maturação oocitária (DU et al., 2006), as concentrações intrafoliculares de progesterona, a vascularização ovariana e a incidência de células apoptóticas do cumulus e da granulosa folicular (MA et al., 2015). A segunda diz respeito à propriedade e aos animais estudados. O hCG aplicado no momento da inseminação artificial reduziu as taxas de mortalidade embrionária em vacas de leite submetidas ao estresse térmico (DE RENSIS et al., 2008). Em ovelhas, Gomez-Brunet et al. (2007) observaram um efeito positivo da sua administração em propriedades com baixo índice de prenhez. Desta forma, é possível que o efeito da indução com hCG sobre as concentrações plasmáticas de progesterona seja observado somente em animais sob condições de estresse, cujo corpo lúteo estará insuficiente na ausência deste tratamento.

A indução de ovulação com o hCG aumenta a incidência de múltiplas ovulações (PERKINS e GRIMMET, 2001; VERONESI et al., 2003), as quais são desejáveis apenas quando a égua em questão é uma doadora de embriões, uma vez que o útero equino não comporta gestações gemelares (GINTHER e GRIFFIN, 1994).

2.7.2 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos

O GnRH natural (gonadorrelina) e os seus análogos induzem e sincronizam a ovulação, ao estimularem a liberação de LH endógeno (GARCIA e GINTHER, 1975; BARRIER-BATUT et al., 2001). Devido a sua curta meia-vida e potência, o uso da gonadorrelina não se traduziu em resultados interessantes na espécie

equina, sendo necessárias aplicações repetidas de GnRH por dois a três dias, duas a três vezes ao dia, para induzir e sincronizar a ovulação (SAMPER, 2008).

Aproximadamente 2000 análogos de GnRH já foram sintetizados, com potência e eficácia variáveis (KARTEN e RIVIER, 1986). Ao estudarem a aplicação de deslorelina em ratas, Coy e Schally (1978) detectaram liberações até 17 vezes maiores de LH em comparação à gonadorrelina. Esse análogo é aproximadamente 100 vezes mais potente que o GnRH (PADULA, 2005), servindo como alternativa naquelas éguas que não respondem ao hCG, fato este comum após repetidas aplicações dentro de uma estação de monta ou em éguas velhas (BARBACINI et al., 2000).

Alguns trabalhos envolvendo o uso de deslorelina sob forma de implante foram realizados no exterior (MUMFORD et al., 1995; McCUE et al., 2002; SAMPER et al., 2002). Os implantes possuem os inconvenientes da aplicação e da necessidade de sua posterior remoção à ovulação. Caso o implante não seja retirado 48 horas após a sua colocação, algumas éguas podem apresentar intervalos interovulatórios exacerbados, com atraso no retorno ao cio (McCUE et al., 2002; HENDERSON et al., 2012), devido a reduções na sensibilidade ou no número de receptores para GnRH dos gonadotrófos pituitários (JOHNSON et al., 2002), fenômeno este denominado de “down-regulation”. Em cadelas, o estímulo constante com análogos de GnRH tem sido empregado a fim de suprimir, de forma reversível, sua atividade reprodutiva (TRIGG et al., 2001).

Utilizando 1,0 miligrama (mg) do acetato de deslorelina (I.M.), Melo et al. (2012) detectaram ovulações de folículos ≥ 35 mm em 79,3% das éguas entre 24 e 48 horas da sua aplicação, sendo o período ovulatório médio observado, de 38,9 horas, similar aos demais encontrados na literatura de 40,8 (FLEURY et al., 2004), 41,4 (FERRIS et al., 2011) e 40,1 horas (BOAKARI, 2014). Apesar de suas ovulações ocorrerem aproximadamente quatro horas após as de éguas tratadas com o hCG (McCUE et al., 2014), o acetato de deslorelina demonstrou-se igualmente eficaz na indução e sincronização de ovulação, reduzindo a duração do estro e estimulando a ovulação de folículos pré-ovulatórios menores (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

O tratamento com formulações injetáveis de acetato de deslorelina estimula rápida elevação nas concentrações plasmáticas de LH, detectáveis passados trinta (INGWERSON, 2007) e sessenta minutos (BOAKARI, 2014), atingindo o

pico plasmático com sete a oito horas (DONADEU, 1997; BOAKARI, 2014). Este último autor verificou que os níveis plasmáticos de LH foram superiores ao controle nas seis horas que precederam a ovulação nos animais induzidos com 1,5 mg de acetato de deslorelina (I.M.).

Da mesma forma que o hCG, o acetato de deslorelina foi empregado de forma satisfatória como indutor de ovulação para éguas inseminadas com sêmen congelado (SQUIRES et al., 2003; HEMBERG et al., 2006). Avanzi et al. (2015) compararam dois protocolos de inseminação artificial utilizando uma dose total de 800 milhões de espermatozóides, sendo que as éguas inseminadas uma vez até seis horas pós-ovulação obtiveram a mesma taxa de gestação das inseminadas em tempo fixo com metade da dose, 24 e 40 horas após o tratamento com 1,0 mg de deslorelina (I.M.).

O efeito luteotrófico do acetato de deslorelina na dose de 0,5 mg (I.M.) foi demonstrado nas éguas tratadas nove dias após a última monta do estro por Kino et al. (2014), através do aumento nas concentrações plasmáticas de LH e de progesterona. Resultados similares foram obtidos por Newcombe et al. (2001) utilizando a buserelina, um agonista de GnRH aproximadamente 20 vezes mais potente que a gonadorelina no homem (PARKER e SCHIMMER, 2001), cuja capacidade de induzir a ovulação foi comprovada na espécie equina (HARRISON et al., 1991; BARRIER-BATTUT et al., 2001). A administração de buserelina entre oito e 12 dias após a cobertura aumentou em 10% a taxa de fertilidade das éguas tratadas (NEWCOMBE et al., 2001). Por outro lado, não houve incremento nas concentrações plasmáticas de progesterona, no início do diestro, das éguas cuja ovulação foi induzida com 1,0 mg de acetato de deslorelina (I.M.) (BERTOLDI et al., 2015).

Estudos recentes com a histrelina, um análogo de GnRH aproximadamente 50% mais potente que a deslorelina em humanos (PARKER e SCHIMMER, 2001), demonstraram sua capacidade de induzir e sincronizar as ovulações equinas nas doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg (I.M.) (VOGE et al., 2012; KISER et al., 2013), da mesma forma que a deslorelina (LINDHOLM et al., 2011) e o hCG (VOGE et al., 2012). Esses autores ressaltam a capacidade deste análogo em fazê-lo mesmo no início da estação de monta, quando as concentrações plasmáticas de LH são sabidamente menores (GASTAL et al., 2007).

Fleury et al. (2004) observaram um efeito dose-dependente quando da indução com metade da dose preconizada de acetato de deslorelina. Em seu estudo, as éguas tratadas com 0,5 mg de deslorelina (I.M.) ovularam, em média, cinco horas após às medicadas com 1,0 mg (I.M.). Atraso similar foi obtido na utilização de doses inferiores de histrelina (LINDHOLM et al., 2011) e do extrato de pituitária equina (MELO et al., 2012), de 0,5 e 5,0 mg, respectivamente. O retardo que ocorre pelo emprego de doses inferiores destes hormônios se deve, provavelmente, às concentrações menores de LH, endógeno ou não, já que o extrato de pituitária equina estimula a ovulação por apresentar LH em sua constituição. O efeito dose-dependente na liberação de LH após o uso de buserelina foi observado em potros de um ano de idade por Brown-Douglas et al. (2004), onde somente a maior dose empregada induziu a liberação de LH em todos animais. A existência de um efeito dose-dependente nas baixas concentrações, bem como o risco de “down-regulation” associado ao estímulo excessivo, demonstram a necessidade de estudos comparando a liberação de LH frente às diferentes doses de acetato de deslorelina utilizadas na indução de ovulação.

2.7.3 Associação entre o hCG e o acetato de deslorelina

O uso combinado do hCG com o acetato de deslorelina foi inicialmente utilizado nas éguas submetidas à doação de oócitos, por supostamente favorecerem a maturação folicular e oocitária (CARNEVALE et al., 2005). Situação semelhante foi observada em mulheres que, ao serem tratadas com ambos os hormônios, doaram oócitos capazes de originar embriões de melhor qualidade *in vitro* (DECLEER et al., 2014). Não obstante, Santos (2013) observou um aumento no perfil protéico do líquido folicular de éguas cuja ovulação foi induzida com a referida associação hormonal, o qual pode ter sido consequência de uma alteração na permeabilidade folicular (FAHIMINIYA et al., 2011).

Na literatura, há indícios que podem justificar a existência deste efeito sinérgico. Estudos de biologia molecular detectaram em vacas (NOGUEIRA et al., 2007), ovelhas (ABDENNEBI et al., 2002), éguas (SAINT-DIZIER et al., 2004) e mulheres (MÜLLER et al., 2003) diferentes tipos de receptores para LH. Neste último experimento, demonstrou-se haver isoformas destes receptores, com

distintas afinidades pelas moléculas de hCG e de LH endógeno. Ainda, apesar do LH e do hCG apresentarem um receptor comum, estes hormônios ativam, no meio intracelular, uma série de diferentes reações bioquímicas (CASARINI et al., 2012). Gupta et al. (2012) observaram, *in vitro*, que as células da granulosa de folículos caprinos respondem com crescimento e proliferação celular ao tratamento prolongado com o LH, ao passo que a mesma exposição ao hCG reduz sua taxa de multiplicação e aumenta as concentrações intracelulares do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A forma como este receptor é capaz de identificar o seu ligante pode ser responsável, por exemplo, pelas pequenas diferenças observadas no efeito destes hormônios (CHOI e SMITZ, 2014), como o período entre a aplicação do indutor e a ovulação.

Uliani (2012) estudou o efeito da indução de ovulação com três tratamentos díspares: 1.500 U.I. de hCG (I.V.), 1,0 mg do acetato de deslorelina (I.M.) e uma associação destes, obtendo resultados similares no momento ovulatório, de 38,0 horas para as éguas medicadas com ambos os hormônios. Por outro lado, foi observada maior diferença numérica no aumento de vascularização do folículo pré-ovulatório entre o momento da indução e as oito horas que precederam a ovulação das éguas tratadas com a associação hormonal, de $22,22 \pm 2,07\%$ para $45,00 \pm 4,08\%$, em comparação às medicadas com hCG, de $30,00 \pm 3,65\%$ para $40,83 \pm 6,45\%$ e deslorelina, de $23,33 \pm 2,22\%$ para $37,14 \pm 3,02\%$. Conforme Santos (2013), as éguas induzidas com ambos os hormônios demonstraram aumento em seu perfil protéico intrafolicular, de 73,07 mg/mL, contra 63,97 mg/mL das medicadas somente com o hCG. Já Gomes et al. (2014) não verificaram benefício, tanto em éguas transicionais quanto cíclicas, da utilização conjunta destes indutores na indução e sincronização de ovulação, apesar da taxa de ovulação ter sido numericamente superior quando do uso da associação.

Capítulo 2

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com o hCG e/ou com o acetato de deslorelina, nas doses preconizadas ou em subdoses, sobre as concentrações plasmáticas de LH, a indução e a sincronização de ovulação, o grau de edema endometrial, o diâmetro folicular e a sua taxa de desenvolvimento.

1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- a) verificar o efeito da aplicação de ECP sobre a indução e sincronização da ovulação e as concentrações circulantes de LH;
- b) avaliar se a indução de ovulação com o hCG estimula uma liberação de LH similar à obtida com o acetato de deslorelina;
- c) testar a hipótese de que existe um efeito dose-dependente na liberação de LH endógeno quando da indução de ovulação com o hCG e o acetato de deslorelina, associados ou não;
- d) examinar a hipótese de que a indução de ovulação com uma associação entre o hCG e o acetato de deslorelina estimula liberações de LH superiores às obtidas através do uso destes indutores separadamente;
- e) determinar a taxa de crescimento, o diâmetro folicular pré-ovulatório e a variação temporal no grau de edema endometrial das éguas frente aos diferentes tratamentos com o hCG e o acetato de deslorelina;
- f) verificar se existe correlação entre a taxa de crescimento, o diâmetro folicular e o edema endometrial sobre a fertilidade pós-indução com a dose preconizada de hCG.

Capítulo 3

Trabalho científico elaborado segundo as normas da Journal of Equine Veterinary Science, ISSN 0737-0806, ranqueada como B2 pelo QUALIS – CAPES (2014)

Efeito da aplicação de ECP, hCG e/ou acetato de deslorelina nas concentrações plasmáticas de LH em éguas.

GRECO, G.M.; NOGUEIRA, G.P.; CRESPILO, A.M.; ALVARENGA, M.A.

RESUMO

A manipulação farmacológica do ciclo estral é comumente utilizada na espécie equina, pelo fato das éguas apresentarem grande variação na duração do estro e no intervalo entre o seu início e a ovulação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e/ou com o acetato de deslorelina (DES), nas doses preconizadas ou em subdoses, bem como a aplicação do cipionato de estradiol (ECP), sobre as concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH) e a indução e sincronização da ovulação. A partir da detecção de um folículo ≥ 30 mm de diâmetro e edema endometrial ≥ 2 , 230 éguas foram separadas em oito grupos e tratadas no dia seguinte com, respectivamente: 1,0 mL de salina I.M. (GC; controle), 1,0 mg de DES I.M. (G1), 0,5 mg de DES I.M. (G2), 2.000 UI de hCG I.V. (G3), 750 UI de hCG I.V. (G4), 1,0 mg de DES I.M. e 2.000 UI de hCG I.V. (G5), 0,5 mg de DES I.M. e 750 UI de hCG I.V. (G6) ou 10,0 mg de ECP (G7). Considerou-se como “Momento 0” (M0) o dia do tratamento, sendo o subsequente denominado de “Momento 24” (M24) e assim sucessivamente. As ovulações foram verificadas através de ultrassonografia diária, e o sangue coletado do M0 até dois dias pós-ovulação (D2), sendo uma amostra adicional obtida três dias após (D5). Verificou-se uma maior quantidade ($P < 0,05$) de éguas ovulando no M48 nos grupos induzidos com as diferentes doses de hCG e/ou DES ($\geq 76,67\%$), em relação ao GC (20,00%) e ao medicado com ECP (25,00%), o qual apresentou a mesma taxa de anovulação. Os grupos induzidos com 1,0 e 0,5 mg de DES, associado ou não ao hCG (G1, G2, G5 e G6), demonstraram maior incremento ($P < 0,001$) na concentração de LH no M24 em relação ao M0, sendo a taxa de incremento de cada grupo, respectivamente, de 15,6% (GC), 68,2% (G1), 106,0% (G2), 28,0% (G3), 29,5% (G4), 106,2% (G5), 120,4% (G6) e 22,6% (G7). Já no M48, observou-se o incremento em relação ao M0 de, respectivamente, 66,3% (GC), 90,5% (G1), 166,8% (G2), 63,4% (G3), 98,4% (G4), 80,1% (G5), 125,4% (G6) e 72,8% (G7). Neste momento, os animais tratados com uma subdose de DES (G2), hCG (G4) ou de ambos (G6) apresentaram maior acréscimo ($P < 0,05$) na concentração de LH em relação aos medicados com a dose preconizada (G1, G3 e G5, respectivamente). Os resultados obtidos nos permitiram concluir que: a) tanto o hCG quanto o DES induziram e sincronizaram a ovulação de maneira eficaz; b) o DES estimulou a liberação de LH de forma mais intensa que o hCG após 24 horas da aplicação; c) a adição do hCG ao tratamento com DES não incrementou as

concentrações circulantes de LH; d) o tratamento com ECP não resultou em aumento nas concentrações circulantes de LH, pré-dispondo ao surgimento de folículos anovulatórios e à atresia folicular, possivelmente por inibir a liberação deste hormônio em alguns animais, e) as subdoses de hCG e do DES geraram maior incremento às concentrações circulantes de LH após 48 horas, por um provável mecanismo de “down-regulation” que ocorre com as doses recomendadas destes hormônios.

Palavras-chave: égua, LH, hCG, acetato de deslorelina e ECP.

ABSTRACT

Artificial manipulation of the equine estrous cycle has been routinely implemented, since mares vary greatly in estrous length and in the interval between its onset and ovulation. The aim of this study was to evaluate the effect of estradiol cypionate (ECP) or different treatment doses of human chorionic gonadotropin (hCG) and/or deslorelin acetate (DES), on ovulation induction, synchronization and plasmatic luteinizing hormone (LH) concentrations. Upon detection of one ≥ 30 mm follicle and at least grade 2 endometrial edema, 230 estrous mares were assigned to eight groups and treated, on the following day, with: 1.0 mL of saline I.M. (GC; control), 1.0 mg of DES I.M. (G1), 0.5 mg of DES I.M. (G2), 2,000 IU of hCG I.V. (G3), 750 IU of hCG I.V. (G4), 1.0 mg of DES I.M. and 2,000 IU of hCG I.V. (G5), 0.5 mg of DES I.M. and 750 IU of hCG I.V. (G6) or 10.0 mg of ECP (G7), respectively. The day treatment was initiated was nominated as “Moment 0” (M0), the following day “Moment 24” (M24) and so forth. Ovulations were detected through daily ultrasonography. Blood was collected from M0 up to two days post-ovulation (D2); an additional sample was taken three days later (D5). Mares induced with different hCG and/or DES doses showed higher ovulation rates at M48 ($\geq 76.67\%$; $P < 0.05$) than control (20.00%) and those treated with ECP (25.00%). Mares injected with ECP suffered from a high anovulation rate, of 25.00%. At M24, the increase in LH concentrations in relation to M0 was of, respectively, 15.6% (GC), 68.2% (G1), 106.0% (G2), 28.0% (G3), 29.5% (G4), 106.2% (G5), 120.4% (G6) and 22.6% (G7). Groups treated with DES, either alone or combined to hCG (G1, G2, G5 and G6), showed a substantial increase in LH concentrations ($P < 0.001$) at M24 in relation to M0. At M48, LH concentrations increased, respectively, 66.3% (GC), 90.5% (G1), 166.8% (G2), 63.4% (G3), 98.4% (G4), 80.1% (G5), 125.4% (G6) and 72.8% (G7). This addition was higher ($P < 0.05$) in mares receiving subdoses of DES (G2), hCG (G4) or both (G6), when compared to those treated with their recommended doses (G1, G3 and G5). The obtained results led to the following conclusions: a) both hCG and DES efficiently induced and synchronized ovulations; b) DES stimulated a higher LH secretion than hCG 24 hours post-injection; c) combining hCG to DES treatment did not favor LH secretion; d) ECP treatment did not induce ovulation or favor plasmatic LH concentrations, but, instead, lead to a substantial anovulation and follicular atresia rate, possibly due to its decrease in some animals; e) subdoses of hCG and DES stimulated a higher LH increase after 48 hours, possibly due to a down-regulation mechanism upon administration of the recommended dose.

Key-words: mare, LH, hCG, deslorelin acetate and ECP.

INTRODUÇÃO

A manipulação farmacológica do ciclo estral é rotineiramente utilizada na espécie equina, pelo fato das éguas apresentarem grande variação na duração do estro e no intervalo entre o seu início e a ovulação (GINTHER et al., 1972). Alguns agentes já foram utilizados objetivando sua indução e sincronização, em especial a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (VOSS et al., 1975; BARBACINI et al., 2000; McCUE et al., 2014) e o acetato de deslorelina (DES), um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (FERRIS et al., 2011; LINDHOLM et al., 2011). Apesar de rotineiramente empregado na indução de ovulação na espécie bovina (PANCARCI et al., 2002; AMBROSE et al., 2005; SALES et al., 2012), estudos com o cipionato de estradiol (ECP) em éguas suscitaram resultados divergentes (SEGISMUNDO et al., 2003; GRECO et al., 2012).

O mecanismo de ação destes fármacos gira em torno do hormônio luteinizante (LH), cujo “plateau” é necessário para estimular o desenvolvimento e a maturação folicular e oocitária, a ovulação, a manutenção do corpo lúteo e sua produção de progesterona (HANDLER; AURICH, 2005). Enquanto o hCG mimetiza suas ações, o DES incita sua liberação pela adeno-hipófise. Recentemente, estes dois indutores têm sido utilizados com sucesso de forma associada (GRECO et al., 2012; GOMES et al., 2014), aumentando o perfil protéico intrafolicular (SANTOS, 2013) e auxiliando, supostamente, na qualidade oocitária (CARNEVALE et al. 2005).

Evans et al. (2006) e Ginther et al. (2009) demonstraram que a aplicação intravenosa (I.V.) de hCG também instiga a ocorrência de um pico endógeno de LH, por um suposto “feedback” negativo exercido pelo estrógeno, cujas concentrações declinam pós-tratamento com o hCG. A maneira como o estrógeno influencia as concentrações circulantes de LH na égua ainda permanece obscura, já que administrações diárias deste hormônio resultaram na elevação das concentrações circulantes de LH em éguas (BURNS; DOUGLAS, 1981), mesmo após a ovariectomia (GARCIA; GINTHER, 1978; THOMPSON et al., 1991). Conforme Ginther et al. (2007), o efeito positivo da aplicação de estrógeno sobre o LH verificado em estudos anteriores se deve ao emprego de doses suprafisiológicas.

A fim de identificar o protocolo ideal para a indução de ovulação em éguas, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do tratamento com a gonadotrofina coriônica humana e/ou com o acetato de deslorelina, nas doses preconizadas ou em subdoses, bem como a aplicação do cipionato de estradiol, sobre as concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante e a indução e sincronização da ovulação.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultrassonográficos

O presente experimento foi conduzido em um Haras localizado no município de Conselheiro Lafaiete (LATITUDE 20°40'S e LONGITUDE 43°48'W), Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 230 éguas da raça Campolina, apresentando entre três e 14 anos de idade (7,4 anos de média), 350 a 650 quilogramas de peso e escore corporal entre 6,5 e 8,0, conforme escala proposta por Henneke et al. (1983). As avaliações foram realizadas entre os meses de novembro e fevereiro com auxílio de aparelho digital de ultrassonografia, equipado com transdutor linear de 5,0 Megahertz (V8300® – Chison, Wuxi, China). Os animais selecionados encontravam-se na estação ovulatória, confirmado através da identificação de um corpo lúteo no ovário. Apenas éguas sem anormalidades reprodutivas detectadas à ultrassonografia participaram deste estudo.

Antes que fossem randomicamente separados em grupos, todos os animais foram diariamente avaliados até a ocorrência de uma ovulação espontânea, sendo tratados sete dias após com 5,0 miligramas (mg) do luteolítico dinoprost trometamina pela via intramuscular (I.M.; Lutalyse® – Zoetis, Campinas, Brasil). As avaliações diárias por palpação retal e ultrassonografia, entre oito e dez horas da manhã, foram retomadas a partir do quarto dia desta administração. O diâmetro dos dois maiores folículos foi determinado considerando-se a média da máxima área transversal da altura e da largura de uma simples imagem recuperada no monitor do aparelho de ultrassom. Foram excluídos os ciclos estrais nos quais foi detectado, um dia antes da indução de ovulação, mais do que um folículo ≥ 25 milímetros (mm). Já a ecotextura endometrial foi classificada por meio de um sistema de escores de 0 a 5 (mínimo e máximo) da imagem

uterina, baseado na extensão do edema (áreas anecóicas = pretas) de suas dobras (SAMPER, 1997).

Grupos experimentais e coletas de sangue

No momento da detecção de um folículo maior ou igual ($\geq$) a 30 mm de diâmetro acompanhado de edema endometrial $\geq$ a 2, as 230 éguas foram randomicamente separadas em oito grupos, para serem submetidas à indução de ovulação no dia seguinte. Considerou-se como “Momento 0” (M0) o dia do tratamento, sendo o subsequente denominado de “Momento 24” (M24) e assim sucessivamente. A partir do M0, as avaliações ultrassonográficas diárias foram conduzidas até a ocorrência de uma ovulação (D0) ou até o M120 (o que acontecesse primeiro). Para os animais tratados com hCG, administrou-se o produto Vetecor® (Hertape Calier – Juatuba, Brasil); para os injetados com cipionato de estradiol, utilizou-se o E.C.P.® (Zoetis – Campinas, Brasil). Nos animais medicados com DES, empregou-se o produto Sincrorrelin® (Ouro Fino – Cravinhos, Brasil). Os oito grupos experimentais encontram-se descritos abaixo:

- * GC (controle; n=30): 1,0 mililitro (mL) de solução salina (I.M.).
- * G1 (n=30): 1,0 mg de DES (I.M.).
- * G2 (n=30): 0,5 mg de DES (I.M.).
- * G3 (n=30): 2.000 UI de hCG (I.V.).
- * G4 (n=30): 750 UI de hCG (I.V.).
- * G5 (n=30): 1,0 mg de DES (I.M.) e 2.000 UI de hCG (I.V.).
- * G6 (n=30): 0,5 mg de DES (I.M.) e 750 UI de hCG (I.V.).
- * G7 (n=20): 10,0 mg de ECP (I.M.).

Oito animais do G7 (10,0 mg de ECP) e dez dos demais grupos foram selecionados aleatoriamente para a determinação das concentrações plasmáticas de LH. Para termos de comparação entre os grupos, excluíram-se da análise as amostras das éguas cuja ovulação foi detectada 24 horas após o tratamento (Momento 24). As coletas foram realizadas diariamente entre oito e dez horas da manhã, do M0 até dois dias pós-ovulação (D2), sendo uma última amostra adicional coletada no quinto dia pós-ovulação (D5). O sangue foi obtido por

venopunção jugular à vácuo para o interior de tubos heparinizados e identificados, sendo acondicionado em caixas de isopor refrigerados para posterior centrifugação a 3000 xg por 10 minutos. O plasma sangüíneo foi separado e armazenado a 20 graus Celsius negativos, até o processamento final das análises hormonais pela técnica de radioimunoensaio conforme Thompson et al. (1983), no Laboratório de Endocrinologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Campus de Araçatuba, Brasil. As concentrações de LH foram determinadas e os coeficientes de variação intra e interensaios foram de, respectivamente, 3,55% e 12,25%.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pela versão 9.3.0. do pacote “Statistical Analysis System” (SAS) e pela versão 3.5.1. do pacote “Sigma Stat”, no caso específico do teste do “fold change”.

A taxa de ovulação no Momento 48, bem como a incidência de animais que desenvolveram um folículo anovulatório após o tratamento, foram comparadas pela análise de regressão logística múltipla, onde a taxa de ovulação ou anovulação foram consideradas como variáveis dependentes e o efeito de égua e do tratamento como variáveis preditoras.

As concentrações de LH foram testadas quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando consideradas normais, foram avaliadas através do ANOVA com medidas repetidas. No momento em que os dados apresentaram variâncias desiguais, foram submetidos aos testes não paramétricos de Friedman e Wilcoxon.

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos em relação ao “fold change” das concentrações de LH, considerando os valores do Momento 0 como perfil basal. As medianas foram confrontadas entre si nos diferentes momentos pelo teste de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Taxa de ovulação no Momento 48

Verificou-se uma maior quantidade ($P<0,05$) de éguas ovulando no Momento 48 nos grupos G1 ao G6 (induzidos com o hCG ou com o DES), em relação aos grupos controle e medicados com 10,0 mg de ECP (GC e G7, respectivamente), os quais foram similares entre si ($P>0,05$).

Nos grupos em que o hCG e o DES foram associados (G5 e G6), 93,33% das éguas (28/30) ovularam no M48. Isto ocorreu em 83,33% (25/30) das éguas medicadas com 2.000 UI de hCG (G3), 80,00% (24/30) dos animais em que se utilizou uma subdose do DES ou de hCG (G2 e G4, respectivamente), 76,67% (23/30) das éguas tratadas com 1,0 mg de DES (G1), 25,00% (5/20) das submetidas à administração de 10,0 mg de ECP (G7) e 20,00% (6/30) dos animais do grupo controle (GC). As taxas de ovulação no Momento 48 nos diferentes grupos encontram-se agrupadas na Tabela 1.

TABELA 1 – Porcentagem (%) de éguas que ovularam após 48 horas do tratamento (Momento 48), de acordo com o grupo experimental.

Grupo	Taxa de ovulação no Momento 48
GC (Controle)	20,00% - (6/30) ^a
G1 (DES 1,0 mg)	76,67% - (23/30) ^b
G2 (DES 0,5 mg)	80,00% - (24/30) ^b
G3 (hCG 2.000 UI)	83,33% - (25/30) ^b
G4 (hCG 750 UI)	80,00% - (24/30) ^b
G5 (DES 1,0 mg + hCG 2.000 UI)	93,33% - (28/30) ^b
G6 (DES 0,5 mg + hCG 750 UI)	93,33% - (28/30) ^b
G7 (ECP 10,0 mg)	25,00% - (5/20) ^a

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferenças estatísticas ($P<0,05$).

A ovulação foi identificada no Momento 24 em 13,33% das éguas no G4, 10,00% no GC, G2 e G7, 6,66% no G6 e 3,33% no G3 e G5. Dois dias depois, no

Momento 72, esta foi observada em 23,33% dos animais no GC, 10,00% no G1 e G7, 6,66% no G3 e G4 e 3,33% no G5. Já no Momento 96, verificou-se esta ocorrência em 33,33% das éguas no GC, 26,33% no G7 e 3,33% no G1, G2 e G3. Somente 13,33% das éguas do GC e 6,66% dos animais do G7 ovularam no Momento 120. A porcentagem de éguas de cada grupo, cuja ovulação foi detectada nos diferentes momentos, pode ser visualizada na Figura 1.

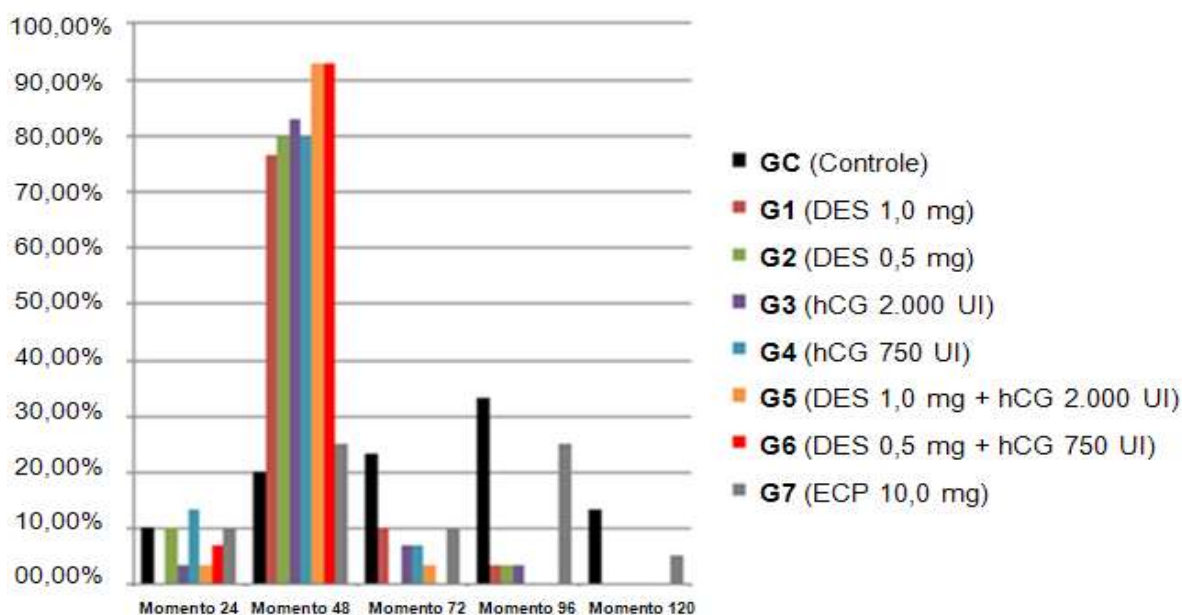


FIGURA 1 – Taxa de ovulação (%) nos diferentes momentos, de acordo com o grupo experimental.

Verificou-se a formação de folículos anovulatórios, os quais regrediram e sofreram atresia, no G1 (3/30; 10,00%), G2 (2/30; 6,67%), G3 (1/30; 3,33%) e G7 (5/20; 25,00%), sendo a incidência deste último grupo superior ($P < 0,05$) às demais.

Concentrações plasmáticas de LH

Os grupos induzidos com diferentes doses do DES, associado ou não ao hCG (G1, G2, G5 e G6), demonstraram maior incremento ($P < 0,001$) na concentração de LH no Momento 24 em relação ao Momento 0, em comparação aos grupos controle (GC), tratados somente com o hCG (G3 e G4) e com 10,0 mg de ECP (G7). A taxa de incremento de cada grupo no M24 foi de,

respectivamente, 15,6% (GC), 68,2% (G1), 106,0% (G2), 28,0% (G3), 29,5% (G4), 106,2% (G5), 120,4% (G6) e 22,6% (G7). Neste dia, o grupo medicado com uma associação de hCG e DES em subdose (G6) apresentou maior incremento na concentração de LH ($P<0,001$) em comparação ao GC, G3, G4 e G7, não diferindo dos demais.

Já no Momento 48, observou-se o incremento em comparação ao Momento 0 de, respectivamente, 66,3% (GC), 90,5% (G1), 166,8% (G2), 63,4% (G3), 98,4% (G4), 80,1% (G5), 125,4% (G6) e 72,8% (G7). Os grupos tratados com subdoses do DES (G2), de hCG (G4) ou de ambos (G6), apresentaram maior incremento ($P<0,05$) na concentração de LH em relação aos grupos em que se administrou sua dose preconizada (G1, G3 e G5, respectivamente). Estes dados encontram-se diagramados na Figura 2. O G2 e o G6 demonstraram um maior incremento na concentração de LH ($P<0,05$) frente ao GC, G1, G3, G5 e G7, não diferindo do G4. As taxas de incremento supracitadas estão agrupadas na Tabela 2, enquanto os valores numéricos das concentrações de LH em cada momento, os quais não diferiram entre si ($P>0,05$), encontram-se na Tabela 3.

TABELA 2 – Taxa de incremento (%) nas concentrações circulantes de LH (mediana, percentis 25 e 75) nos Momentos 24 (M24) e 48 (M48) em relação ao Momento 0 (M0), de acordo com o grupo experimental.

Grupo	Taxa de incremento [LH] no M24	Taxa de incremento [LH] no M48
GC (Controle)	15,6% (0,0% - 30,0%) ^d	66,3% (42,5% - 93,1%) ^c
G1 (DES 1,0 mg)	68,2% (54,4% - 93,4%) ^{abc}	90,5% (57,3% - 103,6%) ^{bc}
G2 (DES 0,5 mg)	106,0% (77,1% - 129,1%) ^{ab}	166,8% (114,7% - 195,0%) ^a
G3 (hCG 2.000 UI)	28,0% (22,5% - 34,0%) ^{cd}	63,4% (45,3% - 87,6%) ^c
G4 (hCG 750 UI)	29,5% (10,0% - 72,9%) ^{cd}	98,4% (72,9% - 143,8%) ^{ab}
G5 (DES 1,0 mg + hCG 2.000 UI)	106,2% (96,4% - 123,5%) ^{ab}	80,1% (49,3% - 130,7%) ^{bc}
G6 (DES 0,5 mg + hCG 750 UI)	120,4% (69,3% - 147,3%) ^a	125,4% (53,1% - 170,3%) ^a
G7 (ECP 10,0 mg)	22,6% (12,5% - 25,3%) ^{cd}	72,8% (48,6% - 84,8%) ^c

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferenças estatísticas pelo teste do “fold change”: $P<0,001$ para o Momento 24 e $P<0,05$ para o Momento 48.

TABELA 3 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) nos diferentes momentos, sendo: GC (grupo controle), G1 (DES 1,0 mg), G2 (DES 0,5 mg), G3 (hCG 2.000 UI), G4 (hCG 750 UI), G5 (DES 1,0 mg e hCG 2.000 UI), G6 (DES 0,5 mg e hCG 750 UI) e G7 (ECP 10,0 mg).

Grupo	Momento 0	Momento 24	Momento 48	D0	D1	D2	D5
GC	5,95 ± 3,65	6,72 ± 4,22	9,46 ± 6,57	13,20 ± 4,65	18,07 ± 3,47	17,20 ± 7,05	7,79 ± 5,52
G1	5,86 ± 3,22	10,71 ± 6,68	10,55 ± 5,96	12,93 ± 5,77	15,85 ± 7,52	18,39 ± 10,18	5,65 ± 3,64
G2	4,24 ± 2,52	8,30 ± 5,24	10,68 ± 5,82	11,08 ± 5,91	15,27 ± 9,12	12,91 ± 9,00	5,32 ± 4,81
G3	6,75 ± 3,31	8,73 ± 3,33	11,27 ± 3,72	10,84 ± 3,89	14,24 ± 4,43	14,28 ± 4,70	6,39 ± 3,70
G4	5,20 ± 2,91	6,96 ± 2,90	9,72 ± 4,24	12,22 ± 10,27	18,94 ± 14,31	14,40 ± 8,57	4,57 ± 3,15
G5	4,41 ± 3,05	9,10 ± 6,04	7,99 ± 5,26	7,99 ± 5,26	11,27 ± 7,39	10,86 ± 8,07	4,55 ± 4,95
G6	4,64 ± 2,17	10,24 ± 5,70	11,15 ± 8,18	11,15 ± 8,18	14,23 ± 8,91	12,88 ± 8,50	7,39 ± 5,46
G7	4,72 ± 2,05	5,51 ± 2,27	7,59 ± 2,59	10,11 ± 2,03	12,70 ± 1,89	14,97 ± 3,50	7,59 ± 2,16

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$; teste ANOVA).

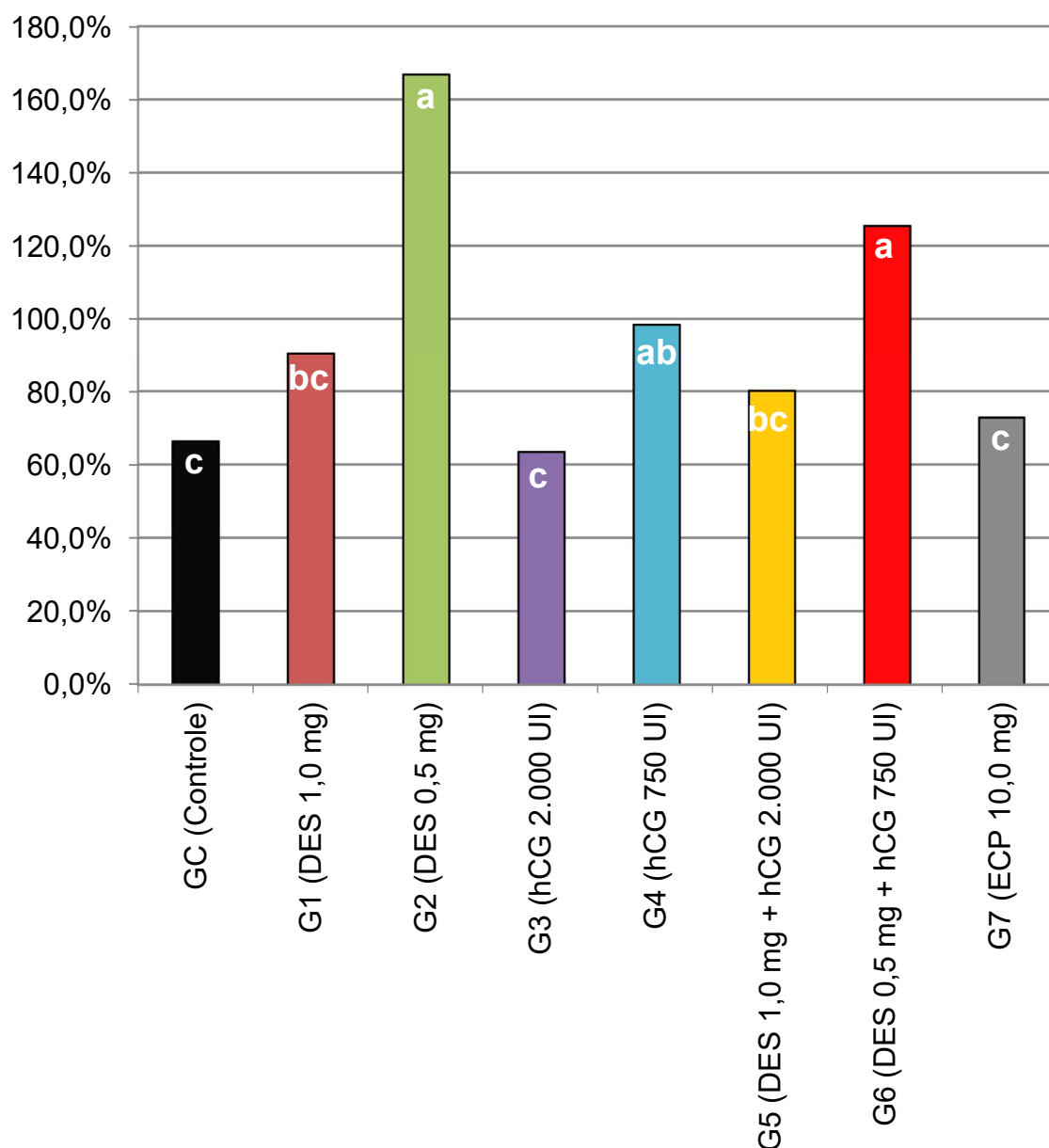


FIGURA 2 – Amplitude de incremento (“fold change”) das concentrações circulantes de LH no Momento 48 (M48) em relação ao Momento 0 (M0), de acordo com o grupo experimental.

^{abc} Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Quando da avaliação individual das éguas do grupo G7 (ECP 10,0 mg), foram observadas diferenças numéricas nas concentrações circulantes de LH entre as éguas que não ovularam e aquelas cuja ovulação foi detectada nos diferentes Momentos.

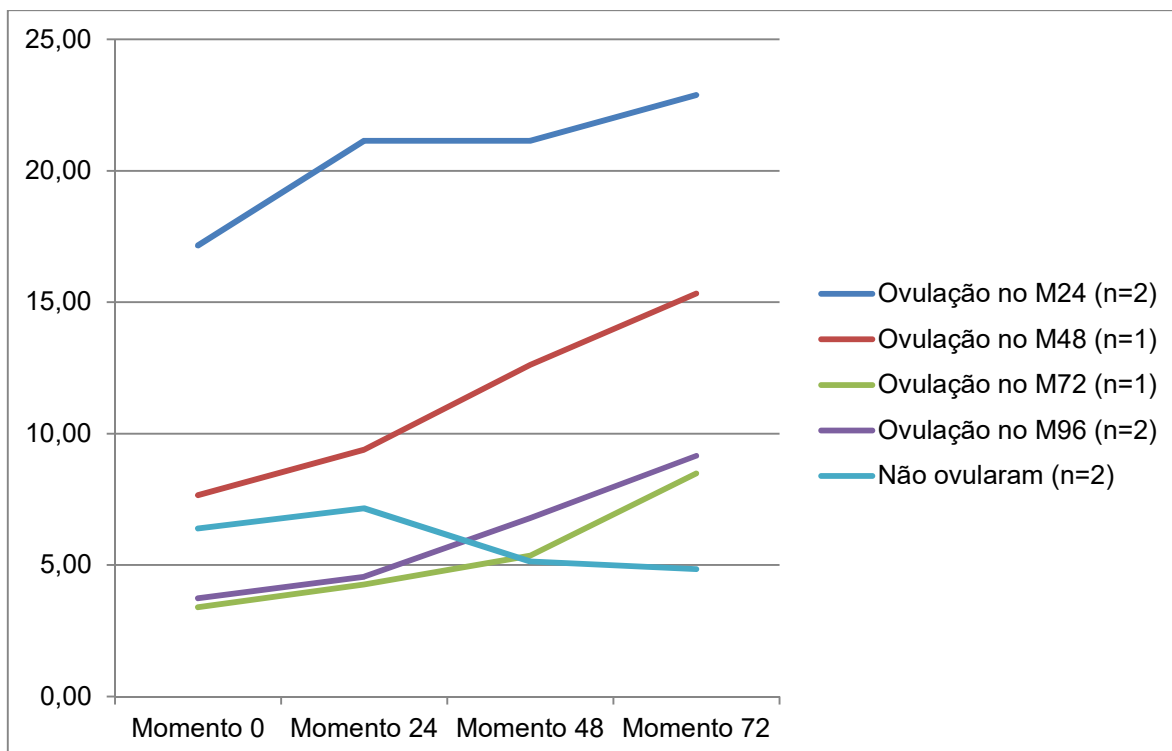


FIGURA 3 – Média das concentrações circulantes de LH (ng/mL) das éguas do grupo G7 (ECP 10,0 mg) que não ovularam e daquelas em que a ovulação foi detectada nos Momentos 24 (M24), 48 (M48), 72 (M72) e 96 (M96).

Todos os grupos apresentaram concentrações similares de LH entre o Momento 0 e o D5 ($P>0,05$), sendo os maiores valores numéricos médios encontrados no D1 ou no D2. Da mesma forma, o Momento 0 apresentou valores inferiores ($P<0,05$) de LH em relação ao Momento 48, D0, D1 e D2.

DISCUSSÃO

As taxas de ovulação entre 24 e 48 horas (no M48) obtidas com o uso de ambas as doses do DES (1,0 mg e 0,5 mg) não diferiram das encontradas na literatura para formulações injetáveis similares (FLEURY et al., 2004; FERRIS et al., 2011) ou sob forma de implante (SAMPER et al., 2002). Em seu estudo, Fleury et al. (2004) verificaram que as éguas tratadas com 0,5 mg de DES ovularam, em média, cinco horas após às induzidas com 1,0 mg. Tal comportamento não pôde ser observado no presente experimento, já que as avaliações foram realizadas a cada 24 horas.

As taxas de ovulação entre 24 e 48 horas para os grupos induzidos com 2.000 UI e 750 UI de hCG foram semelhantes às relatadas quando da utilização de hCG nas doses preconizadas (VOSS et al., 1975; BARBACINI et al., 2000; McCUE et al., 2004; GASTAL et al., 2006) ou em subdoses, de 1.000 UI (BEAL, 2008) e 750 UI (DAVIES-MOREL; NEWCOMBE, 2008). Para o hCG, a dose mínima de 750 UI já parece ter sido identificada, pois Gastal et al. (2006) não obtiveram resultados satisfatórios na indução e sincronização de ovulação com o uso de 500 UI. Através do uso de doses inferiores, há redução substancial no custo da indução com hCG ou DES. Além disto, as baixas doses de hCG podem estimular uma menor formação de anticorpos contra este hormônio (DAVIES-MOREL; NEWCOMBE, 2008). No presente estudo, além das éguas não terem sido previamente tratadas com o hCG na mesma estação de monta, apenas um ciclo estral por égua foi avaliado, razão pela qual não se observou o efeito de aplicações consecutivas de hCG, na dose preconizada ou subdose, sobre sua eficácia.

Nas éguas induzidas com uma associação entre o hCG e o DES, nas doses recomendadas e em subdoses, verificou-se uma taxa de ovulação entre 24 e 48 horas numericamente superior às demais. Este resultado pode ser decorrente do suposto estímulo à maturação folicular do uso combinado destes indutores (CARNEVALE et al., 2005). Recentemente, Santos (2013) explanou o potencial benefício desta associação, com o aumento no perfil protéico do líquido folicular das éguas tratadas. Já Gomes et al. (2014) não detectaram vantagem no seu emprego em conjunto. Uma possível explicação para esta discrepância de resultados é a baixa taxa de ovulação verificada neste último trabalho, em especial com o hCG, de 60,00%, contra 68,79% com o DES e 72,97% com sua associação. Apesar do expressivo número de ciclos e animais envolvidos em seu experimento, os resultados obtidos com o hCG sofreram, provavelmente, influência negativa, pelo fato das éguas terem sido tratadas por mais de um ciclo estral com esta gonadotrofina, o que sabidamente compromete sua eficácia pela formação de anticorpos (McCUE et al., 2004; SIDDIQUI et al., 2009). Estudos com biologia molecular detectaram em éguas diferentes tipos de receptores para LH (SAINT-DIZIER et al., 2004), os quais apresentam, na espécie humana, distintas afinidades pelas moléculas de hCG e de LH endógeno (MÜLLER et al., 2003). Ainda, apesar do LH e do hCG apresentarem um receptor comum, estes

hormônios ativam, no meio intracelular, uma série de diferentes reações bioquímicas (CASARINI et al., 2012). Em folículos caprinos *in vitro*, por exemplo, Gupta et al. (2012) observaram que as células da granulosa respondem com crescimento e proliferação celular ao tratamento prolongado com o LH, ao passo que a mesma exposição ao hCG reduz sua taxa de multiplicação e aumenta as concentrações intracelulares do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A diferença de afinidade destes receptores, a existência de variadas isoformas, bem como a maneira como este receptor é capaz de identificar o seu ligante (CHOI; SMITZ, 2014) podem ser responsáveis pelas diferenças de efeito quando do seu emprego. Novos estudos controlados são necessários para que se detecte o possível benefício do seu uso combinado do hCG e do DES sobre a indução e sincronização de ovulação em eqüinos.

O grupo tratado com 10,0 mg de ECP obteve taxa de ovulação de 25,00% no Momento 48, similar à verificada no grupo controle e inferior à dos demais grupos. Estes resultados indicam que o ECP não foi capaz de induzir e sincronizar as ovulações de forma eficaz, o que se contrapõe ao observado por Segismundo et al. (2003). Estes autores constataram a ocorrência de uma ovulação em 83,33% dos animais até 72 horas da aplicação, contra 45,00% do presente estudo, taxa esta correspondente à soma das ovulações identificadas nos Momentos 24 (10,00%), 48 (25,00%) e 72 (10,00%).

O tratamento com ECP estimulou o desenvolvimento de folículos anovulatórios em 25,00% (5/20) das éguas. Estes folículos sofreram atresia, com redução gradativa em seu diâmetro. Sabe-se que as células da granulosa de folículos atrésicos sofrem apoptose (HUGHES; GOROSPE, 1991; RAJAKOSKI, 1996; YU et al., 2004), em resposta às menores concentrações de IGF-1 no fluido folicular (YIN et al., 1998). Estas podem ser decorrentes de estímulo insuficiente do FSH (CHECURA et al., 2010) e do LH (ACOSTA et al., 2004; SCHAUER et al., 2013). Apesar das concentrações circulantes de FSH não terem sido determinadas no presente estudo, o “feedback” negativo exercido pelo estrógeno sobre esta gonadotrofina já é conhecido (MEDAN et al., 2004). Todavia, a égua apresenta concentrações circulantes de FSH mínimas quando da presença de um folículo pré-ovulatório no estro (GINTHER, 2000). Por outro lado, nas éguas tratadas com ECP que não ovularam, observou-se uma redução numérica progressiva nas concentrações plasmáticas de LH. O estudo de Ginther et al.

(2006) suporta esta associação entre o estrógeno e a anovulação, pois as éguas desenvolvendo folículos anovulatórios apresentaram maiores concentrações de estradiol a partir do quarto dia antes do seu surgimento.

A falta de efeito positivo da administração de estrógeno sobre as concentrações plasmáticas de LH já foi demonstrado, tanto durante o desvio folicular (DONADEU; GINTHER, 2002) quanto no estro (GINTHER et al., 2007), o que se contrapõe a resultados de estudos anteriores (BURNS; DOUGLAS, 1981; GARCIA; GINTHER, 1978; THOMPSON et al., 1991). Conforme Ginther et al. (2007), o efeito positivo da aplicação de estrógeno sobre o LH verificado nestes últimos trabalhos pode ter sido resultado do emprego de doses suprafisiológicas. Contudo, a dose empregada no presente estudo, de 10,0 mg, é 20 vezes maior do que a utilizada para a indução de ovulação da espécie bovina, de apenas 0,5 mg (AMBROSE et al., 2005; SALES et al., 2012). Da mesma forma, Mumford et al. (1994) verificaram que a administração diária de somente 1,0 mg de 17- β estradiol às éguas transicionais, durante oito dias consecutivos, não incrementou suas concentrações circulantes de LH, as quais foram similares ao controle.

Esta capacidade do estrógeno de exercer tanto efeito positivo quanto negativo sobre a síntese de LH já foi demonstrada em vacas (MARTINEZ et al., 2007), ratas (LINDZEY et al. 2006) e mulheres (SHAW et al., 2010). Quando da aplicação de uma única injeção de estradiol, Miller et al. (1981) observaram queda na concentração plasmática de LH nas primeiras horas, a qual foi transitória e seguida de aumento entre oito e 12 horas. Os resultados do presente estudo indicam a ocorrência de um efeito semelhante no G7, porém mais tardio, já que o incremento nas concentrações circulantes de LH, de 22,6% no M24, se elevou para 72,8% no M48. Nas vacas tratadas com cipionato de estradiol para induzir e sincronizar ovulações observou-se a ocorrência de um pico de LH aproximadamente 50 horas após (COLAZO et al., 2003; SALES et al., 2012). É improvável que este incremento ao LH tenha ocorrido em resposta à metabolização e eliminação do estrógeno administrado, já que, em vacas, a aplicação de 10,0 mg de ECP eleva as concentrações deste hormônio acima das observadas no estro por 170 ± 17 horas (VYNCKIER et al., 1990).

Os grupos induzidos com diferentes doses do DES, associado ou não, apresentaram maior incremento ($P < 0,001$) na concentração de LH no Momento 24, em relação aos demais grupos. O DES leva à liberação imediata de LH,

detectável passados trinta minutos de sua aplicação (INGWERSON, 2007). Seu valor máximo pode ser verificado sete a oito horas depois (DONADEU, 1997; BOAKARI, 2014), declinando a partir da décima oitava hora de tratamento (BOAKARI, 2014). O nível de LH das éguas induzidas com 1,0 mg do DES no M24, de 10,71 ng/mL, foi próximo ao obtido por BOAKARI (2014), de 13,92 ng/mL.

Apesar de já ter sido demonstrado que uma venopunção jugular diária é adequada para determinar as concentrações plasmáticas de LH (IRVINE et al., 1998), a metodologia utilizada no presente experimento não identificou o pico que ocorre entre sete e oito horas de sua administração, razão pela qual os valores encontrados no Momento 24 são, provavelmente, inferiores às concentrações que seriam verificadas nesse momento anterior. Mesmo diante disto, o incremento identificado no Momento 24 nos grupos tratados com o DES foi superior ao verificado nos indivíduos medicados somente com o hCG, o qual estimula um pico endógeno de LH a partir de 24 horas de sua aplicação (GINTHER et al., 2009). A análise destes resultados nos permite postular que a liberação de LH promovida pelo hCG é muito menos exuberante que a promovida pelo DES. Da mesma forma, a adição do hCG ao tratamento com DES não promoveu um incremento nas concentrações circulantes de LH, nas doses preconizadas ou em subdoses.

No Momento 48, os grupos tratados com subdoses do DES, de hCG ou de ambos, apresentaram maior incremento ($P < 0,05$) na concentração de LH em relação aos grupos medicados com a dose preconizada destes indutores. Uma possível explicação para este achado é a de que as doses recomendadas destes hormônios sejam suprafisiológicas, estimulando de forma exacerbada seus receptores. Isto pode levar à ocorrência do fenômeno de “down-regulation”, tal qual ocorre em éguas (McCUE et al., 2002; HENDERSON et al., 2012) e cadelas (TRIGG et al., 2001) hiper-estimuladas com o DES. Em seu experimento, Padula et al. (2002) observaram situação semelhante, ao aplicarem diferentes doses de DES a vacas ovariectomizadas. Estes autores identificaram que, apesar de todas as doses testadas terem estimulado um aumento nas concentrações circulantes de LH com uma hora de aplicação, somente a maior dose, de 1,0 mg, levou a uma redução temporária destes níveis após 48 horas, além de uma menor amplitude de pulso.

Os resultados supracitados indicam que as subdoses utilizadas neste estudo, além de diminuir o custo, podem favorecer os índices de fertilidade, já que o LH apresenta efeito luteotrófico e suas maiores concentrações podem estimular a produção de progesterona ou, até mesmo, de progestágenos (KÖHNE et al., 2014). Este fenômeno de “down-regulation” na indução de ovulação, entretanto, parece ser reversível e de curta duração, já que se observou em todos os grupos um pico nas concentrações plasmáticas de LH no D1 e no D2, o que está de acordo com os dados obtidos por Whitmore et al. (1973) para éguas não induzidas. Da mesma forma, os valores similares de LH ($P>0,05$) identificados entre o Momento 0 e o D5 demonstram o que já foi relatado anteriormente, que suas concentrações atingem níveis mais baixos após cinco dias da ovulação, em decorrência do “feedback” negativo da progesterona lútea (GINTHER, 1992).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através do presente trabalho nos permitiram concluir que:

- a) Tanto a gonadotrofina coriônica humana quanto o acetato de deslorelina induziram e sincronizaram a ovulação de maneira eficaz;
- b) O acetato de deslorelina estimulou maior liberação do hormônio luteinizante que a gonadotrofina coriônica humana no Momento 24;
- c) A adição da gonadotrofina coriônica humana ao tratamento com o acetato de deslorelina não promoveu um incremento nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante, seja nas doses preconizadas ou em subdoses;
- d) O tratamento com cipionato de estradiol não resultou em aumento nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante, tendo inibido sua liberação em alguns animais, pré-dispondo ao surgimento de folículos anovulatórios e atresia folicular;
- e) O uso de subdoses da gonadotrofina coriônica humana e do acetato de deslorelina levaram a um maior incremento nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante após 48 horas, por um provável mecanismo de “down-regulation” que ocorre após o uso das doses recomendadas destes hormônios.

REFERÊNCIAS

ACOSTA TJ, BEG MA, GINTHER OJ. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod* 2004;71:637-42.

AMBROSE JD, KASTELIC JP, RAJAMAHENDRAN R, AALI M, DINN N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. *Theriogenology* 2005;64:1457-74

BARBACINI S, ZAVAGLIA G, GULDEN P, MARCHI V, NECCHI D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet Educ* 2000;2:404-10.

BEAL J. [Ovulation induction in crioulla mares with different doses of human chorionic gonadotrophin]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2008.

BOAKARI YL. [Effect of hCG and deslorelin on follicular hemodynamics and endogenous profile of LH in cyclic mares]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2014.

BURNS PJ, DOUGLAS RH. Effects of daily administration of estradiol-17 β on follicular growth, ovulation, and plasma hormones in mares. *Biol Reprod* 1981;24:1026-31.

CARNEVALE EM, COUTINHO DA SILVA MA, PANZANI D, STOKES JE, SQUIRES EL. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology* 2005;64:519-27.

CASARINI L, LISPI M, LONGOBARDI S, MILOSA F, LA MARCA A, TAGLIASACCHI D, PIGNATTI E, SIMONI M. LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different Intracellular Signalling. *Plos One* 2012;7:e46682.

CHECURA CM, BEG MA, PARRISH JJ, GINTHER OJ. Positive effect of FSH but not LH on early development of the dominant follicle in mares. *Reprod Fert Develop* 2010;22:1092-9.

CHOI J, SMITZ J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Mol Cell Endocrinol* 2014;383:203-13.

COLAZO MG, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. Effects on estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based fixed time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 2003;60:855-65.

DAVIES MOREL MCG, NEWCOMBE JR. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation,

pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. Anim Reprod Sci 2008;109:189-99.

DONADEU FX. Evaluation of Deslorelin during the breeding season and of sulpiride during seasonal anestrus for induction of ovulation in mares. Baton Rouge (LA): Louisiana State University; 1997.

DONADEU FX, GINTHER OJ. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin, and estradiol during the anovulatory season in mares. Reproduction 2002;124:875-85.

EVANS MJ, GASTAL EL, SILVA LA, GASTAL MO, KITSON NE, ALEXANDER SL, et al. Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotropin to estrous mares. Anim Reprod Sci 2006;94:191-4.

FERRIS RA, HATZEL JN, LINDHOLM RG, SCOFIELD DB, MCCUE PM. Efficacy of deslorelin acetate (sucromate) on induction of ovulation in american quarter horse mares. J Equine Vet Sci 2011;32:1-4.

FLEURY PDC, ALONSO MA, ALVARENGA MA, DOUGLAS RH. Intervals to ovulation after treatment with oestradiol cypionate (ECP) or biorelease deslorelin (BRT-DES). Havemeyer Found Monogr Ser 2004;14:89.

GARCIA MC, GINTHER OJ. Regulation of plasma LH by estradiol and progesterone in ovariectomized mares. Biol Reprod 1978;19:447-53.

GASTAL EL, SILVA LA, GASTAL MO, EVANS MJ. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. Anim Reprod Sci 2006;94:186-90.

GINTHER OJ Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied aspects. 2th ed. Wisconsin: Equiservices, Cross Plains; 1992.

GINTHER, OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. Anim Reprod Sci 2000;60:61-79.

GINTHER, OJ, BEG MA, GASTAL EL, GASTAL MO, COOPER DA. Treatment with human chorionic gonadotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. Anim Reprod Sci 2009;114:311-7.

GINTHER OJ, UTT MD, BEG MA, GASTAL EL, GASTAL MO. Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. Biol Reprod 2007;77:543-50.

GINTHER OJ, UTT MD, BERGFELT DR, BEG MA. Controlling interrelationships between progesterone/LH and estradiol/LH during the equine estrous cycle. Anim Reprod Sci 2006;95:144-50.

GINTHER OJ, WHITMORE HL, SQUIRES EL. Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects of season and nursing. *Am J Vet Res* 1972;33:1935-9.

GOMES RG, OLIVEIRA RL, SCHUTZER CGC, BARREIROS TRR, SENEDA MM. Effect of deslorelin and/or human chorionic gonadotropin on inducing ovulation in mares during the transition period versus ovulatory season. *J Equine Vet Sci* 2014;34:1140-2.

GRECO GM, DELL'AQUA JA, ALVARENGA MA. Evaluation of novel protocols for ovulation induction in the mare. *Reprod Dom Anim* 2012;47:475-6.

GUPTA C, CHAPEKAR T, CHHABRA Y, SINGH P, SINHA S, LUTHRA K. Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells. *Indian J Med Res* 2012;135:331-40.

HANDLER J, AURICH JE. Physiologie des Sexualzyklus der Stute. In: AURICH C editor. *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. Stuttgart: Parey Verlag; 2005. p. 15-30.

HENDERSON IS, BRAMA P, OSBORNE M, BELTMAN ME. Interovulatory intervals in mares receiving deslorelin implants in Ireland (2009 to 2010). *Vet Rec* 2012;170:541.

HENNEKE DR, POTTER GD, KREIDER JL, YEATES BF. Relationship between condition score, physical measurement, and body fat percentage in mares. *Equine Vet J* 1983;15:371-2.

HUGHES FMJ, GOROSPE WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol* 1991;129:2415-22.

INGWERSON JA. Induction of ovulation and LH response in cyclic mares treated with gonadorelin diacetate tetrahydrate. Ames (IA): Iowa State University, 2007.

IRVINE CHG, TURNER JE, ALEXANDER SL, SHAND N, VAN NOORDT S. Gonadotrophin profiles and dioestrous pulsatile release patterns in mares as determined by collection of jugular blood at 4 h intervals throughout an oestrous cycle. *J Reprod Fert* 1998;113:315-22.

KÖHNE M, KUHL J, ILLE N, ERBER R, AURICH C. Treatment with human chorionic gonadotrophin before ovulation increases progesterone concentration in early equine pregnancies. *Anim Reprod Sci* 2014;149:187-93.

LINDHOLM ARG, FERRIS RA, SCOFIELD DB, MCCUE PM. Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. *J Equine Vet Sci* 2011;31:312-3.

LINDZEY J, JAYES FL, YATES MM, COUSE JF, KORACH KS. The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor-alpha. *J Endocrinol* 2006;191:309-17.

MARTINEZ MF, KASTELIC JP, COLAZO MG, MAPLETOFT RJ. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. *Dom Anim Endocrinol* 2007;33:77-90.

MCCUE PM, FERRIS RA, BURDEN CA. Review of techniques for prediction of ovulation in the mare. *AAEP Proc* 2014;60:41-4.

MCCUE PM, HUDSON JJ, BRUEMMER JE, SQUIRES EL. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *AAEP Proc* 2004;50:510-3.

MCCUE PM, FARQUHAR VJ, CARNEVALE EM, SQUIRES EL. Removal of deslorelin (Ovuplant TM) implant 48 h after administration results in normal interovulatory intervals in mares. *Theriogenology* 2002;58:865-70.

MCCUE PM, HUDSON JJ, BRUEMMER JE, SQUIRES EL. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *AAEP Proc* 2004;50:510-3.

MEDAN MS, NAMBO Y, NAGAMINE N, SHINBO H, WATANABE G, GROOME N, TAYA K. Plasma concentrations of ir-inhibin, inhibin A, inhibin pro-alphaC, FSH, and estradiol-17beta during estrous cycle in mares and their relationship with follicular growth. *Endocrine* 2004;25:7-14.

MILLER PA, WESSON JA, GINTHER, OJ. Interaction of estradiol and a nonsteroidal follicular fluid substance in the regulation of gonadotropin secretion in the mare. *Biol Reprod* 1981;24:354-8.

MÜLLER T, GROMOLL J, SIMONI M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2242-9.

MUMFORD EL, SQUIRES EL, JASKO DJ, NETT TM. Use of gonadotropin-releasing hormone, estrogen, or a combination to increase releasable pituitary luteinizing hormone in early transitional mares. *J Anim Sci* 1994;72:174-7.

PADULA AM, BORMAN JM, WRIGHT PJ, MACMILLAN KL. *Anim Reprod Sci* 2002;70:37-47.

PANCARCI SM, JORDAN ER, RISCO CA, SCHOUTEN MJ, LOPES FL, MOREIRA F, et al. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002;85:122-31.

RAJAKOSKI E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to season, cyclical and left-right variation. *Acta Endocrinol Suppl* 1996;51:1-68.

SAINT-DIZIER M, CHOPINEAU M, DUPONT J, COMBARNOUS Y. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. *Reproduction* 2004;128:219-28.

SALES JN, CARVALHO JB, CREPALDI GA, CIPRIANO RS, JACOMINI JO, MAIO JR, et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012;78:510-6.

SAMPER JC. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. *AAEP Proc* 1997;43:189-91.

SAMPER JC, JENSEN S, SERGEANT J, ESTRADA, A. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. *J Equine Vet Sci* 2002;22:320-3.

SANTOS GO. [Ovulation induction with hCG and deslorelin acetate in the mare induces changes in the protein profile of the follicular liquid]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

SCHAUER SN, GUILLAUME D, DECOURT C, WATSON ED, BRIANT C, DONADEU FX. Effect of luteinizing hormone overstimulation on equine follicle maturation. *Theriogenology* 2013;79:409-16.

SEGISMUNDO R, ALVARENGA MA, GOMES GM. Avaliação do cipionato e benzoato de estradiol na indução e sincronização de ovulações em éguas. *Acta Sci Vet* 2003;31:562.

SHAW ND, HISTED SN, SROUJI SS, YANG J, LEE H, HALL JE. Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1955-61.

SIDDIQUI MAR, GASTAL EL, GASTAL MO, BEG MA, GINTHER OJ. Effect of hCG in the presence of hCG antibodies on the follicle, hormone concentrations and oocyte in mares. *Reprod Dom Anim* 2009;44:474-9.

THOMPSON DL, GARZA JR F, ST GEORGE RL, RABB MH, BARRY BE, FRENCH DD. Relationships among LH, FSH and prolactin secretion, storage and response to secretagogue and hypothalamic GnRH content in ovariectomized pony mares administered testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, progesterone, dexamethasone or follicular fluid. *Dom Anim Endocrinol* 1991;8:189-99.

THOMPSON DL, GODKE RA, SQUIRES EL Testosterone effects on mares during synchronization with altrenogest: FSH, LH, estrous duration and pregnancy rate. *J Anim Sci* 1983;56:678-86.

TRIGG TW, WRIGHT PJ, ARMOUR AF, WILLIAMSON PE, JUNAIDI A, MARTIN GB, et al. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term

suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. J Reprod Fertil Suppl 2001;57:255-61.

VOSS JL, SULLIVAN JJ, PICKETT BW, PARKER WG, BURWASH LD, LARSON LL. The effect of hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. J Reprod Fertil Suppl 1975;23:297-301.

VYNCKIER L, DEBACKERE M, DE KRUIF A, CORYN M. Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate - a preliminary study. J Vet Pharmacol Ther 1990;13:36-42.

WATSON ED, BAE SE, THOMASSEN R, THOMSON SR, WOAD K, ARMSTRONG DG. Insulin-like growth factors-I and -II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. Reproduction 2004;128:321-9.

WHITMORE HL, WENTWORTH BC, GINTHER OJ. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. Am J Vet Res 1973;34:631-6.

YIN DL, PU L, PEI G. Antisense oligonucleotide to insulin-like growth factor II induces apoptosis in human ovarian cancer AO cell line. Cell Res;8:159-65, 1998.

YU YS, SUI HS, HAN ZB, LI W, LUO MJ, TAN JH. Apoptosis in Granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. Cell Res 2004;14:341-6.

Trabalho científico elaborado segundo as normas da Journal of Equine Veterinary Science, ISSN 0737-0806, ranqueada como B2 pelo QUALIS – CAPES (2014)

Efeito de diferentes protocolos de indução de ovulação sobre o edema endometrial e o diâmetro folicular e sua correlação com a fertilidade pós-tratamento com o hCG

GRECO, G.M.; DELL'AQUA Jr, J.A.; CRESPILO, A.M.; ALVARENGA, M.A.

RESUMO

A fim de estimular e sincronizar a ovulação na espécie equina, agentes indutores são utilizados há mais de cinco décadas. O presente trabalho avaliou o efeito da indução de ovulação com diferentes doses de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e/ou do acetato de deslorelina (DES), sobre o edema endometrial e o diâmetro folicular. Ainda, almejou verificar se estes parâmetros influenciam a fertilidade das éguas tratadas com 2.000 UI de hCG. À detecção de um folículo ≥ 30 mm e edema endometrial ≥ 2 , 210 éguas foram separadas em grupos e tratadas, no dia seguinte, com: 1,0 mL de salina I.M. (GC; controle), 1,0 mg de DES I.M. (G1), 0,5 mg de DES I.M. (G2), 2.000 UI de hCG I.V. (G3), 750 UI de hCG I.V. (G4), 1,0 mg de DES I.M. e 2.000 UI de hCG I.V. (G5) ou 0,5 mg de DES I.M. e 750 UI de hCG I.V. (G6). Considerou-se como “Momento 0” (M0) o momento da indução, sendo o dia subsequente denominado de “Momento 24” (M24) e assim sucessivamente. O diâmetro folicular e o grau de edema endometrial foram diariamente avaliados até a ovulação. As éguas do grupo GC e G3 foram inseminadas com 800 milhões de espermatozoides móveis. A primeira inseminação foi realizada no M0, sendo repetida em dias alternados, quando necessário, até a ovulação. O diagnóstico de gestação foi realizado no 15º dia pós-ovulação. Verificou-se uma maior quantidade ($P < 0,05$) de éguas ovulando no M48 no G1 ao G6 ($\geq 76,67\%$), em relação ao controle (GC: 20,00%). No M24, o GC apresentou o maior valor numérico no grau de edema endometrial ($2,07 \pm 0,75$), superior ($P < 0,05$) ao observado no G2 ($1,67 \pm 0,70$), G3 ($1,68 \pm 0,66$), G4 ($1,72 \pm 0,61$) e G5 ($1,58 \pm 0,51$). No M48, o grau de edema do GC foi maior ($P < 0,05$) que dos demais (GC: $1,48 \pm 0,85$; G1: $1,00 \pm 0,66$; G2: $0,96 \pm 0,68$; G3: $0,80 \pm 0,64$; G4: $0,87 \pm 0,66$; G5: $0,74 \pm 0,54$ e G6: $0,93 \pm 0,38$). À detecção da ovulação, observou-se maior grau ($P < 0,05$) de edema endometrial nas éguas induzidas (G1: $0,74 \pm 0,47$; G2: $0,79 \pm 0,64$; G3: $0,77 \pm 0,56$; G4: $1,00 \pm 0,69$; G5: $0,75 \pm 0,55$ e G6: $0,95 \pm 0,55$) em comparação ao GC, de $0,42 \pm 0,46$. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos no diâmetro nem na taxa de desenvolvimento folicular no M24. Um dia antes da ovulação (D-1), o GC apresentou diâmetro folicular superior ($P < 0,05$) (GC: $41,05 \pm 3,61$; G1: $38,75 \pm 1,79$; G2: $38,80 \pm 2,38$; G3: $38,45 \pm 2,88$; G4: $38,39 \pm 2,72$; G5: $38,79 \pm 1,83$ e G6: $38,57 \pm 1,98$ mm). A taxa de fertilidade entre os grupos GC (60,00%) e G3 (62,07%) foi semelhante ($P > 0,05$). Nos animais induzidos com 2.000 UI de hCG (G3), tanto o grau máximo observado de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade ($P > 0,05$). Por outro lado, no M24, o tamanho e a

taxa de desenvolvimento folicular das éguas gestantes deste grupo apresentaram uma tendência à correlação ($P=0,09$). Os resultados nos permitiram concluir que: a) os diferentes protocolos propostos com o hCG e/ou o DES induziram e sincronizaram a ovulação de forma eficaz, estimulando sua ocorrência de folículos pré-ovulatórios menores; b) os tratamentos com o hCG e/ou o DES não impediram o desenvolvimento folicular ou reduziram o diâmetro folicular no Momento 24; c) a indução de ovulação levou a uma redução no grau de edema endometrial após 24 horas; o qual persistiu à ovulação; d) o grau máximo de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade pós-indução com 2.000 UI de hCG; e) o tamanho e a taxa de desenvolvimento folicular pós-indução com 2.000 UI de hCG tenderam a uma correlação positiva com a taxa de fertilidade pós-inseminação.

Palavras-chave: égua, hCG, deslorelina, diâmetro folicular, edema endometrial e fertilidade.

ABSTRACT

In order to induce and synchronize ovulations in the mare, ovulation inductors have been used for more than five decades. The present work aimed to evaluate the effect of different human chorionic gonadotropin (hCG) and/or deslorelin acetate (DES) doses, on endometrial edema and follicular diameter. Moreover, to verify whether these parameters influence fertility in mares treated with 2.000 IU of hCG. Upon detection of one ≥ 30 mm follicle and at least grade 2 endometrial edema, 210 mares were assigned to seven groups and treated, on the following day, with: 1.0 mL of saline I.M. (GC; control), 1.0 mg of DES I.M. (G1), 0.5 mg of DES I.M. (G2), 2,000 IU of hCG I.V. (G3), 750 IU of hCG I.V. (G4), 1.0 mg of DES I.M. and 2,000 IU of hCG I.V. (G5) or 0.5 mg of DES I.M. and 750 IU of hCG I.V. (G6). The day an ovulation was induced was nominated as "Moment 0" (M0), the following day "Moment 24" (M24) and so forth. Follicular diameter and endometrial edema score were daily accessed until an ovulation occurred. GC and G3 mares were artificially inseminated with 800 million motile sperm beginning at M0, being rebred, if necessary, every other day until an ovulation occurred. Pregnancy diagnosis was performed at 15 days post-ovulation. Mares from G1 to G6 showed higher ovulation rates ($\geq 76.67\%$; $P<0.05$) than GC (20.00%) at M48. GC had higher numerical scores of endometrial edema at M24 (2.07 ± 0.75), superior ($P<0.05$) than G2 (1.67 ± 0.70), G3 (1.68 ± 0.66), G4 (1.72 ± 0.61) and G5 (1.58 ± 0.51) and to all others ($P<0.05$) at M48 (GC: 1.48 ± 0.85 ; G1: 1.00 ± 0.66 ; G2: 0.96 ± 0.68 ; G3: 0.80 ± 0.64 ; G4: 0.87 ± 0.66 ; G5: 0.74 ± 0.54 and G6: 0.93 ± 0.38). Induced mares ovulated with higher ($P<0.05$) endometrial edema scores (G1: 0.74 ± 0.47 ; G2: 0.79 ± 0.64 ; G3: 0.77 ± 0.56 ; G4: 1.00 ± 0.69 ; G5: 0.75 ± 0.55 and G6: 0.95 ± 0.55) than GC (0.42 ± 0.46). No differences ($P>0.05$) were detected in follicular diameter and growth at M24. However, higher follicular diameters ($P<0.05$) were seen in GC one day before ovulation (D-1) (GC: 41.05 ± 3.61 ; G1: 38.75 ± 1.79 ; G2: 38.80 ± 2.38 ; G3: 38.45 ± 2.88 ; G4: 38.39 ± 2.72 ; G5: 38.79 ± 1.83 and G6: 38.57 ± 1.98 mm). GC and G3 showed similar ($P>0.05$) fertility rates, of 60.00% and 62.07%, respectively. Fertility in G3 mares (hCG 2,000 IU) was not influenced ($P>0.05$) by the maximum endometrial edema score observed during estrous or the grade of edema the day an ovulation was detected.

On the other hand, size and growth rate of the dominant follicle tended ($P=0.09$) to positively influence fertility in these mares. Obtained results led to the following conclusions: a) protocols using hCG and/or DES successfully induced and synchronized ovulations, stimulating smaller pre-ovulatory follicles to ovulate; b) treatment with hCG and/or DES did not impair follicular development after 24 hours; c) ovulation induction decreased endometrial edema after 24 hours, which persisted at ovulation; d) fertility of mares treated with 2,000 IU of hCG was not influenced by the maximum endometrial edema score observed during estrous or the grade of edema the day an ovulation was detected; e) follicle size and growth rate post-induction with 2,000 IU of hCG tend to bear a positive correlation with fertility.

Key-words: mare, hCG, deslorelin, follicular growth, endometrial edema and fertility.

INTRODUÇÃO

A fim de estimular e sincronizar a ovulação na espécie equina, agentes indutores têm sido utilizados há mais de cinco décadas (LOY; HUGHES, 1966). Dentre os principais hormônios empregados com este fim, destacam-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o acetato de deslorelina (DES) (McCUE et al., 2014). Além de anteciparem a ovulação, determinando sua ocorrência em folículos pré-ovulatórios menores (GASTAL et al., 2006a; CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2008), estes fármacos parecem influenciar outras características reprodutivas, como o grau de edema endometrial e a taxa de desenvolvimento folicular.

O edema endometrial manifesta-se especialmente durante o cio, sendo dependente dos níveis circulantes de estrógenos ovarianos (CHAVATTE; PALMER, 1998). O útero, sob ação deste hormônio, sofre incremento em sua perfusão (ESTELLER-VICO et al., 2016), aumentando de volume e desenvolvendo uma aparência típica, descrita como “roda de carro” (SAMPER, 2010). A avaliação ultrassonográfica do edema endometrial é rotineiramente conduzida a fim de auxiliar na determinação do momento ideal para se inseminar uma égua (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2008), pois sua intensidade diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (HAYES et al., 1985). A persistência de excessivo edema uterino, durante ou após a ovulação, tem sido associada à endometrite subclínica (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Entretanto, Squires et al. (2014) não verificaram influência negativa da presença de edema endometrial demasiado à ovulação sobre a fertilidade, razão pela qual novos estudos acerca desta questão são necessários.

Compreender como o tratamento com diferentes indutores de ovulação influencia o grau de edema endometrial permite que sejam detectados indícios, por exemplo, quando o fármaco não surte o efeito desejado. Todavia, poucos estudos abordaram esta questão. Gastal et al. (2006a) e Ginther et al. (2009) demonstraram que a indução de ovulação com o hCG pela via intravenosa (I.V.) resulta em declínio nas concentrações circulantes de estradiol poucas horas depois, o que parece acompanhar a redução no grau de edema endometrial que ocorre imediatamente pós-indução com este hormônio (DOLEZEL et al., 2012). Da mesma forma, Cuervo-Arango e Newcombe (2008) observaram uma

tendência das éguas induzidas com o hCG ou com o DES a apresentarem valores numéricos superiores no grau de edema endometrial a partir de 24 horas antes da ovulação, até a sua detecção.

O folículo pré-ovulatório equino cresce entre 2 e 4 milímetros (mm) por dia até os dois dias que precedem a ovulação, quando sofre considerável redução na sua taxa de crescimento, podendo o seu diâmetro permanecer constante (KOSKINEN et al., 1989; GINTHER et al.; 2009). Estudos anteriores afirmaram que a indução de ovulação com o hCG faz com que os folículos maiores ou iguais ($\geq$) a 35 milímetros (mm) parem de crescer (GASTAL et al., 2006a; 2006b; ULIANI, 2012), enquanto Silva et al. (2006) verificaram que nem todos os folículos pré-ovulatórios das éguas medicadas com esta gonadotrofina cessaram seu desenvolvimento. Não obstante, neste mesmo experimento, observaram que as éguas cujos folículos aumentaram mais do que 1,0 mm pós-indução apresentaram maior probabilidade de se tornarem gestantes após monta natural, evidenciando a necessidade de novos estudos acerca desta questão.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da indução de ovulação com diferentes doses de gonadotrofina coriônica humana e/ou do acetato de deslorelina, sobre o edema endometrial, diâmetro e a taxa de desenvolvimento folicular. Ainda, almejou verificar nas éguas induzidas com 2.000 UI de gonadotrofina coriônica humana, se o edema endometrial, o diâmetro folicular pré-ovulatório e sua taxa de crescimento exercem influência sobre a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultrassonográficos

O presente experimento foi conduzido em um Haras localizado no município de Conselheiro Lafaiete (LATITUDE 20°40'S e LONGITUDE 43°48'W), Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 210 éguas da raça Campolina, apresentando entre três e 14 anos de idade (7,3 anos de média), 350 a 650 quilogramas de peso e escore corporal entre 6,5 e 8,0, conforme escala proposta por Henneke et al. (1983). As avaliações foram realizadas entre os meses de novembro e fevereiro com auxílio de aparelho digital de ultrassonografia,

equipado com transdutor linear de 5,0 Megahertz (V8300® – Chison, Wuxi, China). Os animais selecionados encontravam-se na estação ovulatória, confirmado através da identificação de um corpo lúteo no ovário. Apenas éguas sem anormalidades reprodutivas detectadas à ultrassonografia participaram deste estudo.

Antes que fossem randomicamente separados em grupos, todos os animais foram diariamente avaliados até a ocorrência de uma ovulação espontânea, sendo tratados sete dias após com 5,0 miligramas (mg) do luteolítico dinoprost trometamina pela via intramuscular (I.M.; Lutalyse® – Zoetis, Campinas, Brasil). As avaliações diárias por palpação retal e ultrassonografia, entre oito e dez horas da manhã, foram retomadas a partir do quarto dia desta administração. O diâmetro dos dois maiores folículos foi determinado considerando-se a média da máxima área transversal da altura e da largura de uma simples imagem recuperada no monitor do aparelho de ultrassom. Já a ecotextura endometrial foi classificada até o dia da ovulação por meio de um sistema de escores de 0 a 5 (mínimo e máximo) da imagem uterina, baseado na extensão do edema (áreas anecóicas = pretas) de suas dobras (SAMPER, 1997). Foram excluídos os ciclos estrais nos quais foi detectado edema endometrial maior do que 4 (a qualquer momento), e/ou mais do que um folículo ≥ 25 mm, um dia antes da indução de ovulação.

Grupos experimentais

No momento da detecção de um folículo ≥ 30 mm de diâmetro acompanhado de edema endometrial ≥ 2 , as 210 éguas foram randomicamente separadas em sete grupos, para serem submetidas à indução de ovulação no dia seguinte. Considerou-se como “Momento 0” (M0) o momento da indução de ovulação, sendo o dia subsequente denominado de “Momento 24” (M24) e assim sucessivamente. A partir do M0, as avaliações ultrassonográficas diárias foram conduzidas até a ocorrência de uma ovulação (D0) ou até o M120 (o que acontecesse primeiro). Para os animais tratados com hCG, administrou-se o produto Vetecor® (Hertape Calier – Juatuba, Brasil). Já para o DES, utilizou-se o Sincrorrelin® (Ouro Fino – Cravinhos, Brasil).

Os sete grupos experimentais encontram-se descritos abaixo:

- * GC (controle; n=30): 1,0 mililitro (mL) de solução salina (I.M.).
- * G1 (n=30): 1,0 mg de DES (I.M.).
- * G2 (n=30): 0,5 mg de DES (I.M.).
- * G3 (n=30): 2.000 UI de hCG (I.V.).
- * G4 (n=30): 750 UI de hCG (I.V.).
- * G5 (n=30): 1,0 mg de DES (I.M.) e 2.000 UI de hCG (I.V.).
- * G6 (n=30): 0,5 mg de DES (I.M.) e 750 UI de hCG (I.V.).

Inseminações artificiais e diagnóstico de gestação

As inseminações artificiais (IA) foram realizadas utilizando-se sêmen fresco de um único garanhão com fertilidade conhecida e satisfatória. Após a coleta de sêmen através de vagina artificial modelo Botucatu, o ejaculado foi imediatamente avaliado microscopicamente, a fim de determinar sua motilidade, concentração e submetê-lo à diluição em meio Botu-sêmen® (Botupharma – Botucatu, Brasil). Apenas ejaculados cuja motilidade total foi superior a 70% foram utilizados na IA. As éguas do GC e G3 (induzidas com 2.000 UI de hCG) foram inseminadas com oitocentos (800) milhões de espermatozóides móveis no corpo uterino, em um volume que variou entre 30 e 50 mL. A primeira inseminação foi realizada no M0, tendo sido repetida em dias alternados até a ocorrência de uma ovulação. As éguas foram diagnosticadas como gestantes por ultrassonografia no 15º dia pós-ovulação.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pela versão 9.3.0. do pacote “Statistical Analysis System” (SAS). A taxa de ovulação no Momento 48 foi comparada através da análise de regressão logística múltipla, onde a observação de ovulação foi considerada como variável dependente e o efeito de égua e do tratamento como variáveis preditoras.

As médias do grau de edema endometrial, do diâmetro folicular e de sua taxa de crescimento foram testadas quanto a sua normalidade pelo teste de

Shapiro-Wilk. Quando consideradas normais, foram avaliadas através do ANOVA com medidas repetidas no tempo. No momento em que os dados apresentaram variâncias desiguais, foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A taxa de concepção foi comparada através da análise de regressão logística múltipla, onde o sucesso foi considerado como variável dependente e o efeito do tratamento com o hCG e o grau de edema endometrial máximo e no D0 como variáveis preditoras. As diferenças foram consideradas como significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Verificou-se uma maior quantidade ($P < 0,05$) de éguas ovulando no Momento 48 no G1 ao G6 (induzidos com hCG e/ou com DES), em relação ao grupo controle (GC). Nos grupos em que o hCG e o DES foram associados (G5 e G6), 93,33% das éguas (28/30) ovularam no Momento 48. Isto ocorreu em 83,33% (25/30) das éguas medicadas com 2.000 UI de hCG (G3), 80,00% (24/30) dos animais em que se utilizou uma subdose de DES ou de hCG (G2 e G4, respectivamente), 76,67% (23/30) das éguas tratadas com 1,0 mg de DES (G1) e 20,00% (6/30) dos animais do grupo controle (GC). Observou-se a formação de folículos anovulatórios no G1 (3/30; 10,00%), G2 (2/30; 6,67%) e G3 (1/30; 3,33%) ($P > 0,05$).

Antes do início do tratamento (M0), houve diferença no grau de edema endometrial, pois o grupo tratado com 750 UI de hCG (G4) apresentou-se com valores superiores ($P < 0,05$) aos demais. No M24, o maior grau de edema endometrial foi observado no GC, o qual diferiu ($P < 0,05$) dos grupos tratados com 0,5 mg de DES (G2), somente com o hCG (G3 e G4) ou com ambos na dose preconizada (G5). Já no momento seguinte (M48), o grupo controle (GC) apresentou score acima ($P < 0,05$) dos demais. Situação inversa ocorreu um dia antes da ovulação (D-1), onde o GC apresentou o menor valor numérico no grau de edema endometrial, diferindo ($P < 0,05$) do G1, G2 e G6. Este comportamento do GC repetiu-se no dia da ovulação (D0), com valores inferiores ($P < 0,05$) aos demais. Estes dados encontram-se agrupados na Tabela 1.

TABELA 1 – Média e desvio padrão do grau de edema endometrial visualizado ultrassonograficamente nos diferentes momentos, de acordo com o grupo experimental.

Grupo	M0	M24	M48	D-1	D0
GC (Controle)	2,32 ± 0,55 ^{bc}	2,07 ± 0,75 ^a	1,48 ± 0,85 ^a	1,50 ± 0,56 ^a	0,42 ± 0,46 ^a
G1 (DES 1,0 mg)	2,32 ± 0,43 ^{bc}	2,05 ± 0,38 ^{ac}	1,00 ± 0,66 ^b	1,98 ± 0,45 ^b	0,74 ± 0,47 ^b
G2 (DES 0,5 mg)	2,38 ± 0,39 ^b	1,67 ± 0,70 ^{bc}	0,96 ± 0,68 ^b	1,88 ± 0,44 ^{bc}	0,79 ± 0,64 ^b
G3 (hCG 2.000 UI)	2,38 ± 0,54 ^b	1,68 ± 0,66 ^b	0,80 ± 0,64 ^b	1,69 ± 0,63 ^{ab}	0,77 ± 0,56 ^b
G4 (hCG 750 UI)	2,62 ± 0,52 ^a	1,72 ± 0,61 ^b	0,87 ± 0,66 ^b	1,87 ± 0,66 ^{ab}	1,00 ± 0,69 ^b
G5 (DES 1,0 mg + hCG 2.000 UI)	2,10 ± 0,44 ^c	1,58 ± 0,51 ^b	0,74 ± 0,54 ^b	1,58 ± 0,53 ^{ac}	0,75 ± 0,55 ^b
G6 (DES 0,5 mg + hCG 750 UI)	2,40 ± 0,44 ^{bc}	1,78 ± 0,39 ^{abc}	0,93 ± 0,38 ^b	1,83 ± 0,36 ^{bc}	0,95 ± 0,38 ^b

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Observou-se diferença no diâmetro folicular no Momento 0, já que o grupo controle (GC) apresentou os menores valores desta variável, diferindo (P<0,05) do G5 e G6. Por outro lado, não foi observada diferença (P>0,05) no diâmetro ou no crescimento folicular dos diferentes grupos logo após a medicação, no M24. A taxa de crescimento folicular entre o M0 e o M24 foi de, respectivamente, 3,05 ± 1,06 mm (GC), 2,68 ± 1,19 mm (G1), 2,84 ± 2,08 mm (G2), 2,33 ± 1,97 mm (G3), 2,80 ± 1,55 mm (G4), 2,63 ± 1,49 mm (G5) e 2,32 ± 1,26 mm (G6). Já no M48, as comparações entre todos os grupos não foram possíveis, pelo pequeno número de animais em que a ovulação ainda não havia ocorrido. Um dia antes da ovulação (D-1), o grupo controle apresentou diâmetro folicular superior (P<0,05) aos grupos induzidos. Estes dados encontram-se agrupados na Tabela 2.

TABELA 2 – Média e desvio padrão do diâmetro folicular observado ultrassonograficamente nos diferentes momentos, de acordo com o grupo experimental.

Grupo	Momento 0	Momento 24	D-1
GC (Controle)	35,45 ± 1,18 ^a	38,53 ± 1,50 ^a	41,05 ± 3,61 ^a
G1 (DES 1,0 mg)	35,76 ± 1,12 ^{ab}	38,44 ± 1,57 ^a	38,75 ± 1,79 ^b
G2 (DES 0,5 mg)	35,73 ± 1,00 ^{ab}	38,46 ± 2,16 ^a	38,80 ± 2,38 ^b
G3 (hCG 2.000 UI)	36,02 ± 1,34 ^{abc}	38,34 ± 2,42 ^a	38,45 ± 2,88 ^b
G4 (hCG 750 UI)	35,73 ± 1,12 ^{ab}	38,59 ± 2,08 ^a	38,39 ± 2,72 ^b
G5 (DES 1,0 mg + hCG 2.000 UI)	36,26 ± 1,29 ^{bd}	38,94 ± 1,71 ^a	38,79 ± 1,83 ^b
G6 (DES 0,5 mg + hCG 750 UI)	36,40 ± 1,22 ^{cd}	38,57 ± 2,05 ^a	38,57 ± 1,98 ^b

^{abcd} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Das trinta éguas inseminadas no grupo G3, vinte e nove ovularam e dezoito foram diagnosticadas como gestantes no décimo quinto dia pós-ovulação (18/29; 62,07%), contra 60,00% (18/30) do grupo controle. Nos animais induzidos com 2.000 UI de hCG (G3), tanto o grau máximo observado de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade (P>0,05). O edema endometrial máximo médio observado nas éguas dos grupos GC e G3 foi de, respectivamente, 2,64 ± 0,41 (GC) e 2,33 ± 0,57 (G3) para as gestantes e 2,36 ± 0,62 (GC) e 2,50 ± 0,48 (G3) para as não gestantes. Já o grau médio de edema endometrial no dia da ovulação foi de, respectivamente, 0,31 ± 0,42 (GC) e 0,67 ± 0,57 (G3) para as gestantes e 0,50 ± 0,48 (GC) e 0,73 ± 0,75 (G3) para as não gestantes.

No Momento 24, o tamanho médio do folículo dominante das éguas que se tornaram gestantes após a indução com 2.000 UI de hCG (G3) demonstrou uma tendência à correlação positiva (P=0,09), quando comparado ao diâmetro das que permaneceram vazias: 39,12 ± 2,22 mm contra 37,36 ± 2,28 mm, respectivamente. O mesmo ocorreu quanto à taxa de crescimento folicular no Momento 24; as éguas do G3 que se tornaram gestantes apresentaram uma tendência (P=0,09) a um maior desenvolvimento folicular em relação às não

gestantes ($2,87 \pm 1,80$ mm contra $1,72 \pm 2,09$ mm, respectivamente). Esta correlação não pôde ser observada nos demais momentos, devido ao fato de 83,33% (25/30) das éguas do G3 terem ovulado no M48.

DISCUSSÃO

As taxas de ovulação do G1 a G6 no Momento 48, superiores ao controle (GC; $P < 0,05$), indicam que os tratamentos propostos induziram e sincronizaram a ovulação de forma eficaz, conforme previamente relatado em estudos anteriores (FLEURY et al., 2004; McCUE et al., 2007; DAVIES MOREL; NEWCOMBE 2008; FERRIS et al., 2012; ULIANI, 2012; GOMES et al., 2014).

O maior grau de edema endometrial observado no G4 (750 UI de hCG) antes do início do tratamento (Momento 0) deve-se, provavelmente, ao acaso, já que os animais foram designados aos diferentes grupos de forma aleatória. Todavia, este dado não interferiu nos resultados dos momentos subsequentes, pois se detectou no M24 maior valor numérico no grau de edema endometrial no GC, superiores ($P < 0,05$) ao próprio G4 e também ao G2 (0,5 mg de DES), G3 (2.000 UI de hCG) e G5 (1,0 mg de DES e 2.000 UI de hCG). Este comportamento se repetiu no Momento 48, porém de maneira mais evidente, quando o GC demonstrou-se superior ($P < 0,05$) aos demais grupos em relação a esta variável.

Pelo fato do edema endometrial ser dependente dos níveis circulantes de estrógenos (CHAVATTE; PALMER, 1998), os dados do presente estudo estão em acordo com os trabalhos anteriores, que demonstraram como a indução com 2.500 UI (I.V.) de hCG estimula um declínio nas concentrações circulantes de estradiol (SILVA et al., 2006; GASTAL et al., 2006a; GINTHER et al., 2009a). Utilizando 3.000 UI desta gonadotrofina, Dolezel et al. (2012) observaram situação semelhante, com decréscimo no grau de edema endometrial pós-indução.

Situação inversa ocorreu um dia antes da ovulação (D-1), quando o GC apresentou o menor valor numérico no grau de edema endometrial, diferindo ($P < 0,05$) do G1 (1,0 mg de DES), G2 (0,5 mg de DES) e G6 (750 UI de hCG e 0,5 mg de DES). Este comportamento do GC repetiu-se de maneira mais expressiva no dia da ovulação (D0), com valores inferiores ($P < 0,05$) aos demais. Os

resultados do presente experimento estão em concordância com os obtidos por Cuervo-Arango e Newcombe (2008), que verificaram nas éguas cuja ovulação foi induzida com 1.500 UI de hCG pela via sub-cutânea ou 2,1 mg do acetato de deslorelina, sob forma de implante, maiores valores numéricos no grau de edema endometrial 24, 16 e oito horas precedendo a ovulação e no momento de sua detecção. Sabe-se que a intensidade do edema endometrial diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (HAYES et al., 1985), e que esta queda parece ocorrer por estímulo estrogênico à expressão de receptores endometriais de progesterona (PELEHACH et al., 2000), os quais se ligam à progesterona pré-ovulatória decorrente da luteinização precoce (BELIN et al., 2000). Apesar de já ter sido demonstrado que o hCG estimula a mudança no padrão esteroidogênico folicular de estrógeno para progesterona (PINTO et al., 2003), é possível que o maior grau de edema endometrial observado no D0 dos animais induzidos com esta gonadotrofina e/ou com o DES seja decorrente do tempo insuficiente para que este se dissipasse, frente à antecipação do processo ovulatório pós-indução.

No Momento 0, o grupo controle (GC) apresentou os menores valores numéricos do diâmetro folicular, os quais diferiram ($P < 0,05$) do G5 e G6. Isto ocorreu muito provavelmente por uma eventualidade, já que as éguas foram designadas aos diferentes grupos de maneira aleatória, quando do surgimento de um folículo ≥ 30 mm no dia anterior. No Momento 24, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos tanto no diâmetro quanto na taxa de crescimento folicular, apesar desta ter sido numericamente superior no GC (de 3,05 mm contra 2,32 a 2,84 mm nos demais). Já no M48, as comparações entre todos os grupos não foram possíveis, já que a maioria dos animais induzidos já havia ovulado.

Estes resultados opõem-se aos obtidos por Gastal et al. (2006a; 2006b), os quais afirmaram que os folículos das éguas tratadas com 2.500 e 1.500 UI de hCG sofreram uma interrupção na sua taxa de desenvolvimento. Por outro lado, os dados do presente estudo assemelham-se aos de Silva et al. (2006), que observaram que 66,66% das éguas apresentaram desenvolvimento folicular maior que 1,0 mm após 30 horas da indução com o hCG. Ao avaliarmos o Momento 24 das éguas que ovularam após o tratamento, situação semelhante foi verificada nas induzidas com 2.000 UI (G3) e 750 UI de hCG (G4), nas quais houve crescimento folicular maior que 1,0 mm em 68,96% (20/29) e 80,00% (24/30) dos

animais, respectivamente. Nos demais grupos, esta porcentagem foi de 88,89% no G1, 96,43% no G2, 93,33% no G5 e 80,00% no G6.

Um dia antes da ovulação (D-1), o grupo controle apresentou diâmetro folicular superior ($P<0,05$) aos tratados com hCG e/ou DES. Ao antecipar a ovulação, as éguas induzidas o fizeram de folículos pré-ovulatórios menores. Situação semelhante foi demonstrada com o hCG (GASTAL et al., 2006a; 2006b; CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE 2008) e o DES (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE 2008).

No Momento 24, o tamanho médio e a taxa de crescimento do folículo dominante das éguas tratadas com 2.000 UI de hCG demonstrou uma tendência à correlação ($P=0,09$) com a fertilidade. Estes dados estão em acordo com os de Silva et al. (2006), os quais observaram que as éguas cujos folículos aumentaram mais do que 1,0 mm pós-indução apresentaram maior probabilidade de se tornarem gestantes após monta natural. Apesar da influência do diâmetro folicular sobre a taxa de concepção ainda ter sido pouco estudada em éguas, esta correlação já foi demonstrada em vacas (SÁ FILHO et al., 2010). Sabe-se que durante o desenvolvimento folicular na espécie bovina, o oócito aumenta a quantidade de síntese e armazenamento de proteínas e do ácido ribonucléico mensageiro (BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001), tornando-se mais competente conforme este diâmetro progride (ARLOTTO et al., 1996; HAGEMANN et al., 1999). Apesar da ocorrência de ovulação após a indução ter sido associada, na égua, à maturidade folicular e oocitária (SILVA et al., 2006; COX et al., 2009), é possível que um diâmetro folicular superior confira mais tempo para que o oócito acumule estes fatores necessários a sua sobrevivência. Estes resultados conferem ao prático a capacidade de estimar a probabilidade de um determinado folículo resultar ou não em gestação, permitindo-o trabalhar de forma mais precisa conforme o crescimento folicular pós-indução, adaptando o intervalo entre a inseminação e a ovulação e/ou trabalhando com sêmen de qualidade distinta.

Nos animais induzidos com 2.000 UI de hCG (G3), tanto o grau máximo observado de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade ($P>0,05$). Estes resultados estão em acordo com os obtidos por Squires et al. (2014). Todavia, é importante ressaltar que apenas éguas sem anormalidades reprodutivas detectadas à ultrassonografia

participaram do presente estudo, já que o edema endometrial excessivo está associado à endometrite subclínica (LEBLANC; CAUSEY, 2009; SAMPER, 2010).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através do presente trabalho nos permitiram concluir que:

- a) Os diferentes protocolos propostos com a gonadotrofina coriônica humana e/ou o acetato de deslorelina induziram e sincronizaram a ovulação de forma eficaz, estimulando sua ocorrência de folículos pré-ovulatórios menores;
- b) Os tratamentos com o a gonadotrofina coriônica humana e/ou o acetato de deslorelina não impediram o desenvolvimento folicular ou reduziram o diâmetro folicular após 24 horas.
- c) A indução de ovulação levou a uma redução no grau de edema endometrial após 24 horas; o qual persistiu à ovulação;
- d) O grau máximo de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade pós-indução com 2.000 UI de gonadotrofina coriônica humana;
- e) O tamanho e a taxa de desenvolvimento folicular pós-indução com 2.000 UI de gonadotrofina coriônica humana tenderam a uma correlação positiva com a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial.

REFERÊNCIAS

ARLOTTO T, SCHWARTZ JL, FIRST NL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996;45:943-56.

BREVINI-GANDOLFI TA, GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001;55:1255-76.

CHAVATTE P, PALMER E. Induction of ovulation in the mare. *Equine Vet Educ* 1998;10:26-30.

COX TJ, SQUIRES EL, CARNEVALE EM. Effect of follicle size and follicle-stimulating hormone on ovulation induction and embryo recovery in the mare. *J Equine Vet Sci* 2009;29:213-8.

CUERVO-ARANGO J, NEWCOMBE JR. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* 2008;69:681-7.

DAVIES MOREL MCG, NEWCOMBE JR. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Anim Reprod Sci* 2008;109:189-199.

DOLEZEL R, RUZICKOVA K, MACECKOVA G. Growth of the dominant follicle and endometrial folding after administration of hCG in mares during oestrus. *Vet Med-Czech* 2012;57:36-41.

ESTELLER-VICO A, LIU LK, VAUGHAN B, STEFFEY EP, BROSNAN RJ. Effects of estradiol on uterine perfusion in anesthetized cyclic mares affected with uterine vascular elastosis. *Anim Reprod Sci* 2016;164:57-63.

FLEURY PDC, ALONSO MA, ALVARENGA MA, DOUGLAS RH. Intervals to ovulation after treatment with oestradiol cypionate (ECP) or biorelease deslorelin (BRT-DES). *Havemeyer Found Monogr Ser* 2004;14:89.

FERRIS RA, HATZEL JN, LINDHOLM ARG, SCOFIELD DB, MCCUE, PM. Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares. *J Equine Vet Sci* 2012;32:285-88.

GASTAL EL, GASTAL MO, GINTHER OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 2006a;131:699-709.

GASTAL EL, SILVA LA, GASTAL MO, EVANS MJ. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim Reprod Sci* 2006b;94:186-90.

GINTHER OJ, BEG MA, GASTAL EL, GASTAL MO, COOPER DA. Treatment with human chorionic gonadotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim Reprod Sci* 2009a;114:311-7.

GINTHER OJ, GASTAL MO, GASTAL EL, JACOB JC, BEG MA. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. *Theriogenology* 2009b;71:780-8.

GOMES RG, OLIVEIRA RL, SCHUTZER CGC, BARREIROS TRR, SENEDA MM. Effect of deslorelin and/or human chorionic gonadotropin on inducing ovulation in mares during the transition period versus ovulatory season. *J Equine Vet Sci* 2014;34:1140-2.

HAGEMANN LJ, BEAUMONT SE, BERG M, DONNISON MJ, LEDGARD A, PETERSON AJ, et al. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev* 1999;53:451-8.

HAYES KEN, PIERSON RA, SCRABA ST, GINTHER OJ. Effect of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology* 1985;24:465-77.

HENNEKE DR, POTTER GD, KREIDER JL, YEATES BF. Relationship between condition score, physical measurement, and body fat percentage in mares. *Equine Vet J* 1983;15:371-2.

KOSKINEN E, KUNTSI H, LINDEBERG H, KATILA T. Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. *Zentralbl Veterinarmed A* 1989;36:299-304.

LEBLANC MM, CAUSEY RC. R.C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reprod Dom Anim* 2009;3:10-22.

LOY RG, HUGHES JP. The effects of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare. *Cornell Vet* 1966; 56:41-50.

MCCUE PM, FERRIS RA, BURDEN CA. Review of techniques for prediction of ovulation in the mare. *AAEP Proc* 2014;60:41-4.

MCCUE PM, MAGEE C, GEE EK. Comparison of compounded deslorelin and hcg for induction of ovulation in mares. *J Equine Vet Sci* 2007;27:58-61.

PELEHACH LM, SHARP DC, PORTER MB, DIXON LN, MCDOWELL KJ Role of oestrogen and progesterone in the control of uterine edema in pony mares. *Biol Reprod Suppl* 2000;62:386.

PINTO CR, PACCAMONTI DL, EILTS BE, VENUGOPAL CS, SHORT CR, GENTRY LR, et al. Concentrations of nitric oxide in equine preovulatory follicles before and after administration of human chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 2003;60:819-27.

SÁ FILHO MF, CRESPILO AM, SANTOS JEP, PERRY GA, BARUSELLI PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 2010;120:23-30.

SAMPER J.C. A review of a practitioner's perspective on endometrial edema. *Pferdeheilkunde* 2010;26;14-8.

SAMPER JC. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. *AAEP Proc* 1997;43:189-91.

SILVA LA, GASTAL EL, GASTAL MO, BEG MA, GINTHER OJ. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Anim Reprod* 2006;3:339-346.

SQUIRES EL, BRADECAMP EE, BALL BA, SCHNOBRICH MR, HOWARD C, TROEDSSON MH, et al. Relationship Between Ultrasonographic Findings at the Time of Breeding and Pregnancy Outcome. *AAEP Proc* 2014;60:45-7.

TRIGG TE, WRIGHT PJ, ARMOUR AF, WILLIAMSON PE, JUNAIDI A, MARTIN GB, et al. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fert Suppl* 2001;57:255-61.

ULIANI RC [Study of follicular characteristics of young and old mares evaluated by ultrasound B-mode and color Doppler and the relationship with the ovulation inducing agent and ovulation time]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2012.

Capítulo 4

DISCUSSÃO

As taxas de ovulação obtidas com o uso de ambas as doses do acetato de deslorelina (1,0 mg e 0,5 mg) entre 24 e 48 horas (no M48), de 76,67% e 80,00%, respectivamente, não diferiram das encontradas na literatura para formulações injetáveis similares (FLEURY et al., 2004; FERRIS et al., 2011; MELO et al., 2012) ou sob forma de implante (MUMFORD et al., 1995; McCUE et al., 2002; SAMPER et al., 2002). Este possui os inconvenientes da aplicação e da necessidade de sua posterior remoção após 48 horas (McCUE et al., 2002), a fim de evitar a ampliação do intervalo interovulatório em algumas éguas (HENDERSON et al., 2012). Isto ocorre por reduções na sensibilidade ou no número de receptores para GnRH dos gonadotrófos pituitários (JOHNSON et al., 2002), fenômeno este denominado de “down-regulation”.

A administração intramuscular do acetato de deslorelina estimula a ocorrência de uma ovulação após 40 a 46 horas (MELO et al., 2005; SAMPER, 2008; ULIANI, 2012), enquanto que as éguas induzidas com 0,5 mg ovulam aproximadamente cinco horas após as tratadas com 1,0 mg (FLEURY et al., 2004). Entretanto, tais comportamentos não foram observados no presente experimento, já que as avaliações foram realizadas a cada 24 horas. Recentemente, a indução e a sincronização de ovulação têm sido atingidas de forma eficaz com apenas 0,25 mg de histrelina, um análogo de GnRH mais potente que a deslorelina (KISER et al., 2013).

As taxas de ovulação entre 24 e 48 horas para os grupos induzidos com 2.000 UI e 750 UI de hCG (83,33% e 80,00%, respectivamente) foram semelhantes às relatadas quando da utilização de hCG nas doses preconizadas (VOSS et al., 1975; McCUE et al., 2004; GASTAL et al., 2006b; McCUE et al., 2014) ou em subdoses, de 1.000 UI (BEAL, 2008) e 750 UI (DAVIES-MOREL e NEWCOMBE, 2008). Estudos anteriores demonstraram que esta ovulação se sucede 36 a 38 horas da aplicação desta gonadotrofina (BARBACINI et al., 2000; SAMPER et al., 2002; SAMPER, 2008; ULIANI, 2012). Para o hCG, a dose mínima de 750 UI já parece ter sido identificada, pois Gastal et al. (2006) não obtiveram resultados satisfatórios na indução e sincronização de ovulação com o uso de 500 UI. Através do emprego de doses inferiores, além da redução substancial no custo da indução, pode haver uma menor formação de anticorpos

anti-hCG (DAVIES-MOREL e NEWCOMBE, 2008), os quais sabidamente comprometem sua eficácia (McCUE et al., 2004; SIDDIQUI et al., 2009). No presente estudo, além das éguas não terem sido previamente tratadas com o hCG na mesma estação de monta, apenas um ciclo estral por égua foi avaliado, razão pela qual não se observou o efeito de seguidas aplicações de hCG.

Nos grupos tratados com uma associação entre o hCG e o DES, nas doses recomendadas ou em subdoses, 93,33% das éguas (28/30) ovularam entre 24 e 48 horas após a indução, em comparação à taxa de ovulação verificada nos grupos supracitados (de 76,67% a 83,33%), no controle (20,00%) e no que se administrou 10,0 mg de ECP (25,00%). Estes resultados estão em acordo com os observados por Uliani (2012), que verificaram a ocorrência de uma ovulação após 36 a 38 horas nas éguas medicadas com essa combinação hormonal. A taxa de ovulação obtida, numericamente superior, pode ser decorrente do suposto estímulo à maturação folicular do uso associado destes indutores, cujo emprego é preconizado para éguas doadoras de oócitos (CARNEVALE et al., 2005). Na espécie humana, foi demonstrado que as mulheres tratadas com ambos os hormônios doaram oócitos capazes de originar embriões de melhor qualidade *in vitro* (DECLEER et al., 2014).

Estudos recentes também conferem indícios dos benefícios desta associação na espécie equina. Uliani (2012) observou maior diferença numérica no aumento de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório entre o momento da indução e as oito horas que precederam a ovulação das éguas tratadas com a associação hormonal (1.500 UI de hCG e 1,0 mg de DES), de $22,22 \pm 2,07\%$ para $45,00 \pm 4,08\%$, em comparação às induzidas com hCG, de $30,00 \pm 3,65\%$ para $40,83 \pm 6,45\%$ e com DES, de $23,33 \pm 2,22\%$ para $37,14 \pm 3,02\%$. É possível que o pequeno número de animais em seu experimento tenha prejudicado a comparação do grupo que recebeu ambos os hormônios, em relação aos demais. Ao avaliar o perfil protéico do líquido folicular pré-ovulatório, Santos (2013) verificou nas éguas que receberam 1.000 UI de hCG o valor de $63,97 \pm 6,97$ mg/mL de proteína, contra $73,07 \pm 6,42$ das tratadas com este hormônio e 1,0 mg de DES.

A existência de potenciais benefícios associados ao emprego desta associação pode ser justificada por uma série de estudos anteriores. Tanto o hCG quanto o DES possuem seu mecanismo de ação em torno do hormônio

luteinizante (LH). Enquanto o hCG mimetiza suas ações, o DES estimula sua liberação pela pituitária. Experimentos com biologia molecular verificaram em vacas (NOGUEIRA et al., 2007), ovelhas (ABDENNEBI et al., 2002), éguas (SAINT-DIZIER et al., 2004) e mulheres (MÜLLER et al., 2003) diferentes isoformas de receptores para LH, os quais possuem distinta afinidade pelas moléculas de hCG e de LH endógeno humano. Ainda, apesar do LH e do hCG apresentarem um receptor comum, estes hormônios ativam, no meio intracelular, uma série de diferentes reações bioquímicas (CASARINI et al., 2012). Em folículos caprinos *in vitro*, Gupta et al. (2012) observaram que as células da granulosa respondem com crescimento e proliferação celular ao tratamento prolongado com o LH, ao passo que a mesma exposição ao hCG reduz sua taxa de multiplicação e aumenta as concentrações intracelulares de AMPc. A diferença de afinidade destes receptores, a existência de variadas isoformas, bem como a maneira como este receptor é capaz de identificar o seu ligante (CHOI e SMITZ, 2014) podem ser responsáveis pelas diferenças de efeito quando da sua utilização.

Já Gomes et al. (2014) não detectaram vantagem do emprego em conjunto do hCG e do DES. Uma possível explicação para esta discrepância de resultados é a baixa taxa de sincronização de ovulação verificada neste último trabalho, em especial com o hCG, de 60,00%, contra 68,79% com o DES e 72,97% com sua associação. Apesar do expressivo número de ciclos e animais envolvidos em seu experimento, os resultados obtidos com o hCG sofreram, provavelmente, influência negativa, pelo fato das éguas terem sido tratadas por mais de um ciclo estral com esta gonadotrofina. Novos estudos controlados, em especial com ensaio de fertilidade, são necessários para que se detecte o possível benefício do uso combinado do hCG e do DES em eqüinos.

O grupo tratado com 10,0 mg de ECP obteve taxa de ovulação de somente 25,00% entre 24 e 48 horas, similar à verificada no grupo controle de 20,00% e inferior ($P < 0,05$) à dos demais grupos. Estes resultados indicam que o ECP não foi capaz de induzir e sincronizar as ovulações de forma eficaz na espécie eqüina. Isto se contrapõe ao observado em éguas por Segismundo et al. (2003). Estes autores constataram a ocorrência de uma ovulação em 83,33% dos animais até 72 horas da aplicação, contra 45,00% do presente estudo, taxa esta correspondente à soma das ovulações identificadas após 24 (10,00%), 48

(25,00%) e 72 horas (10,00%). Na espécie bovina, tanto o benzoato de estradiol (BARROS et al., 2000; SALES et al., 2012; EDWARDS et al., 2015) quanto o ECP (AMBROSE et al., 2005; SALES et al., 2012) são rotineiramente utilizados a fim de estimular e antecipar a ocorrência de picos de LH, os quais são identificados, respectivamente, por volta de 50 (COLAZO et al., 2003; SALES et al., 2012) e 20 horas (MARTINEZ et al., 2007; SALES et al., 2012) após sua administração.

O tratamento com ECP estimulou o desenvolvimento de folículos anovulatórios em 25,00% (5/20) das éguas. Estes folículos sofreram atresia, com redução gradativa em seu diâmetro. Sabe-se que as células da granulosa de folículos atrésicos sofrem apoptose (HUGHES e GOROSPE, 1991; RAJAKOSKI, 1996; YU et al., 2004), em resposta às menores concentrações de IGF-1 no fluido folicular (YIN et al., 1998). Estas podem ser decorrentes de estímulo insuficiente do FSH (CHECURA et al., 2010) e do LH (ACOSTA et al., 2004; SCHAUER et al., 2013), razão pela qual são mais observadas durante o outono, com incidência relatada de 23%, contra 5 a 8% na primavera (WEEDMAN et al., 1993; GASTAL et al., 1998). Apesar das concentrações circulantes de FSH não terem sido determinadas no presente estudo, o “feedback” negativo exercido pelo estrógeno sobre esta gonadotrofina já é conhecido (MEDAN et al., 2004). Todavia, a égua apresenta concentrações circulantes de FSH mínimas quando da presença de um folículo pré-ovulatório no estro (GINTHER, 2000). Por outro lado, nas éguas tratadas com ECP que não ovularam, observou-se uma redução numérica progressiva nas concentrações plasmáticas de LH. O estudo de Ginther et al. (2006) suporta esta associação entre o estrógeno e a anovulação, pois as éguas desenvolvendo folículos anovulatórios apresentaram maiores concentrações de estradiol a partir do quarto dia antes do seu surgimento. Squires e McCue (2007) afirmaram que as éguas superovuladas com o FSH equino apresentaram uma incidência considerável de folículos anovulatórios. Isto se deve, possivelmente, às maiores concentrações plasmáticas de estradiol verificadas durante o estro das éguas com múltiplos folículos dominantes (GINTHER et al., 2008a; MACHADO et al., 2008; RAZ et al., 2009), o qual exerce efeito negativo sobre os níveis circulantes de LH antes (MACHADO et al., 2008) e imediatamente após a ovulação (GINTHER et al., 2008a).

A falta de efeito positivo da administração de estrógeno sobre as concentrações plasmáticas de LH já foi demonstrado, tanto durante o desvio

folicular (DONADEU e GINTHER, 2002) quanto no estro (GINTHER et al., 2007a), o que se contrapõe a resultados de estudos anteriores (GARCIA e GINTHER, 1978; BURNS e DOUGLAS, 1981; THOMPSON et al., 1991). Neste último experimento, a aplicação de estradiol aumentou as reservas de LH na adenohipófise, bem como sua liberação frente a estímulo com GnRH. Corroborando com estes resultados, Sharp et al. (2001) detectaram que, nas éguas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, houve um aumento na expressão do RNA mensageiro que transcreve as subunidades de LH na pituitária. Conforme Ginther et al. (2007a), o efeito positivo da aplicação de estrógeno sobre o LH observado nestes últimos trabalhos pode ter sido resultado do uso de doses suprafisiológicas. Contudo, a dose empregada no presente estudo, de 10,0 mg, é 20 vezes maior do que a utilizada para a indução de ovulação da espécie bovina, de apenas 0,5 mg (AMBROSE et al., 2005; SALES et al., 2012). Da mesma forma, Mumford et al. (1994) verificaram que a administração diária de somente 1,0 mg de 17- β estradiol às éguas transicionais, durante oito dias consecutivos, não incrementou suas concentrações circulantes de LH, as quais foram similares às do grupo controle.

Esta capacidade do estrógeno de exercer tanto efeito positivo quanto negativo sobre a síntese de LH já foi demonstrada em vacas (MARTINEZ et al., 2007), ratas (LINDZEY et al. 2006), mulheres (SHAW et al., 2010) e éguas (MILLER et al., 1981). Quando da aplicação de uma única injeção de estradiol, estes autores observaram queda na concentração plasmática de LH três horas depois, a qual foi seguida de aumento acima das concentrações pré-tratamento entre oito e 12 horas. Os resultados do presente estudo indicam a ocorrência de um efeito semelhante, porém mais tardio, já que o incremento nas concentrações circulantes de LH, de 22,6% no Momento 24 (M24), se elevou para 72,8% no M48. Estas diferenças temporais entre ambos os experimentos podem ser decorrentes do emprego de doses e de produtos distintos (1,0 mg de estradiol contra 10,0 mg de ECP). Pelo fato do LH equino apresentar longa meia-vida, de três a cinco horas (IRVINE, 1979), uma venopunção jugular diária é considerada como adequada para determinar as concentrações plasmáticas de LH (IRVINE et al., 1998). Todavia, esta metodologia implica, provavelmente, na não detecção de pequenas mudanças no perfil endócrino de LH após a aplicação do ECP.

É improvável que o aumento nas concentrações circulantes de LH no presente trabalho tenha ocorrido em resposta à metabolização e eliminação do estrógeno administrado, já que, em vacas, a aplicação de 10,0 mg de ECP eleva as concentrações deste hormônio acima das observadas no estro por 170 ± 17 horas (VYNCKIER et al., 1990). Os dados supracitados permitem que se postule que, em ambas as espécies, o acréscimo nas concentrações de LH observado após a administração de produtos à base de estrógeno ocorra após uma inibição inicial e transitória em sua liberação. Por esta razão, talvez seja possível sincronizar e induzir a ovulação na égua de forma eficaz com a aplicação de ECP na presença de folículos de diâmetros inferiores ao pré-ovulatório, após a divergência folicular, quando o folículo dominante já é refratário à redução dos níveis plasmáticos de FSH (FORTUNE, 1994).

Todavia, diferenças na fisiologia de ambas as espécies podem ser responsáveis pelos distintos efeitos obtidos, já que na vaca a ovulação é estimulada pela ocorrência de um pico de LH (SAUMANDE e HUMBLLOT, 2005), enquanto que na égua sua curva é prolongada, recebendo a denominação de “plateau”, iniciando-se seis a sete dias antes da ovulação (WHITMORE et al., 1973). É possível que, após a aplicação de estrógeno, a redução transitória nas concentrações circulantes de LH prejudique o desenvolvimento e a maturação folicular, pré-dispondo ao surgimento de folículos hemorrágicos anovulatórios. ACOSTA et al. (2004) demonstraram que o folículo dominante fadado a se tornar anovulatório cresce em um ambiente deficiente em LH, razão pela qual este é carente em fatores no fluido folicular, como estradiol, IGF-1 e fatores de crescimento endotelial vascular.

Os grupos induzidos com diferentes doses do acetato de deslorelina, associado ou não, apresentaram maior incremento ($P < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de LH no M24, em relação aos demais grupos. O DES leva à liberação imediata de LH, detectável passados trinta minutos de sua aplicação (INGWERSON, 2007). Seu valor máximo é verificado sete a oito horas depois (DONADEU, 1997; BOAKARI, 2014), declinando a partir da décima oitava hora de tratamento (BOAKARI, 2014). O nível de LH das éguas induzidas com 1,0 mg do acetato de deslorelina no M24, de 10,71 ng/mL, foi próximo ao obtido por BOAKARI (2014), de 13,92 ng/mL. Os valores encontrados no presente experimento no M24 são, provavelmente, inferiores às concentrações que seriam

observadas oito horas após injeção. Mesmo diante disto, o incremento identificado no M24 nos grupos tratados com o DES foi superior ao dos indivíduos medicados somente com o hCG, o qual estimula um pico endógeno de LH a partir de 24 horas de sua aplicação (GINTHER et al., 2009a). A análise destes resultados nos permite postular que a liberação de LH promovida pelo hCG é muito menos exuberante e precoce que a promovida pelo DES. Da mesma forma, a adição do hCG ao tratamento com DES não promoveu um incremento nas concentrações circulantes de LH, seja nas doses preconizadas ou em subdoses.

No M48, os grupos tratados com subdoses do DES, de hCG ou de ambos, apresentaram maior incremento ($P < 0,05$) na concentração de LH em relação aos grupos medicados com a dose preconizada destes indutores. Uma possível explicação para este achado é a de que as doses recomendadas destes hormônios sejam suprafisiológicas, estimulando de forma exacerbada seus receptores. Isto pode levar à ocorrência do fenômeno de “down-regulation”, tal qual ocorre em éguas (VANDERWALL et al., 2001; McCUE et al., 2002; HENDERSON et al., 2012) e cadelas (TRIGG et al., 2001) hiper-estimuladas com o acetato de deslorelina. Em seu experimento, Padula et al. (2002) observaram situação semelhante, ao aplicarem diferentes doses de DES a vacas ovariectomizadas. Estes autores identificaram que, apesar de todas as doses testadas terem estimulado um aumento nas concentrações circulantes de LH com uma hora de aplicação, somente a maior dose, de 1,0 mg, levou a uma redução temporária destes níveis após 48 horas, além de uma menor amplitude de pulso. No caso do hCG, são necessários estudos comparando o efeito da aplicação de diferentes doses desta gonadotrofina sobre as concentrações circulantes de estradiol e de progesterona, as quais influenciam as concentrações plasmáticas de LH.

Os resultados supracitados indicam que as subdoses utilizadas neste estudo, além de diminuir o custo, podem favorecer os índices de fertilidade, já que o LH apresenta efeito luteotrófico e suas maiores concentrações podem estimular a produção de progesterona ou, até mesmo, de progestágenos (KÖHNE et al., 2014). Este fenômeno de “down-regulation” na indução de ovulação, entretanto, parece ser reversível e de curta duração, já que se observou em todos os grupos um pico nas concentrações plasmáticas de LH no D1 ou no D2, em acordo com dados obtidos por Whitmore et al. (1973) para éguas não induzidas.

Da mesma forma, os valores similares de LH ($P>0,05$) identificados entre o Momento 0 e o D5 demonstram o que já foi relatado anteriormente, que suas concentrações atingem níveis mais baixos após cinco dias da ovulação, em decorrência do “feedback” negativo da progesterona lútea (GINTHER, 1992).

O maior grau de edema endometrial observado no G4 (750 UI de hCG) antes do início do tratamento (Momento 0) deve-se, provavelmente, ao acaso, já que os animais foram designados aos diferentes grupos de forma randômica. Todavia, este dado não interferiu nos resultados dos momentos subsequentes, pois se detectou no M24 maior valor numérico de edema endometrial no GC, acima ($P<0,05$) do próprio G4 e também do G2 (0,5 mg de DES), G3 (2.000 UI de hCG) e G5 (1,0 mg de DES e 2.000 UI de hCG). Este comportamento se repetiu no Momento 48, porém de maneira mais evidente, quando o GC demonstrou-se superior ($P<0,05$) aos demais nesta variável. Pelo fato do edema endometrial ser dependente dos níveis circulantes de estrógenos (CHAVATTE e PALMER, 1998), os dados do presente estudo estão em acordo com trabalhos anteriores, que demonstraram como a indução com 2.500 UI (I.V.) de hCG estimula um declínio nas concentrações circulantes de estradiol (SILVA et al., 2006; GASTAL et al., 2006a; GINTHER et al., 2009a). Utilizando 3.000 UI desta gonadotrofina, Dolezel et al. (2012) observaram situação semelhante, com decréscimo no grau de edema endometrial imediatamente pós-indução. Desta forma, a queda no grau de edema endometrial observada 24 horas após a indução com hCG e/ou DES pode servir como parâmetro de que a égua tratada irá responder à indução de ovulação da forma esperada.

Situação inversa ocorreu um dia antes da ovulação (D-1), quando o GC apresentou o menor valor no grau de edema endometrial, diferindo ($P<0,05$) do G1 (1,0 mg de DES), G2 (0,5 mg de DES) e G6 (750 UI de hCG e 0,5 mg de DES). Este comportamento do GC repetiu-se de maneira mais expressiva no dia da ovulação (D0), com valores inferiores ($P<0,05$) aos demais. Os resultados deste experimento estão em concordância com os obtidos por Cuervo-Arango e Newcombe (2008). Estes autores observaram que as éguas cuja ovulação foi induzida com 1.500 UI de hCG pela via sub-cutânea ou 2,1 mg do acetato de deslorelina sob forma de implante apresentaram valores numéricos superiores no grau de edema endometrial 24, 16 e oito horas precedendo a ovulação e no momento de sua detecção. Sabe-se que a intensidade de edema endometrial

diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (HAYES et al., 1985) e que esta queda parece ocorrer por estímulo estrogênico à expressão de receptores endometriais de progesterona (PELEHACH et al., 2000), os quais se ligam à progesterona de fonte intrafolicular, decorrente da luteinização precoce (BELIN et al., 2000). Apesar de já ter sido demonstrado que o hCG estimula a mudança no padrão esteroidogênico folicular de estrógeno para progesterona (PINTO et al., 2003), é possível que o maior grau de edema endometrial observado à ovulação nos animais tratados com esta gonadotrofina e/ou com o DES seja decorrente do tempo insuficiente para que este se dissipasse, frente à antecipação do processo ovulatório pós-indução.

No Momento 0, o grupo controle apresentou os menores valores numéricos do diâmetro folicular, os quais diferiram ($P < 0,05$) do G5 e G6. Isto ocorreu muito provavelmente por uma eventualidade, já que as éguas foram designadas aos diferentes grupos de maneira aleatória, quando do surgimento de um folículo ≥ 30 mm no dia anterior. No Momento 24, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos tanto no diâmetro quanto na taxa de crescimento folicular, apesar desta ter sido numericamente superior no GC, de 3,05 mm contra 2,32 a 2,84 mm nos demais. A taxa de desenvolvimento folicular obtida no grupo controle está em acordo com a verificada por diversos autores, como Pierson (1993), que observou um crescimento de 2,5 mm por dia a partir do sexto dia antes da ovulação e Ginther et al. (2009b), que identificaram nas éguas de idade intermediária o desenvolvimento de 4,1 mm por dia entre cinco e dois dias antes da ovulação, o qual diminuiu para 2,0 mm nos dois dias que a precederam.

O contínuo crescimento dos folículos induzidos está em desacordo com os resultados obtidos por Gastal et al. (2006a; 2006b), os quais afirmaram que 2.500 e 1.500 UI de hCG interrompem sua taxa de desenvolvimento. Por outro lado, os dados do presente estudo assemelham-se aos de Silva et al. (2006), que observaram que 66,66% das éguas apresentaram desenvolvimento folicular maior que 1,0 mm após 30 horas da indução com o hCG. Ao avaliarmos o Momento 24 das éguas que ovularam com o tratamento, situação semelhante foi verificada nas induzidas com 2.000 UI (G3) e 750 UI de hCG (G4), nas quais houve crescimento folicular maior que 1,0 mm em 68,96% (20/29) e 80,00% (24/30) dos animais, respectivamente. Nos demais grupos, esta porcentagem foi de, respectivamente, 88,89% (G1), 96,43% (G2), 93,33% (G5) e 80,00% (G6).

Um dia antes da ovulação (D-1), o grupo controle apresentou diâmetro folicular superior ($P<0,05$) aos tratados com hCG e/ou DES. Ao antecipar a ovulação, as éguas induzidas o fizeram de folículos pré-ovulatórios menores. Situação semelhante foi demonstrada com o hCG (GASTAL et al., 2006a; 2006b; CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE 2008) e o DES (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE 2008).

No Momento 24, o tamanho médio e a taxa de crescimento do folículo dominante das éguas tratadas com 2.000 UI de hCG demonstraram uma tendência à correlação ($P=0,09$) com a fertilidade. Estes dados estão em acordo com os de Silva et al. (2006), os quais observaram que as éguas cujos folículos aumentaram mais do que 1,0 mm pós-indução apresentaram maior probabilidade de se tornarem gestantes após monta natural. Apesar da influência do diâmetro folicular sobre a taxa de concepção ainda ter sido pouco estudada em éguas, esta correlação já foi demonstrada em vacas (SÁ FILHO et al., 2010). Sabe-se que durante o desenvolvimento folicular na espécie bovina, o oócito aumenta a quantidade de síntese e armazenamento de proteínas e de RNA mensageiro (BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001), tornando-se mais competente conforme este diâmetro progride (ARLOTTO et al., 1996; HAGEMANN et al., 1999). Apesar da ocorrência de ovulação após a indução ter sido associada, na égua, à maturidade folicular e oocitária (SILVA et al., 2006; COX et al., 2009), é possível que um diâmetro folicular superior confira mais tempo para que o oócito acumule estes fatores necessários a sua sobrevivência. Estes resultados conferem ao prático a capacidade de estimar a probabilidade de um determinado folículo resultar ou não em gestação, permitindo-o trabalhar de forma mais precisa conforme o crescimento folicular pós-indução, adaptando o intervalo entre a inseminação e a ovulação e/ou trabalhando com sêmen de qualidade distinta.

Nos animais induzidos com 2.000 UI de hCG (G3), tanto o grau máximo observado de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade ($P>0,05$). Estes resultados estão em acordo com os obtidos por Squires et al. (2014). Todavia, é importante ressaltar que apenas éguas sem anormalidades reprodutivas detectadas à ultrassonografia participaram do presente estudo, já que o edema endometrial excessivo está associado à endometrite subclínica (LEBLANC e CAUSEY, 2009; SAMPER, 2010), a qual compromete os índices de fertilidade.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através do presente trabalho nos permitiram concluir que:

- a) Os diferentes protocolos propostos com a gonadotrofina coriônica humana e/ou o acetato de deslorelina induziram e sincronizaram a ovulação de forma eficaz, estimulando sua ocorrência de folículos pré-ovulatórios menores;
- b) O acetato de deslorelina estimulou maior liberação do hormônio luteinizante que a gonadotrofina coriônica humana após 24 horas;
- c) A adição da gonadotrofina coriônica humana ao tratamento com o acetato de deslorelina não promoveu um incremento nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante, seja nas doses preconizadas ou em subdoses;
- d) O tratamento com cipionato de estradiol não resultou em aumento nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante, tendo inibido sua liberação em alguns animais, pré-dispondo ao surgimento de folículos anovulatórios e atresia folicular;
- e) O uso de subdoses da gonadotrofina coriônica humana e do acetato de deslorelina levaram a um maior incremento nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante após 48 horas, por um provável mecanismo de “down-regulation” que ocorre após o uso das doses recomendadas destes hormônios;
- f) Os tratamentos com a gonadotrofina coriônica humana e/ou o acetato de deslorelina não impediram o desenvolvimento folicular ou reduziram o diâmetro folicular após 24 horas;
- g) A indução de ovulação levou a uma redução no grau de edema endometrial após 24 horas; o qual persistiu à ovulação;

h) O grau máximo de edema endometrial, bem como seu escore à detecção da ovulação não influenciaram a fertilidade pós-indução com 2.000 UI de gonadotrofina coriônica humana;

i) O tamanho e a taxa de desenvolvimento folicular pós-indução com 2.000 UI de gonadotrofina coriônica humana tenderam a uma correlação positiva com a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial.

3. REFERÊNCIAS

ABDENNEBI, L.; LESPORT, A.S.; REMY, J.J.; GREBERT, D.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D.; SALESSE, R. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. **Reproduction**, v. 123, p. 819-826, 2002.

ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 637-642, 2004.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992.

ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. Secretion rates and short-term patterns of gonadotrophin-releasing hormone, FSH and LH throughout the periovulatory period in the mare. **Journal of Endocrinology**, v. 114, p. 351-362, 1987.

ALLEN, W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 40, p. 310-329, 2005.

ALONSO, M.A. **Efeitos da aplicação de hCG em diferentes dias do ciclo estral sobre a concentração sérica de progesterona e fluxo sanguíneo uterino e ovariano em éguas**. 2013. 179f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

AMBROSE, J.D.; KASTELIC, J.P.; RAJAMAHENDRAN, R.; AALI, M.; DINN, N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 64, p. 1457–1474, 2005.

ARAUJO, G.H.M.; DUTRA, F.O.; CARMO, M.T.; OBA, E.; ALVARENGA, M.A. Efeito da indução da ovulação com gonadotrofina coriônica humana nos níveis plasmáticos de progesterona em éguas na fase inicial do diestro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supl. 1), p. 197, 2005.

ARBEITER, K.; ARBEITER E. Alfaprostol for induction of ovulation during estrus in the mare. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 8, p. 87-88, 1985.

ARMSTRONG, D.T.; BLACK, D.L. Influence of luteinizing hormone in corpus luteum metabolism and progesterone biosynthesis through the bovine estrous cycle. **Endocrinology**, v. 78, p. 937-944, 1966.

AURICH, C. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 220-228, 2011.

AVANZI, B.R.; RAMOS, R.S.; ARAÚJO, G.H.; FIORATTI, E.G.; TRINCA, L.A.; DELL'AQUA Jr, J.A.; MELO-OÑA, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? **Theriogenology**, v. 83, p. 1389-1393, 2015.

AZEVEDO, M.V. **Indução de múltiplas ovulações utilizando baixa dose de GnRH (deslorelina) em éguas**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BACK, D.G.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SEIDEL, G.E. Observations on the sexual behavior of nonlactating mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, p. 717-720, 1974.

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v. 2, p. 404-410, 2000.

BARRIER-BATTUT, I.; LE POUTRE, N.; TROCHERIE, E.; HECHT, S.; GRANDCHAMP DES RAUX, A.; NICAISE, J.L.; VÉRIN, X.; BERTRAND, J.; FIÉNI, F.; HOIER, R.; RENAULT, A.; EGRON, L.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J.F. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. **Theriogenology**, v. 55, p. 1679-1695, 2001.

BARROS, C.M; MOREIRA, M.B.P.; FIGUEIREDO, R.A.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BEAL, J. **Indução da ovulação em éguas crioulas com diferentes doses de gonadotropina coriônica humana**. 2008. 38f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

BECKER, S.E; JOHNSON, A.L. Effects of gonadotropin-releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1208-1215, 1992.

BELIN, F.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1335-1343, 2000.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mare. **Theriogenology**, v. 26, p. 733-747, 1986.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationships between circulating concentrations of FSH and follicular waves during early pregnancy in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 12, p. 274-279, 1992.

BERTOLDI, A.; SEGABINAZZI, L.G.; SILVA, L.F.M.C.; ARAÚJO, E.A.B.; OLIVEIRA, I.N.; FREITAS, G.L.; ANDRADE JR, L.R.P.; HARTWIG, F.P.; CARNEIRO, J.A.M.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; OBA, E. Efeito da associação de dois indutores de ovulação sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas. In: XVI Conferência Anual ABRAVEQ, 2015. Proceedings...

BLISS, S.P.; NAVRATIL, A.M.; XIE, J.; ROBERSON, M.S. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p. 322-340, 2010.

BOAKARI, Y.L. **Efeito da hCG ou deslorelina sobre a hemodinâmica folicular e perfil endógeno de LH em éguas cíclicas**. 2014. 62f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

BOUSFIELD, G.R.; LIU, W.K.; SUGINO, H.; WARD, D.N. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine lutropin beta-subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 8610-8620, 1987.

BRIANT, C.; OTTOGALLI, M.; GUILLAUME, D. Attempt to control the day of ovulation in cycling pony mares by associating a GnRH antagonist with hCG. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 165-178, 2004.

BROWN-DOUGLAS, C.G.; FIRTH, E.C.; PARKINSON, T.J.; FENNESSY, P.F. LH and testosterone responses to five doses of a GnRH analogue (buserelin acetate) in 12-month-old Thoroughbred colts. **Theriogenology**, v. 61, p. 1051-1060, 2004.

BURNS, P.J.; DOUGLAS, R.H. Effects of daily administration of estradiol-17 β on follicular growth, ovulation, and plasma hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 1026-1031, 1981.

CANISSO, I.F.; BELTAIRE, K.A.; BEDFORD-GUAUS, S.J. Premature luteal regression in a pregnant mare and subsequent pregnancy maintenance with the use of oral altrenogest. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, p. 97-100, 2013.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; ALVARENGA, M.A. Incidence of multiple ovulations in Brazilian jumping horse mares and its implications in an embryo transfer programme. In: 15TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION – ICAR, 2004. Proceedings...

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 519-527, 2005.

CARNEVALE, E.M.; ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCILO DI BRIENZA, V. How to collect and vitrify equine embryos for direct transfer. **AAEP Proceedings**, v. 50, p. 402-405, 2004.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 965-979, 2000.

CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; HARRISON, L.A. Effect of human chorionic gonadotropin on time to ovulation and luteal function in transitional mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, p. 27-29, 1989.

CASARINI, L.; LISPI, M.; LONGOBARDI, S.; MILOSA, F.; LA MARCA, A.; TAGLIASACCHI, D.; PIGNATTI, E.; SIMONI, M. LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different Intracellular Signalling. **Plos One** v. 7, e46682, 2012.

CEPEA. **PERSPECTIVAS PARA O AGRONEGÓCIO EM 2015**. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_Perspectivas%20Agroneg2015_relatorio.pdf>. Acesso em: 05 de Maio de 2016.

CHECURA, C.M.; BEG, M.A.; PARRISH, J.J.; GINTHER, O.J. Positive effect of FSH but not LH on early development of the dominant follicle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1092-1099, 2010.

CHOI, J.; SMITZ, J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 383, p. 203-213, 2014.

CLAYTON, H.M.; LINDSAY, F.E.F.; FORBES, A.C.; HAY, L.A. Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. **Applied Animal Ethology**, v. 7, p. 169-174, 1981.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects on estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based fixed time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-865, 2003.

COLE, L.A. hCG, the wonder of today's science. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10:24, 2012.

CONCANNON, P.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 604-613, 1977.

COY, D.H.; SCHALLY, A.V. Gonadotrophin releasing hormone analogues. **Annals of Clinical Research**, v. 10, p. 139-144, 1978.

CRISTIAN, C.A.; GLIDEWELL-KENNEY, C.; JAMESON, J.L.; MOENTER, S.M. Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. **Endocrinology**, v. 149, p. 5328-5334, 2008.

CROWELL-DAVIS, S. SL. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, v. 52, p. 12-17, 2007.

CUERVO-ARANGO, J.; CLARK, A. The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 265-269, 2010.

CUERVO-ARANGO, J.; DOMINGO-ORTIZ, R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. **Theriogenology**, v. 75, p. 707-714, 2011.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J.R. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. **Theriogenology**, v. 69, p. 681-687, 2008.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J.R. The effect of hormone treatments (hCG and cloprostenol) and season on the incidence of hemorrhagic anovulatory follicles in the mare: a field study. **Theriogenology**, v. 72, p. 1262-1267, 2009.

DAVIES MOREL, M.C.G.; NEWCOMBE, J.R. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 189-199, 2008.

DE RENSIS, F.; VALENTINI, R.; GORRIERI, F.; BOTTARELI, E.; LOPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 69, p. 1077-1082, 2008.

DECLEER, W.; OSMANAGAOGLU, K.; SEYNHAVE, B.; KOLIBIANAKIS, S.; TARLATZIS, B.; DEVROEY, P. Comparison of hCG triggering versus hCG in combination with a GnRH agonist: a prospective randomized controlled trial. **Facts, Views & Vision in Obgyn**, v. 6, p. 203-209, 2014.

DONADEU, F.X. **Evaluation of Deslorelin during the breeding season and of sulpiride during seasonal anestrus for induction of ovulation in mares**. 1997. Dissertação (Mestrado) - School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge.

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

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin, and estradiol during the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v. 124, p. 875-885, 2002.

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Interactions of follicular factors and season in the regulation of circulating concentrations of gonadotrophins in mares. **Reproduction**, v. 125, p. 743-750, 2003.

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Interrelationships of estradiol, inhibin, and gonadotrophins during follicle deviation in pony mares. **Theriogenology**, v. 61, p. 1395-1405, 2004.

DONALDSON, L.; HANSEL, W. Histological study of bovine corpora lutea. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 905-909, 1965.

DU, B.; TAKAHASHI, K.; ISHIDA, G.M.; NAKAHARA, K.; SAITO, H.; KURACHI, H. Usefulness of intraovarian artery pulsatility and resistance indices measurement on the day of follicle aspiration for the assessment of oocyte quality. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 366-370, 2006.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 221-228, 1987.

EDWARDS, S.A.; BOE-HANSEN, G.B.; SATAKE, N.; CHANDRA, K.; MCGOWAN, M.R. A field investigation of a modified intravaginal progesterone releasing device and oestradiol benzoate based ovulation synchronisation protocol designed for fixed-time artificial insemination of Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p.105-111, 2015.

EVANS, M.J.; GASTAL, E.L.; SILVA, L.A.; GASTAL, M.O.; KITSON, N.E.; ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotropin to estrous mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 191-194, 2006.

ESTELLER-VICO, A.; LIU, L.K.; VAUGHAN, B.; STEFFEY, E.P.; BROSNAN, R.J. Effects of estradiol on uterine perfusion in anesthetized cyclic mares affected with uterine vascular elastosis. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p.57-63, 2016.

FAHIMINIYA, S.; LABAS, V.; ROCHE, S.; DACHEUX, J.; GÉRARD, N. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. **Proteome Science**, v. 9:54, 2011.

FARIA, D.R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 114-122, 2010.

FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, R.G.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Efficacy of deslorelin acetate (sucromate) on induction of ovulation in american quarter horse mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 1-4, 2011.

FERRIS, R.; MCCUE, P. The effects of dexamethasone and prednisolone on pituitary and ovarian function in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 438-443, 2010.

FITZGERALD, B.P.; PANSON, H.; LEGAN, S.J.; LOY, R.G. Changes in patterns of luteinizing hormone secretion before and after the first ovulation in the postpartum mare. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 316-323, 1985.

FLEURY, P.D.C. **Taxa de prenhez e concentrações plasmáticas de progesterona em éguas receptoras de embrião submetidas a diferentes tratamentos hormonais no dia da inovulação**. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; ALVARENGA, M.A.; DOUGLAS, R.H. Intervals to ovulation after treatment with oestradiol cypionate (ECP) or biorelease deslorelin (BRT-DES). **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 14, p. 89, 2004.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

GALET, C.; CHOPINEAU, M.; MARTINAT, N.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. Expression of an in vitro biologically active equine LH/CG without C-terminal peptide (CTP) and/or -disulphide bridge. **Journal of Endocrinology**, v. 167, p. 117-124, 2000.

GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 1581-1584, 1975.

GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Regulation of plasma LH by estradiol and progesterone in ovariectomized mares. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 447-453, 1978.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; DONADEU, F.X.; ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 314-321, 2007.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, v. 50, p. 1025-1038, 1998.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v. 131, p. 699–709, 2006a.

GASTAL, E.L.; SILVA, L.A.; GASTAL, M.O.; EVANS, M.J. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 186-190, 2006b.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied aspects**. 2.ed. Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, 1992, 642p.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, p. 379-388, 2005a.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311-317, 2009a.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 45-63, 2004.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 119-126, 1990.

GINTHER, O.J.; FIRST, N.L. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, p. 1687-1691, 1971.

GINTHER, O.J.; GARCIA, M.C.; BERGFELT, D.R.; LEITH, G.S.; SCRABA, S.T. Embryonic loss in mares: pregnancy rate, length of interovulatory intervals, and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. **Theriogenology**, v. 24, p. 409-17, 1985.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 315-323, 2005b.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 130-139, 2007b.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; RODRIGUES, B.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. **Theriogenology**, v. 69, p. 583-590, 2008a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v. 71, p. 780-788, 2009b.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Induction of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 947-954, 2008b.

GINTHER, O.J.; GRIFFIN, P.G. Natural outcome and ultrasonic identification of equine fetal twins. **Theriogenology**, v. 41, p. 1193-1199, 1994.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 543-550, 2007a.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships between progesterone/LH and estradiol/LH during the equine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 144-150, 2006.

GINTHER, O.J.; WHITMORE, H.L.; SQUIRES, E.L. Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects of season and nursing. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 1935-1939, 1972.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GOMES, R.G.; OLIVEIRA, R.L.; SCHUTZER, C.G.C.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M. Effect of deslorelin and/or human chorionic gonadotropin on inducing ovulation in mares during the transition period versus ovulatory season. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1140-1142, 2014.

GOMEZ-BRUNET, A.G.; SANTIAGO-MORENO, J.; MONTORO, V.; GARDE, J.; PONS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced manchega ewes treated with hCG at the time of AI. **Small Ruminant Research**, v. 71, p. 117-122, 2007.

GRECO, G.M.; DELL'AQUA, J.A.; ALVARENGA, M.A. Evaluation of novel protocols for ovulation induction in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 475-476, 2012.

GRECO, G.M.; FIORATTI, E.G.; SEGABINAZZI, L.G.; DELL'AQUA JR, J.A.; CRESPILO, A.M.; CASTRO-CHAVES, M.M.B.; ALVARENGA, M.A. Novel long-acting progesterone protocols used to successfully synchronize donor and recipient mares with satisfactory pregnancy and pregnancy loss rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.39, p.58-61, 2015.

GRECO, G.M.; OLIVEIRA, G.D.M.; PINNA, A.E.; PINHO, T.G.; QUEIROZ, F.J.R. Incidência de múltiplas ovulações na raça Campolina e sua influência na recuperação embrionária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, (Suppl. 1), p. 190, 2005.

GUILLAUME, D. Action de la photopériode sur la reproduction des équidés. **INRA Productions Animales**, v. 9, p. 61-69, 1996.

GUPTA, C.; CHAPEKAR, T.; CHHABRA, Y.; SINGH, P.; SINHA, S.; LUTHRA, K. Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, p. 331-340, 2012.

GURGEL, J.R.C.; VIANA, C.H.C.; PEREZ, E.G.A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 122-132, 2008.

HAISENLEDER, D.J.; DALKIN, A.C.; ORTOLANO, G.A.; MARSHALL, J.C.; SHUPNIK, M.A. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. **Endocrinology**, v. 128, p. 509-517, 1991.

HALASZ, B.; KISS, J.; MOLNAR, J. Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: morphological aspects. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 33, p. 663-668, 1989.

HAMER, J.M.; TAYLOR, T.B.; EVANS, M.J.; GASON, L.M.; IRVINE, C.H.G. Effect of administration of estradiol and progesterone, and bacterial contamination, on endometrial morphology of acyclic mares. **Animal Reproduction Science**, v. 9, p. 317 – 322, 1985.

HAMILTON, S.A.; GARVERICK, H.A.; KEISLER, D.H.; XU, Z.Z.; LOOS, K.; YOUNGQUIST, R.S.; SALFEN, B.E. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 890-898, 1995.

HANDLER, J.; AURICH, J.E. Physiologie des Sexualzyklus der Stute. In: AURICH, C. **Reproduktionsmedizin beim Pferd**. Stuttgart: Parey Verlag, 2005. chap. 2, p. 15-30.

HANLON, D.W.; WILLIAMSON, N.B.; WITCHEL, J.J.; STEFFERT, I.J.; CRAIGIE, A.L.; PFEIFFER, D.U. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 47, p. 963-975, 1997.

HARRISON, L.A.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. Comparison of hCG, buserelin and luproliol for induction of ovulation in cycling mares. **Equine Veterinary Science**, v. 2, p. 163-166, 1991.

HARRISON, L.A.; SQUIRES, E.L.; NETT, T.M.; MCKINNON, A.O. Use of gonadotropin-releasing hormone for hastening ovulation in transitional mares. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 690-699, 1990.

HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T.; GINTHER, O.J. Effect of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, v. 24, p. 465-477, 1985.

HEDBERG, Y.; DALIN, A.N.; SANTESSON, M.; KINDAHL, H. A preliminary study on the induction of dioestrous ovulation in the mare--a possible method for inducing prolonged luteal phase. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48:12, 2006.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Successful timing of ovulation using deslorelin (ovuplant®) is labour-saving in mares aimed for single AI with frozen semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 535-537, 2006.

HENDERSON, I.S.; BRAMA, P.; OSBORNE, M.; BELTMAN, M.E. Interovulatory intervals in mares receiving deslorelin implants in Ireland (2009 to 2010). **Veterinary Record**, v. 170:541, 2012.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, R.M. Pregnancy in ovariectomised mares achieved by embryo transfer: A preliminary study. **Equine Veterinary Journal**, v. 17 (Suppl. 3), p. 74-75, 1985.

HOFFMANN, B.; SCHAMS, D.; BOPP, R.; ENDER, M.L.; GIMÉNEZ, T.; KARG, H. Luteotrophic factors in the cow: evidence for LH rather than prolactin. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 40, p. 77-85, 1974.

HUGHES, F.M.J.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, v. 129, p. 2415-2422, 1991.

HUGHES, J.P.; STABENFELD, G.H.; EVANS, J.W. Estrous cycle and ovulation in the mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 161, p. 1367-1374, 1972.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **PPM – Pesquisa Pecuária Municipal**, 2014 [online].

Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2>>. Acesso em: 05 de Maio de 2016.

INGWERSON, J.A. **Induction of ovulation and LH response in cyclic mares treated with gonadorelin diacetate tetrahydrate**. 2007. 45f. Dissertação (Mestrado) – College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames.

IRVINE, C.H.G. Kinetics of gonadotrophins in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 27, p. 131-141, 1979.

IRVINE, C.H.G.; ALEXANDER, S.L. The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. **Journal of Endocrinology**, v. 140, p. 283-295, 1994.

IRVINE, C.H.G.; TURNER, J.E.; ALEXANDER, S.L.; SHAND, N.; VAN NOORDT, S. Gonadotrophin profiles and dioestrous pulsatile release patterns in mares as determined by collection of jugular blood at 4 h intervals throughout an oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 315-322, 1998.

JABLONKA-SHARIFF, A.; ROSER, J.F.; BOUSFIELD, G.R.; WOLFE, M.W.; SIBLEY, L.E.; COLGIN, M.; BOIME, I. Expression and bioactivity of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH). **Theriogenology**, v. 67, p. 311-320, 2007. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 101-109, 2000.

JAMES, V.H.T.; MARTINI, L. Luteinizing Hormone and Human Chorionic Gonadotrophin: Structure and Activity. In: JUTISZ, M.; TERTRIN-CLARY, C. **Current Topics in Experimental Endocrinology**. Academic Press Inc, 1974, p. 195-246.

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

JOHNSON, C.A.; THOMPSON JR, D.L.; CARTMILL, J.A. Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2681-2687, 2002.

KARTEN, M.J.; RIVIER, J.E. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. **Endocrine Reviews**, v. 7, p. 44-66, 1986.

KELLY, C.M.; HOYER, P.B.; WISE, M.E. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 593-600, 1988.

KERBAN, A.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Characterization of cellular and vascular changes in the equine follicles during hCG-induced ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 115-123, 1999.

KINO, S.; OSAWA, T.; MIZUNO, S.; WATANABE, G.; TAYA, K.; IZAIKE, Y. Effect of postbreeding intramuscular administration of deslorelin acetate on plasma LH and progesterone concentrations and conception rate in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, p. 23-27, 2014.

KISER, A.M.; SUDDERTH, A.K.; BRINSKO, S.P.; BURNS, P.J.; DOUGLAS, R.H.; BLANCHARD, T.L. Comparison of efficacy of two dose rates of histrelin for

inducing ovulation in broodmares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 820-822, 2013.

KÖHNE, M.; KUHLE, J.; ILLE, N.; ERBER, R.; AURICH, C. Treatment with human chorionic gonadotrophin before ovulation increases progesterin concentration in early equine pregnancies. **Animal Reproduction Science**, v. 149, p. 187-193, 2014.

KÖNIG, H.E.; PROBST, A. Anatomie der Geschlechtsorgane beim Pferd. In: AURICH, C. **Reproduktionsmedizin beim Pferd**. Stuttgart: Parey Verlag, 2005. chap. 1, p. 1-14.

KOSKINEN, E.; KUNTSI, H.; LINDEBERG, H.; KATILA, T. Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. **Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A**, v. 36, p. 299-304, 1989.

LEBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 3, p. 10-22, 2009.

LEY, W.B. Sazonalidade, Ciclo Estral, sua Manipulação e Controle Artificial. In: LEY, W.B. **Reprodução em éguas para veterinários de eqüinos**. Roca, 2006, chap. 5, p. 65-80.

LIMA, A.G.; COSTA, L.C.B.; ALVARENGA, M.A.; MARTINS, C.B. Does Clinical Treatment with Phenylbutazone and Meloxicam in the Pre-ovulatory Period Influence the Ovulation Rate in Mares? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 771-775, 2015.

LINDHOLM, A.R.G.; FERRIS, R.A.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 312-313, 2011.

LINDZEY, J.; JAYES, F.L.; YATES, M.M.; COUSE, J.F.; KORACH, K.S. The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor- α . **Journal of Endocrinology**, v. 191, p. 309-317, 2006.

LOY, R.G.; HUGHES, J.P. The effects of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare. **The Cornell Veterinarian**, v. 56, p. 41-50, 1966.

MA, M.; WANG, J.; XU, L.; ZHANG, Q.; DU, B.; JIANG, X.; SHI, Q.; ZHOU, L.; LI, B.; SAITO, H.; KURACHI, H. Effects of two human chorionic gonadotropin doses administered to the ovarian states during the *in vitro* fertilization and embryo transfer program. **Biomedical Reports**, v. 3, p. 215-219, 2015.

MACHADO, M.S.; ROSER, J.F.; GRECO, G.M.; ARAÚJO, G.H.; ALVARENGA, M.A. Effect of superovulatory treatment with equine pituitary extract and equine FSH on endocrine profiles in mares. In: 7TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2008. Proceedings...

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; COLAZO, M.G.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, p. 77-90, 2007.

MARKOVIC, D.; PAVLOVIC, M.; PAVLOVIC, V. Seasonality, Folliculogenesis and luteogenesis in mare ovaries. **Facta Universitatis Series**, v. 10, p. 120-126, 2003.

MATSUO, H.; BABA, Y.; NAIR, R.M.G.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A.V. Structure of the porcine LH and FSH releasing factor: I. The proposed amino acid sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p.1334-1339, 1971

MCCUE, P. M. Induction of ovulation. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine 5**. Philadelphia: Saunders, 2003. chap. 5.7, p. 240-242.

MCCUE, P.M.; FERRIS, R.A.; BURDEN, C.A. Review of techniques for prediction of ovulation in the mare. **AAEP Proceedings**, v. 60, p. 41-44, 2014.

MCCUE, P.M.; FARQUHAR, V.J.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Removal of deslorelin (Ovuplant TM) implant 48 h after administration results in normal interovulatory intervals in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 865-870, 2002.

MCCUE, P.M.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. **AAEP Proceedings**, v. 50, p. 510-513, 2004.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2.ed. Wiley-Blackwell, New York, 2011, 3288p.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J. L.; COOK, V. M. Equine embryo transfer: a review. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 10, p. 343-355, 1988.

MCKINNON, A.O.; VASEY, J.R.; LESCUN, T.B.; TRIGG, T.E. Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, p. 153-155, 1997.

MEDAN, M.S.; NAMBO, Y.; NAGAMINE, N.; SHINBO, H.; WATANABE, G.; GROOME, N.; TAYA, K. Plasma concentrations of ir-inhibin, inhibin A, inhibin pro-alphaC, FSH, and estradiol-17beta during estrous cycle in mares and their relationship with follicular growth. **Endocrine**, v. 25, p.7-14, 2004.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; MEDEIROS, A.S.L.; DELL'AQUA JR, J.A.; CARMO, M.T.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Efeito da deslorelina e do extrato de pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supl. 1), p. 193, 2005.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; PUOLI FILHO, J.N.P.; ARAÚJO, G.H.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Eficiência do acetato de deslorelina e do extrato de

pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 392-398, 2012.

MICHEL, T.H.; ROSSDALE, P.D.; CASH, R.S.G. Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadotrophin-releasing hormone for hastening ovulation Thoroughbred mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, p. 438-442, 1986.

MILLER, P.A.; WESSON, J.A.; GINTHER, O.J. Interaction of estradiol and a nonsteroidal follicular fluid substance in the regulation of gonadotropin secretion in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 354-358, 1981.

MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 2242-2249, 2003.

MUMFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; NETT, T.M. Use of gonadotropin-releasing hormone, estrogen, or a combination to increase releasable pituitary luteinizing hormone in early transitional mares. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 174-177, 1994.

MUMFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; JÖCHLEB, E.; HARRISON, L.A.; NETT, T.M.; TRIGG, T.E. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p.129-140, 1995.

NAGAO, J.F.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 69-73, 2012.

NEWCOMBE, J.R. Ovulation and formation of the corpus luteum in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, p. 48-52, 1996.

NEWCOMBE, J.R.; MARTINEZ, A.; PETERS, A.R. The effect of the gonadotropin-releasing hormone analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. **Theriogenology**, v.55, p.1619-1631, 2001.

NISWENDER, K.D.; ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.M.; HARDY, Q.P.; SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, p. 497-500, 2003.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI JR, J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, M. G.L.; BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in Vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 680-686, 2007.

PADULA, A.M. GnRH analogues-agonists and antagonists. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 115-126, 2005.

PANIGONE, S.; HSIEH, M.; FU, M.; PERSANI, L.; CONTI, M. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. **Molecular Endocrinology**, v. 22, p. 924-936, 2008.

PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Pituitary hormones and their hypothalamic releasing factors. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw Hill, 2001, chap. 56, p. 1541-1562.

PELEHACH, L.M.; SHARP, D.C.; PORTER, M.B.; DIXON, L.N.; MCDOWELL, K.J. Role of oestrogen and progesterone in the control of uterine edema in pony mares. **Biology of Reproduction**, v. 62 (Suppl.), p. 386, 2000.

PERKINS, N.R.; GRIMMETT, J.B. Pregnancy and twinning rates in Thoroughbred mares following administration of human chorionic gonadotrophin (hCG). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, p. 94-100, 2001.

PERRY, G. **2013 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS**.

Disponível em: <http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf>. Acesso em: 05 de Maio de 2016.

PIERSON, R.A. Folliculogenesis and ovulation. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, chap. 17, p. 161-171.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the pre-ovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v. 24, p. 359-368, 1985.

PYCOCK, J. F. Use of ultrasound to stage estrous and predict ovulation. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine 5**. Philadelphia: Saunders, 2003. chap. 5.8, p. 242-245.

RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to season, cyclical and left-right variation. **Acta Endocrinologica Supplement**, v. 51, p. 1-68, 1996.

RAZ, T.; CARLEY, S.; CARD, C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. **Theriogenology**, v. 71, p. 1358-66, 2009.

SAINT-DIZIER, M.; CHOPINEAU, M.; DUPONT, J.; COMBARNOUS, Y. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. **Reproduction**, v. 128, p. 219-228, 2004.

SALES, J.N.; CARVALHO, J.B.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI, J.O.; MAIO, J.R.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, p. 510-516, 2012.

SAMPER, J.C. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. **AAEP Proceedings**, v. 43, p. 189-191, 1997.

SAMPER, J.C. A review of a practitioner's perspective on endometrial edema. **Pferdeheilkunde**, v. 26, p. 14-18, 2010.

SAMPER, J.C. Induction of estrous and ovulation: why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v. 70, p. 445-447, 2008.

SAMPER, J.C.; HANKINS, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 314-318, 2001.

SAMPER, J.C.; JENSEN, S.; SERGEANT, J.; ESTRADA, A. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, p. 320-323, 2002.

SANTOS, G.O. **Indução da ovulação com hCG e acetato de deslorelina altera o perfil protéico do líquido folicular de éguas**. 2013. 44f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAUBERLI, D.S. **The effectiveness and efficiency of ovulation induction agents in mares**. 2013. 106f. Dissertação (Mestrado) – College of Veterinary Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign.

SAUMANDE, J.; HUMBLLOT, P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 171-182, 2005.

SCHAUER, S.N.; GUILLAUME, D.; DECOURT, C.; WATSON, E.D.; BRIANT, C.; DONADEU, F.X. Effect of luteinizing hormone overstimulation on equine follicle maturation. **Theriogenology**, v. 79, p. 409-416, 2013.

SEGISMUNDO, R.; ALVARENGA, M.A.; GOMES, G.M. Avaliação do cipionato e benzoato de estradiol na indução e sincronização de ovulações em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Supl.), p. 562, 2003.

SHARP, D.C.; WOLFE, M.W.; CLEAVER, B.D.; NILSON, J. Effects of estradiol-17 β administration on steady-state messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding equine α and LH/CG β subunits in pituitaries of ovariectomized pony mares. **Theriogenology**, v. 55, p. 1083-1093, 2001.

SHAW, N.D.; HISTED, S.N.; SROUJI, S.S.; YANG, J.; LEE, H.; HALL, J.E. Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, p. 1955-1961, 2010.

SIDDIQUI, M.A.R.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Effect of hCG in the presence of hCG antibodies on the follicle, hormone

concentrations and oocyte in mares. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 474-479, 2009.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 339-346, 2006.

SOUSA, F.A.C.; FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA R.P. Aumento da disponibilidade de éguas receptoras de embrião após tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Suppl.), p. 1258, 2007.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MORGAN, G.L. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 1-15, 2001.

SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. **AAEP Proceedings**, v. 49, p. 353-355, 2003.

SQUIRES, E.L.; BRADECAMP, E.E.; BALL, B.A.; SCHNOBRICH, M.R.; HOWARD, C.; TROEDSSON, M.H.; RIDDLE, W.T. Relationship Between Ultrasonographic Findings at the Time of Breeding and Pregnancy Outcome. **AAEP Proceedings**, v. 60, p. 45-47, 2014.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p.1-8, 2007.

SUGINO, H.; BOUSFIELD, G.R.; MOORE JR, W.T.; WARD, D.N. Structural studies on equine glycoprotein hormones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 8603-8609, 1987.

SULLIVAN, J.J.; PARKER, W.G.; LARSON, L.L. Duration of estrus and ovulation time in nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 162, p. 895-898, 1973.

THOMPSON, D.L.; GARZA JR, F.; ST GEORGE, R.L.; RABB, M.H.; BARRY, B.E.; FRENCH, D.D. Relationships among LH, FSH and prolactin secretion, storage and response to secretagogue and hypothalamic GnRH content in ovariectomized pony mares administered testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, progesterone, dexamethasone or follicular fluid. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, p. 189-199, 1991.

TRIGG, T.E.; WRIGHT, P.J.; ARMOUR, A.F.; WILLIAMSON, P.E.; JUNAIDI, A.; MARTIN, G.B.; DOYLE, A.G.; WALSH, J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 255-261, 2001.

TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 643-653, 1990.

ULIANI, R.C. **Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-B e doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação**. 2012. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

URQUIETA, B.; DURÁN, M.C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V.H. hCG-Induced ovulation in thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 859-864, 2009.

VANDERWALL, D.K.; JUERGENS, T.D.; WOODS, G.L. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with HCG or Ovuplant™ (deslorelin). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, p. 539-542, 2001.

VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p. 105-119, 2006.

VERONESI, M.C.; BATTOCCHIO, M.; FAUSTINI, M.; GANDINI, M.; CAIROLI, F. Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the thoroughbred mare. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 25, p. 133-140, 2003.

VOGE, J.L.; SUDDERTH, A.K.; BRINSKO, S.P.; BURNS, P.J.; BLANCHARD, T.L. Comparison of efficacy of two dose rates of histrelin to human chorionic gonadotropin for inducing ovulation in broodmares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 208-210, 2012.

VOSS, J.L. Human chorionic gonadotrophin. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febizer, 1993, chap. 35, p.325-328.

VOSS, J.L.; SULLIVAN, J.J.; PICKETT, B.W.; PARKER, W.G.; BURWASH, L.D.; LARSON, L.L. The effect of hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 23, p. 297-301, 1975.

WATSON, E.D.; BAE, S.E.; THOMASSEN, R.; THOMSON, S.R.; WOAD, K.; ARMSTRONG, D.G. Insulin-like growth factors-I and -II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. **Reproduction**, v. 128, p. 321-329, 2004.

WATSON, E.D.; THOMASSEN, R.; STEELE, M.; HEALD, M.; LEASK, R.; GROOME, N.P.; RILEY, S.C. Concentrations of inhibin, progesterone and estradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during the

spring transition and the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 74, p. 55-67, 2002.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 33-48, 1999.

WEEDMAN, B.J.; KING, S.S.; NEUMANN, K.R.; NEQUIN L.G. Comparison of circulating estradiol-17 β and folliculogenesis during the breeding season, autumn transition and anestrus in the mare. **Journal of equine veterinary science**, v.13, p. 502-505, 1993.

WHITMORE, H.L.; WENTWORTH, B.C.; GINTHER, O.J. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 631-636, 1973.

WILSON, C.G.; DOWNIE, C.R.; HUGHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Equine Veterinary Science**, v. 10, p. 301-308, 1990.

WOODS, J.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 410-415, 1990.

YOON, M.J.; BOIME, I.; COLGIN, M.; NISWENDER, K.D.; KING, S.S.; ALVARENGA, M.A.; JABLONKA-SHARIFF, A.; PEARL, C.A.; ROSER, J.F. The efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH) in mares: Induction of ovulation, hormone profiles and inter-ovulatory intervals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, p. 470-479, 2007.

YIN, D.L.; PU, L.; PEI, G. Antisense oligonucleotide to insulin-like growth factor II induces apoptosis in human ovarian cancer AO cell line. **Cell Research**, v. 8, p. 159-165, 1998.

YU, Y.S.; SUI, H.S.; HAN, Z.B.; LI, W.; LUO, M.J.; TAN, J.H. Apoptosis in Granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. **Cell Research**, v. 14, p. 341-346, 2004.

ANEXO 1 – NORMAS EDITORIAIS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO JEVS (JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE).

Introduction

Journal of Equine Veterinary Science (JEVS) is an international publication designed for the practicing equine veterinarian, equine researcher, and other equine health care specialists. Published monthly, each issue of *JEVS* includes original research, reviews, case reports, short communications, and clinical techniques from leaders in the equine veterinary field, covering such topics as laminitis, reproduction, infectious disease, parasitology, behavior, podology, internal medicine, surgery and nutrition. *JEVS* is also an official publication of the Equine Science Society.

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Case Reports
4. Short Communications
5. Clinical Techniques

Original Research: Research or extensive clinical reports containing significant new findings. The material presented should be original and not have been published elsewhere, except in a preliminary form. Papers will be reviewed by referees familiar with the subject matter of the paper. Revisions are likely to be expected.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal, which are of active current interest. Papers need not contain original work or ideas. They will be reviewed for completeness, accuracy, style and suitability of content by referees familiar with the subject and the Editor-in-Chief. Revisions may be requested.

Case Reports are practitioner-oriented reports meant to communicate the facts of an interesting case or series of cases. Papers will be peer reviewed. Revisions are likely to be expected. The major concerns of the critique will be accuracy of diagnosis and relevance to equine practice.

Short Communications are intended to provide quick publication of highly relevant and interesting information. Manuscripts should contain original data and be limited to 2000 words. The number of tables and figures are limited to two each. A limited number of references should be included. Manuscripts will be peer reviewed by two reviewers and the Editor.

Clinical Techniques should describe a procedure or technique that must include 1) an overview and a description of the procedure; 2) a detailed series of images and descriptive text describing each step of the procedure; 3) a detailed description of the instruments and other materials needed to perform the procedure as well as trade name, manufacturer's name and address; 4) a summary or conclusion; and

5) references. Additional information acceptable for this section would include topics of current interest to our colleagues whether it is a technique or subject that can be used in the clinical situation. "New drug regimens for use in the horse" is one example of such a clinical topic that has direct application to the equine.

Before you begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Journal of Equine Veterinary Science*.

Conflict of Interest

Any conflicts of interest must be disclosed at the end of the submitted manuscript under the subheading 'Conflict of interest statement'. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third

party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open Access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:
<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open Access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All

correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via

https://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_AC R=JEVS.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of up to 5 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so. The Editors retain the right to choose reviewers as deemed appropriate. All submissions will be reviewed by at least two anonymous reviewers to evaluate them for originality, clear statement of a hypothesis, appropriate experimental design, completeness of methods, a logical and comprehensive discussion, and conclusions that are supported by data.

Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not

just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's

requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature

- Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
- All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
- All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
- For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Formulae

- Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
- For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
- Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
- The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by $\exp$.

- In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
- Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
- The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-equine-veterinary-science>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Papa FO, Melo CM, Monteiro GA, Papa PM, Guasti PN, Maziero RRD, et al. Equine perineal and vulvar conformation correction using a modification of Pouret's technique. *J Equine Vet Sci* 2014;34:459–64.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate

any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources including the Internet)
- Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our Support Center.

After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is

similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.