

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA OVARIANA EM ÉGUAS TRATADAS COM BAIXA
DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA**

ANGÉLICA MISAILIDIS GIMENES

BOTUCATU - SP
Dezembro 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA OVARIANA EM ÉGUAS TRATADAS COM BAIXA
DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA**

ANGÉLICA MISAILIDIS GIMENES

Orientador: Prof. Adjunto Cezinande de Meira

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Reprodução Animal

BOTUCATU

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Gimenes, Angélica Misailidis.

Resposta ovariana em éguas tratadas com baixa dose de extrato de
pituitária equina / Angélica Misailidis Gimenes. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Cezinande de Meira

Capes: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Égua – Reprodução.

Palavras-chave: Éguas; Extrato de pituitária equina; Superovulação.

Angélica Misailidis Gimenes

TÍTULO: RESPOSTA OVARIANA EM ÉGUAS TRATADAS COM BAIXA DOSE
DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Cássia Maria Barroso Orlandi

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

FCAV – UNESP - Jaboticabal

Data da Defesa: 17 de Dezembro de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, meu pai, meus irmãos de sangue e os que encontrei ao longo da minha caminhada, a meus avós, a minha tia Lis, e a Letícia e a todos os professores que participaram da minha formação...

É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem souber ver.

*Quando você quer mais do que tem
Você pensa que precisa.
E quando você pensa mais do que você quer
Seus pensamentos começam a sangrar.
(Eddie Vedder)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que possibilitaram a execução deste trabalho.

Em especial ao Prof. Adj. Cezinande de Meira por ter aceitado me orientar, por todos os ensinamentos acadêmicos e pelas conversas que me modificaram ao longo do mestrado.

Aos colegas Gustavo Araujo e Larissa Toyofuku por terem participação fundamental na execução do segundo experimento. Ao Miguel pelos cuidados com os animais do experimento.

Ao veterinário André Luis Nunes Boff pela ajuda durante o experimento, ao João Mário Fortunato, proprietário do Haras Fazenda das Águas JM, por ter fornecido toda infraestrutura e os animais para a realização do experimento. Aos funcionários do haras pelo auxílio durante o experimento.

Ao Prof. Marco Antônio Alvarenga e ao colega Márcio Teoro do Carmo pelo processamento do extrato de pituitária equina.

A Prof. Juliana Gadum de Lalla por ter realizado as análises estatísticas e ao funcionário José Roberto de Lalla Júnior por me ajudar ao longo do mestrado, tirando todas as minhas dúvidas com paciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro do mestrado.

Aos meus amados amigos Ana Elisa, Bruna, Carla, Carol, Fabrício, Julinho e Luis pela amizade e apoio ao longo dos anos. A Andreza e Érika pela amizade e por me hospedar de forma tão acolhedora.

À minha família pela compreensão, apoio e amor que sempre me deram, obrigada por terem possibilitado a realização dos meus sonhos.

***Uma mente cheia de perguntas, e um professor em minha alma
Sob meu ser, está uma estrada que desapareceu
Eu tenho a minha indignação, mas sou puro em todos os meus
pensamentos.
Deixe comigo que eu encontro um jeito de ser
Eu estou vivo...***

(Adaptado de Eddie Vedder)

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Média $\pm$ EPM: do número de folículos com diâmetro entre 17 e 19,9; 20-23 e $\geq$ 25 mm no início do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%), do número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30 mm no momento da indução da ovulação, do número de ovulações e do número de embriões coletados nos diferentes grupos (experimento 1).	35
Tabela 2: Média $\pm$ EPM: do número de folículos com diâmetro entre 17 e 19,9; 20-23 e $\geq$ 25 mm no início do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%), do número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30 mm no momento da indução da ovulação, do número de ovulações e do número de embriões coletados nos diferentes grupos (experimento 2).	36
Tabela 3: Média $\pm$ EPM do diâmetro do maior folículo (no momento PGF2 α e no fim do tratamento com EPE ou solução salina 0,9%) e dos intervalos (em dias) da PGF2 α ao início do tratamento e indução com hCG e 1 ^a OV, nos diferentes grupos (experimento 1).	37
Tabela 4: Média $\pm$ EPM do diâmetro do maior folículo (no momento PGF2 α e no fim do tratamento com EPE ou solução salina 0,9%) e dos intervalos (em dias) da PGF2 α ao início do tratamento e indução com hCG e 1 ^a OV, nos diferentes grupos (experimento 2).	37
Tabela 5: Média $\pm$ EPM do número de aplicações de EPE ou solução salina 0,9% e intervalo (em dias) do início e final do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%) nos diferentes grupos (experimento 1).	38

Tabela 6: Média $\pm$ EPM do número de aplicações de EPE ou solução salina 0,9% e intervalo (em dias) do início e final do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%) nos diferentes grupos (experimento 2).	38
Tabela 7: Média $\pm$ EPM do diâmetro máximo alcançado pelos primeiro (F1), segundo (F2), terceiro(F3) e quarto(F4) maiores folículos nos diferentes grupos (experimento 1).	39
Tabela 8: Média $\pm$ EPM do diâmetro máximo alcançado pelos primeiro(F1), segundo(F2) e terceiro(F3) maiores folículos nos diferentes grupos (experimento 2).	39
Tabela 9: Média $\pm$ EPM do crescimento folicular diário dos quatro maiores folículos (F1, F2, F3 e F4) nos diferentes grupos (experimento 1).	40
Tabela 10: Média $\pm$ EPM do crescimento folicular diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) nos diferentes grupos (experimento 2).	40

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1. Controle do Eixo Hipotalâmico Hipofisário Gonadal.....	17
2.2. Dinâmica Folicular.....	18
2.3. Superovulação.....	22
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Preparação do Extrato de Pituitária Equina (EPE).....	29
4.2. Delineamento Experimental.....	29
4.2.1 Experimento 1.....	29
4.2.2 Experimento 2.....	30
4.3. Desenvolvimento Folicular.....	31
4.4. Inseminação Artificial e Colheita de Embriões.....	32
4.5. Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	34
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES.....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	55
ANEXO.....	71

GIMENES, A.M., **RESPOSTA OVARIANA EM ÉGUAS TRATADAS COM BAIXA DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA**. Botucatu, 2010. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo visou avaliar a resposta ovariana e a taxa de recuperação embrionária em éguas tratadas com EPE nas doses de 6, 8 e 12,5 mg sendo o tratamento iniciado após a aplicação de prostaglandina F2 α no oitavo ou sexto dia após a ovulação com a finalidade de reduzir o tempo e custo do tratamento. Foram realizados dois experimentos, para o experimento 1, 40 ciclos estrais de éguas Mangalarga Marchador, entre cinco e 24 anos, e para o segundo experimento 30 ciclos estrais de éguas mestiças entre quatro e 12 anos de idade, foram estudados. Foi aplicada 7,5 mg i.m. de prostaglandina F2 α (Dinoprost Trometamina) no oitavo (experimento 1) ou sexto (experimento 2) dia após a ovulação. Nesse momento as éguas foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos para o experimento 1: (n=8 ciclos estrais/grupo): Grupo F20-23mm 6mg e F20-23mm 8mg receberam 6 e 8mg, respectivamente, de EPE por via i.m. a cada 12 horas, a partir da detecção de folículo(s) entre 20-23mm de diâmetro. Nos Grupos D8 - 6mg e D8 - 8mg foi aplicado 6 ou 8 mg de EPE, respectivamente, a cada 12 horas por via i.m. a partir do D8 (concomitante a PGF2 α). No Grupo F20-23mm Salina (Controle): as éguas receberam solução salina respeitando os mesmos intervalos que os grupos tratados com EPE a partir da detecção de folículo(s) entre 20-23mm de diâmetro. No experimento 2, a metodologia foi similar ao experimento 1, contudo, as éguas receberam 12,5 mg de EPE, e o tratamento foi iniciado no sexto dia após a ovulação para o Grupo D6-12,5 mg (n=9), ou quando detectou-se folículo(s) entre 20-23mm, Grupo F20-23mm 12,5 mg (n=10) e F20-23mm Salina (Controle, n=10). Em todos os grupos (Exp. 1 e 2) o tratamento (EPE ou salina) foi mantido até 12 horas anterior a detecção de folículo(s) com diâmetro ≥ 35 mm, nesse momento a ovulação foi induzida com única dose de 2500 U.I. de hCG, i.v. (Vetecor[®]). As variáveis foram analisadas através da Análise de Variância de Perfil (ANOVA) teste (F) seguida do teste Scott-Knott para comparação das médias, com nível de significância de 5%. No momento da aplicação do hCG, o grupo F20-23mm 8mg apresentou aumento ($P < 0,05$) do número de folículos > 30 mm em relação aos demais grupos (exp 1). Ademais, esse aumento foi

observado nos grupos tratados com EPE no experimento 2 e refletiu em maior número de ovulações ($2,00 \pm 0,27$) no grupo F20-23mm 8mg (exp1) e nos grupos F20-23mm 12,5mg ($2,70 \pm 0,40$) e D6 - 12,5mg ($2,33 \pm 0,37$) experimento 2. Entretanto, a maior porcentagem observada de embriões recuperados por ovulação foi no grupo F20-23mm 6 mg (79%). O tempo de tratamento (dias) assim como o número de aplicações de EPE ou solução salina foi menor ($P < 0,05$) para todos os grupos tratados a partir de folículos entre 20-23 mm em ambos os experimentos. Todos os grupos tratados com EPE apresentaram diâmetro folicular de F1, F2 e F3 maiores do que do grupo Controle. Conclui-se que o início do tratamento com população folicular entre 20-23 mm foi capaz de reduzir o tempo de tratamento, e a dose de 8 mg foi efetiva em promover dupla ovulação.

Palavras chave: Égua, Extrato de Pituitária Equina, Superovulação

GIMENES, A.M., **OVARIAN RESPONSE IN MARES TREATED WITH LOW DOSE OF EQUINE PITUITARY EXTRACT**. Botucatu, 2010. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the ovarian response and embryonic recovery in mares treated with doses of 6, 8 and 12.5 mg of EPE. The treatment was started after application of prostaglandin F2 α to reduce the period and cost of treatment. Two experiments were conducted, for the experiment one, 40 estrous cycles of Mangalarga Marchador mares and ranged in age from 5 to 24 yrs, and for the second experiment 30 estrous cycles of crossbred mares ranged in age from four to 12 yrs was used. In the eighth (experiment 1) or sixth (experiment 2) after ovulation was applied 7.5 mg i.m. of prostaglandin F2 α (Dinoprost Trometamina). In this moment, all mares in experiment 1 was randomly assigned to treatment and control groups as follows: Groups 1 and 2 (n=8 cycles/group) received 6 mg of EPE, i.m. twice daily, beginning when largest follicle (s) was (were) 20-23 mm (Group F20-23mm 6mg) or regardless of follicle size on Day 8 (Group D8 – 6 mg); Groups 3 and 4 (n=8 cycles/group), received 8 mg of EPE, i.m. twice daily, beginning when largest follicle was 20-23 mm (Group F20-23 mm 8 mg) or regardless of follicle size on Day 8 (Group D8 – 8mg); Group F20-23mm Saline (Control, n=8 cycles) received saline, i.m. beginning when largest follicle (s) was (were) 20-23 mm in the same range of groups treated with EPE. In the second experiment was used the same methodology of the experiment 1, however, the mares received 12.5mg of EPE, and the treatment began in the sixth day after ovulation for the Group D6- 12.5mg (n=9), or when the largest follicle (s) was (were) 20-23 mm, Group F20-23mm 12,5 mg (n=10) e F20-23mm Saline (Control, n=10). Treatments with EPE or saline continued until 12 hours before detection of follicle (s) reached 35 mm, at which time a single dose of hCG (2500 U.I., i.v., Vetecor[®]) was given. Groups were compared using ANOVA and mean differences among groups were located with Scott-Knott Test. There was an effect of group (P<0.05). In the moment of hCG, the group F20-23mm 8mg had largest follicle number >30mm (P<0.05) compared with the others groups (exp 1). Furthermore, this increased occurred in the groups receiving EPE in experiment 2, and reflected in an increase of the numbers of ovulations (2,00 $\pm$ 0,27) in the group F20-23mm 8 mg (exp1) and in the groups F20-23mm 12,5mg (2,70 $\pm$ 0,40) e D6 - 12,5mg (2,33 $\pm$ 0,37) exp 2. Nevertheless, the higher percentage of embryo recovery was of

group F20-23mm 6 mg (79%). The period of treatment (days) as well as the number of EPE or saline application was lesser ($P<0.05$) for all the groups treated with follicles of 20-23 mm in both experiments. All groups treated with EPE exhibit follicular diameter of F1, F2 and F3 higher than Control group. It is concluded that the starting the treatment with follicle population between 20-23 mm was able to reduce treatment period, and 8 mg dose was effective in promoting double ovulation.

Key words: Equine Pituitary Extract, Mare, Superovulation

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio do cavalo movimenta R\$ 7,3 bilhões por ano gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no Brasil. O plantel equino do país ocupa a terceira posição no ranking mundial, com 5,9 milhões de animais (GUERRA & MEDEIROS, 2006). Sob essa perspectiva o mercado equino aprimora-se diariamente produzindo animais geneticamente superiores ao longo das gerações. Para acompanhar esse desenvolvimento, a reprodução assistida utiliza biotécnicas visando incrementar a eficiência reprodutiva desses animais.

Na maioria dos programas de transferência de embriões o índice de recuperação embrionária está em torno de 65 %, logo, tem-se menos de um embrião recuperado por doadora por coleta, levando a um aproveitamento ineficiente das receptoras, e elevando o custo relacionado à manutenção e sincronização de ovulação entre receptora e doadora (ORLANDI, 2008, SQUIRES *et al.*, 1999).

A indução de múltiplas ovulações visa aumentar o número de embriões por coleta, por selecionar maior número de folículos de uma mesma onda folicular (ORLANDI, 2008). Fatores como, dose utilizada, frequência de aplicação, tipo de hormônio e individualidade contribui para a variação de resposta. As respostas mais eficientes até o momento na espécie equina são obtidas quando utilizado o Extrato de Pituitária Equina (EPE), FSH equino purificado (eFSH) e FSH recombinante reFSH (MEYERS-BROWN *et al.*, 2010; ROSAS *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos indicam que se obtém melhor resposta ovariana ao realizar o tratamento com EPE duas vezes ao dia (ALVARENGA *et al.*, 2001; SCOGGIN *et al.*, 2002). Além disso, Orlandi (2008) conseguiu melhor resposta ovariana quando começou o tratamento com uma população folicular entre 20 e 23 mm comparado aos resultados do tratamento iniciado com folículos de 26 mm de diâmetro.

O efeito da resposta ovariana é dose dependente, ou seja, o aumento da dose de EPE promove uma maior estimulação ovariana. Todavia, alguns trabalhos mostram que quanto maior o número de ovulações, menor a taxa de recuperação embrionária por ovulação, isso provavelmente devido à formação de um coágulo na região da fossa ovulatória (ALVARENGA *et al.*, 2001 ; CARMO *et al.*, 2006).

Farinasso (2004) e Rocha Filho (2005) optaram por testar o uso de baixas doses de EPE, com a finalidade de obter ovulação dupla e aumentar a taxa de recuperação embrionária por ovulação.

Dentro desse contexto, viu-se necessário testar o uso da baixa dose iniciando o tratamento com população folicular entre 20 e 23 mm tendo como objetivo a dupla ovulação e a redução do tempo de tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle Do Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal

A égua é uma espécie classificada como poliéstrica estacional, apresentando a atividade reprodutiva nos meses com maior disponibilidade de luz, sendo o fotoperíodo o principal regulador da ciclicidade equina (GINTHER *et al.*, 1972 apud McKINNON *et al.*, 1992). Hormônios gonadotróficos (FSH e LH) e ovarianos (estradiol, progesterona, inibina, ativina e fator de crescimento semelhante à insulina - IGF) são responsáveis pelo controle da dinâmica folicular agindo através de mecanismos de feedback no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (GINTHER, 1992).

O hipotálamo libera GnRH em forma de pulsos para hipófise, através do sistema porta hipofisário (CONE *et al.*, 2003). A variação da frequência associada à amplitude dos pulsos é variável ao longo do desenvolvimento sexual e do ciclo estral, e é o fator determinante para liberação dos hormônios pela hipófise. O hormônio folículo estimulante (FSH) é liberado na presença de uma frequência lenta de pulsos do GnRH. Entretanto, quando há uma elevação abrupta da frequência e da amplitude dos pulsos de GnRH ocorre a liberação do hormônio luteinizante (LH) (MARSHALL *et al.*, 1986 apud FERRIS & SHUPNIK, 2006).

Todo o mecanismo de controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal não era bem elucidado até a descoberta do gene Kiss-1. O kiss-1 codifica uma proteína denominada Kisspeptina que age através de receptores acoplados a proteína G denominado GPR54 estimulando a liberação de gonadotrofinas (LEE *et al.*, 1996). Esses receptores GPR54 estão expressos predominantemente no núcleo arqueado (ARC) e núcleo anteroventral paraventricular (AVPV) do hipotálamo (SMITH *et al.*, 2005).

A Kisspeptina age nos neurônios que liberam GnRH estimulando a liberação do pool de GnRH. Aparentemente, não há ativação da transcrição do gene de GnRH, pelo menos em uma resposta rápida (NAVARRO *et al.*, 2005). A via de ação da Kisspeptina para liberação de gonadotrofinas começa com a ligação da Kisspeptina no receptor GPR54 ativando a proteína G e liberando a subunidade Gq/11 que irá agir na fosfolipase C. Essa por sua vez atua clivando a fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O DAG ativa os canais receptores com potencial transitório (TRP) e inibe os canais de potássio. Tanto os canais TRP quanto os de

potássio também podem ser modulados pelo cálcio intracelular ou pela calmodulina dependente da proteína kinase (COLLEGE, 2008).

Tem sido sugerido que os efeitos estimulatórios da Kisspeptina no GnRH requerem a ativação da fosfolipase C (PLC) e a mobilização do cálcio intracelular (CASTELLANO *et al.*, 2006). Entretanto, são independentes da ação da adenilato ciclase, não requerendo a ação da adenosina monofosfato cíclico (cAMP) nem do influxo de cálcio extracelular.

2.2 Dinâmica Folicular

Nas éguas o crescimento folicular ocorre em ondas, sendo caracterizadas como ondas maiores, nas quais há presença de folículos dominantes e subordinados, e ondas menores, o maior folículo não atinge o tamanho para se tornar dominante (GINTHER, 1992, 1993). As ondas maiores podem ser subdivididas em onda primária e secundária. Na onda primária há o início do desenvolvimento folicular no meio do diestro, e a ovulação do folículo dominante está associada ao período de estro. Já na onda secundária, a emergência da onda ocorre no final do estro ou início do diestro apresentando regressão do folículo dominante ou ovulação de diestro (GINTHER & BERGFELT, 1993).

A emergência de uma onda folicular está associada ao aumento das concentrações de FSH, e ocorre por volta de três dias antes do pico de FSH, na presença de folículos de 6 mm de diâmetro na espécie equina (GINTHER, 2000; GINTHER *et al.*, 2003).

O FSH atinge seu pico quando o maior folículo da onda alcança o diâmetro ≥ 13 mm, sendo necessária a diminuição de suas concentrações, através da ação da inibina e do estradiol, para a ocorrência da divergência (GASTAL, *et al.*, 1997). O futuro folículo dominante emerge em média um dia antes, em relação aos folículos subordinados e continua seu desenvolvimento por apresentar maior responsividade às gonadotrofinas. Os folículos subordinados crescem em uma taxa comparativamente menor ou entram em atresia. Todavia, os folículos subordinados podem se tornar dominantes caso haja inibição dos fatores que inibem o seu crescimento, como por exemplo, em uma aspiração folicular (GASTAL *et al.*, 1999a). Os fatores presentes no fluido folicular que

participam da divergência são: fator de crescimento semelhante a insulina, estrógeno, ativina e inibina (DONADEU & GINTHER, 2002; GINTHER *et al.*, 1997).

A inibina, produzida por diversos folículos antes da divergência, é uma das principais responsáveis pela diminuição inicial das concentrações de FSH. Nas éguas, a concentração total de inibina, aumenta antes do início da queda do FSH (BERGFELT *et al.*, 2001; DONADEU and GINTHER, 2001). Sua ação é seletiva sobre o FSH, de modo que, não promove interferência na liberação de LH ou outros hormônios hipofisários (GINTHER, 1992; GASTAL *et al.*, 1999a; GASTAL *et al.*, 1999b; BERGFELT *et al.*, 2001; DONADEU & GINTHER, 2001).

Além disso, a inibina auxilia no crescimento folicular após a divergência, disponibilizando andrógenos como substrato para produção de estradiol. As concentrações de inibina variam conforme o desenvolvimento folicular. A inibina-A tem suas concentrações aumentadas de acordo com o desenvolvimento do folículo dominante, o que não ocorre com os folículos subordinados ou com a inibina-B (DONADEU & GINTHER, 2002).

Após a divergência, os folículos subordinados apresentam uma queda das concentrações de inibina-A e -B correspondente a diminuição da taxa de crescimento folicular. O aumento dos níveis de inibina-A no folículo dominante tanto antes da divergência como depois dela, pode sugerir que os andrógenos são disponibilizados como substrato para produção de estradiol pelo folículo dominante em éguas (DONADEU & GINTHER, 2002).

O estradiol também exerce participação na queda do FSH no momento da divergência junto com a inibina. Seus níveis começam aumentar um dia antes da divergência, de modo que a partir desse aumento inicia-se um sistema de retroalimentação positiva através da ação da síntese de androstenediona pelas células da teca e aumento da pregnenolona pelas células da granulosa, inibindo a síntese de progesterona pelas células da teca e da granulosa (GASTAL *et al.*, 1999b; WRATHAL & KNIGHT, 1995). Nas éguas o estradiol não mostrou ter efeito direto no crescimento folicular, como ocorre em outras espécies. No bovino o estradiol promove o desenvolvimento dos folículos pré antrais e estimula a esteroidogênese na célula da granulosa e da teca (GINTHER *et al.*, 2004).

Na espécie equina, sua via de ação é através de um aumento da atividade da aromatase devido sua ação autócrina e parácrina nas células da granulosa (GASTAL *et al.*, 1999b). Desse modo, ocorre um aumento tanto da expressão dos receptores de LH

como da sensibilidade ao FSH e LH. Sendo assim, o folículo dominante consegue continuar seu desenvolvimento com baixas concentrações de FSH (GASTAL *et al.*, 1999a; BERGEFELT *et al.*, 2001; DONADEU & GINTHER, 2001; DONADEU & GINTHER, 2002; HILLIER, 1985 apud GINTHER *et al.*, 2001).

Já o folículo subordinado, apresenta um aumento inferior dos níveis de estradiol em relação ao folículo dominante, de modo que seu desenvolvimento acaba sendo mais lento. Pode ser observada maior concentração de androstenediona nesses folículos, o que comprova a menor ação da aromatase (GASTAL *et al.*, 1999b; DONADEU & GINTHER, 2002).

O estradiol aumenta no folículo dominante antes da divergência e tem uma participação para o desencadeamento da divergência nos bovinos, uma vez que ao se aplicar um antisoro antiestradiol há um decréscimo no desenvolvimento dos dois maiores folículos da onda, além de um atraso na divergência, independente dos efeitos no FSH. Todavia, isso não é visualizado na espécie equina (BEG *et al.*, 2003; BEG & GINTHER, 2006).

Assim como o estradiol, o sistema IGF possui ação autócrina e parácrina. Nas éguas o aumento das concentrações de IGF-1 livre é coincidente com o aumento das concentrações de estradiol, e ocorre antes da divergência (DONADEU & GINTHER, 2002).

O sistema IGF inclui IGF-1, IGF-2, IGF proteínas ligantes (IGFBPs) e as IGFBPs proteases (WEBB *et al.*, 1999). Entre os fatores foliculares responsáveis para a ocorrência da divergência, o sistema IGF é o fator necessário para o início do desvio na espécie equina. Ele prepara o futuro folículo dominante para aumento do LH e para a menor disponibilidade de FSH, potencializando a ação do FSH nas células da granulosa e auxiliando no desenvolvimento do folículo dominante após a divergência (DONADEU & GINTHER, 2002; GINTHER *et al.*, 2008).

O folículo dominante apresenta maiores concentrações de IGF-1 após o diâmetro folicular de 16 a 19,9mm, sendo que essas concentrações se mantêm mais elevadas em relação aos folículos subordinados até o momento da divergência. Nos dois maiores folículos subordinados, há um decréscimo das concentrações de IGF-1 após a divergência, concomitante com aumento das concentrações de IGFBP-2 (DONADEU & GINTHER, 2002).

Ademais, sabe-se que outras IGFBPs como a IGFBP-4 e IGFBP-5 podem estar envolvidas nessa queda. Gerard & Monget (1998) verificaram altas concentrações

dessas IGFBPs em folículos subordinados em éguas. Além disso, foi demonstrado que cultivo de células da granulosa produzem IGFBP-2 e BP-5 quando estimuladas com FSH (DAVIDSON *et al.*, 2002).

O aumento das concentrações de IGF-1 está temporariamente associado ao aumento das concentrações de progesterona e estradiol (DONADEU & GINTHER, 2002). Doses fisiológicas de IGF-1 estimulam o aumento da inibina-A, ativina-A, e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), mas não aumenta a concentração de estradiol (GINTHER *et al.*, 2004). As concentrações de IGF-1 livre aumentam no segundo maior folículo da onda momento antes da divergência entre o segundo e o terceiro maiores folículos, quando o folículo dominante é submetido à ablação, entretanto, os demais fatores foliculares não se alteram. Administração de IGF-1 recombinante (rh)IGF-1 no início do desvio, no segundo maior folículo da onda, promove a continuidade do crescimento e dominância do mesmo. Contudo, aplicação de IGFBP-3 no maior folículo da onda no início da divergência, causa regressão desse folículo, sendo a dominância assumida pelo segundo maior folículo da onda (GINTHER *et al.*, 2008).

Donadeu & Ginther (2002) sugerem que a ativina-A pode estar envolvida na estimulação da atividade da aromatase, isso devido a apresentação de um aumento coincidente com o do estradiol no folículo dominante momentos antes da divergência em éguas. Receptores de ativina são encontrados na célula da granulosa e na teca. A ativina estimula a ação da aromatase e secreção de estradiol pelas células da granulosa em vacas, ratos e primatas (KNIGHT & GLISTER, 2001).

O aumento inicial do LH ocorre próximo a divergência, permanecendo crescente durante o desenvolvimento do folículo, e chegando à máxima concentração um dia após a ovulação (GASTAL *et al.*, 1997, 1999a, 2000; BERGFELT *et al.* 2001, WHITMORE *et al.* 1973 apud GINTHER *et al.*, 2004). As células da teca sob ação do LH ativam a aromatase que por sua vez estimula a produção de andrógenos (DONADEU & GINTHER, 2002). Já células da granulosa adquirem receptores para LH próximo ao momento da divergência, promovendo uma via funcional para elevação inicial do LH e atuando como um dos fatores desencadeadores da cascata do desvio, no momento em que as concentrações de FSH continuam decrescentes (GINTHER *et al.*, 2001).

Uma redução dos níveis de LH antes da divergência promove menor diâmetro do folículo dominante, e menores concentrações de estradiol, inibina e IGF-1 livre no fluido folicular, contudo, não impede a divergência. Desse modo, acredita-se que o LH exerça função na produção do estradiol, inibina e IGF-1 (GASTAL *et al.*, 1999c, BERGFELT *et al.*, 2001; GINTHER *et al.*, 2004).

O aumento das concentrações de LH é requerido para a ocorrência da ovulação, bem como para a luteinização das células foliculares dando origem ao corpo lúteo e consequentemente ao período de diestro (GINTHER, 1992). Na fase de diestro as células do corpo lúteo têm característica secretória e são responsáveis pela síntese de progesterona (GINTHER, 1992). Nas éguas a progesterona é secretada pelas células da granulosa sob ação do FSH e do LH. O aumento das concentrações de androstenediona pode agir como substrato após a divergência para o aumento da secreção de estrógeno pelo folículo dominante (SIROIS *et al.*, 1991). No fim do diestro ocorre a lise do corpo lúteo pela ação da prostaglandina F2 α , promovendo queda das concentrações de progesterona e liberação do LH hipofisário. Uma vez completado o processo luteolítico inicia-se um novo estro.

O conhecimento da fisiologia permite o desenvolvimento de tratamentos visando aperfeiçoar protocolos superovulatórios mais eficientes para a espécie equina. Pois, observa-se grande variabilidade na resposta ovariana frente aos agentes utilizados, a dose, a frequência de aplicação, dia do ciclo estral e as características foliculares no início do tratamento (SCOGGIN *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2003, WELCH & BRUEMMER, 2006). Assim sendo, novos estudos são fundamentais para o estabelecimento de protocolos que reduzam o tempo e custo do tratamento, mantendo taxa de recuperação embrionária por ovulação satisfatória.

3.3 Superovulação

A indução de múltiplas ovulações visa aumentar o número de embriões por coleta, por selecionar maior número de folículos de uma mesma onda folicular (ORLANDI, 2008). Um protocolo eficiente que promova a superovulação trará benefícios para o mercado de transferência de embriões, diminuindo o custo por embrião coletado e promovendo melhor aproveitamento das receptoras que tornam onerosos os programas de TE, além de fornecer embriões para congelamento e vitrificação (McCUE, 1996).

Protocolos utilizando GnRH e FSH suíno (pFSH), utilizados com sucesso na indução de múltiplas ovulações em bovinos, apresentam resultados inconsistentes na espécie equina (ALLEN, 1982, DINGER *et al.*, 1982, FORTUNE, 1993, SQUIRES *et al.*, 1986). Pois, o GnRH requer altas doses e numerosas aplicações ou sistemas de liberação contínua por meio de bombas, o que inviabiliza seu uso na prática (JOHNSON, 1986, 1987; GINTHER & BERGFELT, 1990). O pFSH utilizado nas doses de 8 a 150 mg em éguas cíclicas, apresenta baixa efetividade, não sendo capaz de aumentar satisfatoriamente o número de ovulações, mantendo média inferior a 1,8 ovulações/égua (FORTUNE & KMMINCH, 1983; SQUIRES *et al.*, 1986;).

Fortune & Kmminch (1983) testaram doses de 8,16 e 32 mg administradas duas vezes ao dia, tendo o tratamento iniciado no sexto dia após a ovulação. Os resultados encontrados foram de 1,83, 1,54 e 1,50 ovulações, respectivamente. Squires *et al.*, (1986) ao utilizar 150 mg de pFSH a cada 12 horas, obteve uma média de 1,6 ovulações/égua, sendo que apenas 44,4 % (4/9) responderam ao tratamento apresentando múltiplas ovulações. Cullingford *et al.*, (2010) testaram as doses de 25, 50 e 100 mg de pFSH em éguas com início do tratamento quando as éguas apresentavam população folicular entre 20 e 22 mm de diâmetro. O tratamento era interrompido na presença de folículos maiores que 30 mm, sendo observado número de ovulações e porcentagem de recuperação embrionária similar entre os grupos tratados com pFSH e o grupo controle.

Losino *et al.*, (2007) em um ensaio preliminar, utilizaram gonadotrofina menopáusica humana (hMG), um hormônio com semelhança molecular ao FSH, existindo então a possibilidade de ligação do hMG aos receptores de FSH dos equinos, com a finalidade de promover múltiplas ovulações em éguas, uma vez que esse hormônio apresentou resultados satisfatórios em humanos e bovinos. Neste estudo, foram detectadas ovulações duplas em 57,1% das éguas tratadas versus 0,0% nas éguas controle.

Uma nova proposta para os tratamentos superovulatórios em éguas é a utilização dos hormônios recombinantes. Os primeiros trabalhos vêm testando doses para averiguar a melhor resposta quanto ao número de ovulações e número de embriões recuperados. DeLucca *et al.*, (2008) testaram doses de 0,35; 0,5 e 0,65 mg FSH recombinante (reFSH) em éguas com folículos de 22-25mm, sendo essas administradas duas vezes ao dia até $\geq 50\%$ dos folículos apresentassem diâmetro 35mm. O melhor resultado obtido em número de ovulações foi com a dose de 0,5 mg ($4,59 \pm 0,64$) entretanto, a recuperação embrionária por ovulação foi do grupo tratado com 0,65mg

reFSH (2,69 embriões em 3,34 ovulações). Cullingford *et al.*, (2010) ao utilizar a dose de 0,5 mg de reFSH obtiveram apenas 0,85 ovulações sendo 0,69 embriões recuperados. Observaram um número expressivo de folículos acima de 35 mm quando comparado ao número de ovulações (1,32 e 0,85,respectivamente) porém esses folículos não ovulam. Roser *et al.*, (2008) visualizaram resultados semelhantes quanto ao desenvolvimento de folículos acima de 35 mm e falha no processo de ovulação. Segundo Ginther *et al.*,2007 isso pode ser decorrente do efeito negativo do estradiol quando em altas concentrações, levando a supressão da onda pré ovulatória de LH.

Meyers-Brown *et al.*(2010) utilizaram o reFSH e reLH com a finalidade de promover aumento do número de ovulações em éguas e diminuir o número de folículos que atingem diâmetro de pré ovulatório e não ovulam. Para isso iniciaram o tratamento com folículos entre 20 e 25 mm utilizando 0,85 mg de reFSH , até o momento em que o folículo atingia 29mm , entre os diâmetros de 29 a 32 mm era administrado reFSH/reLH ou reFSH/salina. Após o diâmetro de 32 mm, era administrado reLH ou salina até o diâmetro de 35 -38mm.O número de ovulações foi maior no grupo reFSH/reLH ($3,9 \pm 0,87$) do que no grupo reFSH/salina ($2,00 \pm 0,53$), porém embriões recuperados por lavado foi similar entre os grupos. Concluindo que o tratamento utilizando reFSH e reLH é eficiente em aumentar o número de ovulações e diminuir o número de folículos anovulatórios, entretanto há necessidade de maiores estudos para determinar uma dosagem eficiente em aumentar a taxa de recuperação embrionária por ovulação.

As respostas superovulatórias mais eficientes até o momento na espécie equina são obtidas quando utilizado o Extrato de Pituitária Equina (EPE), FSH equino purificado (eFSH) e o FSH recombinante (reFSH) (MEYERS- BROWN *et al.*, 2010; ROSAS *et al*, 1997).

Um dos primeiros trabalhos realizados com o EPE teve como objetivo testar sua efetividade na indução de múltiplas ovulações em éguas cíclicas. Lapin e Ginther (1977) aplicaram 0,66 mg/kg de EPE em éguas em diferentes momentos do ciclo estral. Um grupo começou tratamento no D11 (D0=dia da ovulação). O segundo grupo teve o tratamento iniciado no primeiro dia do estro, e um terceiro grupo (grupo controle) não recebeu tratamento. Os animais receberam EPE durante seis dias. Os resultados obtidos demonstraram que o número de éguas com mais de uma ovulação foi maior quando o tratamento foi iniciado no D11(4/7) ou no primeiro dia do estro (3/7) em relação ao grupo controle (0/7). Concluindo assim que o extrato de pituitária equino induz múltiplas ovulações em éguas durante a estação ovulatória.

Posteriormente diversos trabalhos foram realizados comparando EPE com pFSH e eFSH. Em 1986, Squires *et al.* realizaram um trabalho com a finalidade de comparar a eficácia do EPE e do pFSH na ocorrência de múltiplas ovulações em éguas. Para isso utilizaram 60 éguas, sendo 30 pertencentes ao grupo controle, 18 estavam inseridas no grupo EPE e 9 no grupo pFSH. O tratamento foi realizado com 750 unidades (determinadas por resposta ovariana em ratos - Fevold-Hisaw rat units) de EPE administrada uma vez ao dia e nove animais foram tratados com 150 mg pFSH a cada 12 horas. No dia do início do tratamento as éguas receberam 5 mg de PGF₂ (Lutalyse, Upjohn Corporation, Kalamazoo, MI). O tratamento com EPE ou pFSH foi interrompido na presença de folículos com diâmetro ≥ 35 mm. Nesse momento administrou-se dose única de 3300 UI de hCG. Os resultados mostraram que o tratamento com EPE promoveu número de ovulações significativamente maior (2,2 ovulações/égua) em relação ao tratamento com pFSH (1,6 ovulações/égua) ou ao controle (1,0 ovulação/égua). O EPE também promoveu duplas ou múltiplas ovulações em um maior percentual de éguas (72,2%) comparada ao FSHp (44,4%). O autor concluiu que EPE foi mais efetivo na indução de múltiplas ovulações em comparação ao FSHp.

Rosas *et al.* 1997 testaram a eficiência do eFSH e do EPE na indução de múltiplas ovulações em éguas no período reprodutivo e avaliaram a taxa de recuperação embrionária. Para isso utilizou cinco éguas para o tratamento com fração enriquecida de FSH (feFSH) e cinco éguas para tratamento com EPE. O experimento foi realizado em dois ciclos, sendo o primeiro ciclo controle e o segundo o ciclo tratado. As éguas receberam 250 microgramas de cloprostenol no dia seis e sete do ciclo. O tratamento consistiu em aplicação diária de 25mg im de feFSH ou EPE até a detecção de um ou dois folículos com diâmetro ≥ 35 mm ou por no máximo 10 dias. Nesse momento o tratamento era interrompido e as éguas recebiam 25 mg iv de EPE para induzir a ovulação, a coleta de embrião foi realizada no D6 ou D7 (D0 = dia da ovulação). Os resultados indicaram que o tempo de tratamento para obter pelo menos dois folículos com diâmetro ≥ 35 mm foi o similar para os dois tratamentos. A resposta foi similar quanto ao número de ovulações ($4,6 \pm 1,6$ e $3,6 \pm 0,7$) e número de embriões recuperados ($2,00 \pm 1,1$ e $2,0 \pm 0,5$) para os grupos feFSH e EPE, respectivamente, e ambos superiores ao grupo controle. O número de embriões recuperados por ovulação ($0,36 \pm 0,2$, $0,53 \pm 0,1$ e $0,4 \pm 0,5$) para os grupos feFSH, EPE e controle, respectivamente, não foi afetada pelo tratamento superovulatório, sendo similar entre os 3 grupos.

Alvarenga *et al.*(2001) relacionaram a resposta ovariana à frequência de aplicação do EPE. Para tal, utilizaram 25 mg de EPE sendo realizada uma (Grupo 1) ou duas (Grupo 2) vezes ao dia. Obtiveram melhor resultado no grupo cujas aplicações foram realizadas duas vezes ao dia. Sendo que o número de ovulações por égua foi de $2,4 \pm 1,8$ no Grupo 1, e no Grupo 2 foi de $7,1 \pm 5,1$. Entretanto, a taxa de recuperação embrionária/ovulação foi maior no grupo tratado apenas uma vez ao dia, 68% contra 49% do Grupo 2.

Scocgin *et al.* (2002) fizeram relação de dose e frequência para obter uma melhor resposta superovulatória quanto ao número de ovulações e embriões coletados. Para isso, foram utilizadas quarenta éguas sendo distribuídas em 4 grupos: Grupo 1(n=10) as éguas receberam 25 mg de EPE uma vez ao dia; Grupo 2 (n=10) foram administradas 50 mg de EPE uma vez ao dia; Grupo 3 (n=10) foi aplicado 12.5 mg de EPE duas vezes ao dia e Grupo 4 (n=10) foi utilizado a dose de 25mg de EPE duas vezes ao dia. O tratamento de todas as éguas começou 5 dias após a ovulação, sendo fornecido 250µg de cloprostenol sodium (Estrumate[®]) i.m. sete dias após a ovulação. O maior número de ovulações/égua foi com o uso de 25mg ministrada duas vezes ao dia ($4,7 \pm 0,6$). Porém, a maior taxa de recuperação embrionária/ ovulação (67,6 %) foi observada quando se utilizou a dose de 12,5 mg duas vezes ao dia em comparação a dose de 25 mg que foi de 43,2% (19/44). O aumento da frequência de aplicações de EPE proporcionou melhores resultados, provavelmente por manter constantes os níveis de gonadotrofina sérica.

Orlandi (2008) obteve melhor resposta ovariana quando iniciou o tratamento com 12,5 mg de EPE no momento em que o maior folículo da onda atingiu diâmetro entre 20 e 23 mm. Assim, observou maior número de folículos com diâmetro médio ≥ 30 mm ($1,91 \pm 0,23$ e $1,83 \pm 0,21$) e ovulações ($1,91 \pm 0,23$ e $1,99 \pm 0,21$) para os grupos iniciados com diâmetro de 20 e 23mm, respectivamente, e melhor taxa de recuperação embrionária/ovulação 73% nas éguas cujo tratamento foi iniciado na presença de folículos com diâmetro de 20mm.

Visando avaliar os efeitos de baixa dose de EPE e eFSH sobre o desenvolvimento folicular, taxa de ovulação e de recuperação embrionária, Rocha Filho (2005) utilizou doses de 4 mg de EPE e 5 mg de eFSH uma vez ao dia, detectando maior número de folículos ≥ 30 mm ($1,7 \pm 0,2$) em relação ao controle ($1,2 \pm 0,1$) para o tratamento com EPE. Esse tratamento promoveu uma resposta de duas ou mais ovulações em apenas 30,8% (4/13) das éguas tratadas. O aumento do número de folículos maiores do que 30mm não refletiu em um aumento do número de ovulações

por égua. A baixa resposta foi atribuída a heterogeneidade da população folicular no início do tratamento.

Farinasso (2004) obteve melhores resultados na porcentagem de ovulações múltiplas em seu experimento com baixas doses de EPE. Neste experimento, foram utilizados 2 mg, 4 mg e 6 mg de EPE uma vez ao dia para induzir múltiplas ovulações em éguas, o ciclo anterior de cada égua representou o grupo controle sem tratamento. As éguas apresentaram $1,17 \pm 0,39$, $1,92 \pm 0,64$ e $1,84 \pm 0,64$ ovulações após o tratamento com 2 mg, 4 mg ou 6 mg ao dia, respectivamente. O resultado indica o tratamento utilizando 4 ou 6 mg foi superior ao ciclo controle, podendo ser utilizado para aumentar o número de ovulações. A maior incidência de ovulações múltiplas encontradas por Farinasso (2004) ao utilizar 4 mg de EPE foi atribuída à população folicular mais homogênea no início do tratamento.

A população folicular presente no início do tratamento influencia o tempo de tratamento em dias. Orlandi (2008) ao iniciar o EPE com folículos no diâmetro entre 20 ($3,75 \pm 0,39$ dias) ou 23 mm ($2,36 \pm 0,36$ dias) precisou de menos dias para detectar presença de folículos com diâmetro ≥ 35 mm, quando comparado ao tempo de tratamento de protocolos que iniciavam a aplicação de EPE ou eFSH 5 dias após a ovulação que necessitavam de uma média de 7 a 8 dias para alcançar essa população folicular (SCCOGIN *et al.*, 2002; McCue *et al.*, 2006).

Com base nos dados da literatura consultada, observa-se que a resposta ovariana das éguas aos tratamentos para induzir múltiplas ovulações apresenta grande variabilidade. Fatores como, dose utilizada, frequência de aplicação, tipo de hormônio e individualidade contribui para a variação de resposta. Nas éguas com resposta exacerbada, especialmente quando se utiliza altas doses resultando em muitas ovulações ou luteinização de folículos, observa-se considerável redução na taxa de recuperação embrionária por corpo lúteo (Scoggin *et al.*, 2002). Tal fato pode estar relacionado com falhas nos processos de maturação oocitária, ovulação e/ou captação do oócito pelas fimbrias do oviduto (Carmo *et al.*, 2006). Portanto, a ampliação do conhecimento em relação às variáveis mencionadas, aliado a utilização de doses mais baixas visando um menor número de ovulações e a coleta de um embrião por égua em média, justificou-se a realização da presente pesquisa.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais dos experimentos foram:

- a) Reduzir o tempo de tratamento em dias, através da aplicação da prostaglandina $F_{2\alpha}$ antes de iniciar o tratamento com EPE;
- b) Iniciar o tratamento com a presença de folículos entre 20 e 23 mm de diâmetro com a finalidade de reduzir o número de aplicações de EPE.

Os objetivos específicos dos experimentos foram:

Experimento 1

- a) Avaliar a resposta ovariana perante o tratamento com baixas doses, 6 e 8mg de EPE, com relação ao número de folículos e ovulação;
- b) Verificar o intervalo em dias entre a injeção da $PGF_{2\alpha}$ realizada 8 dias após a ovulação, e o início do tratamento com EPE.

Experimento 2

- a) Verificar o intervalo em dias entre a injeção da $PGF_{2\alpha}$ realizada 6 dias após a ovulação, e o início do tratamento com EPE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação do Extrato de Pituitária (EPE)

Glândulas pituitárias foram obtidas em abatedouro equino e acondicionadas a -20°C até que fossem processadas segundo a técnica descrita por Guilou & Combarnous (1983). Após o descongelamento, as pituitárias foram banhadas em água destilada/deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com solução de 40% de etanol e 6% de acetato de amônia. A utilização da solução de etanol e acetato de amônia teve como objetivo a extração das gonadotrofinas. A fração obtida pós extração foi precipitada e a concentração de etanol aumentada para 80%, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20°C.

Para o presente estudo, o conteúdo liofilizado de todas as partidas foi pesado em balança analítica, misturado e diluído com solução fisiológica 0,9% para atingir uma concentração de 5 mg/mL. Tal procedimento visou obtenção de uma partida única e homogênea para o experimento 1 e 2.

4.2. Delineamento Experimental

4.2.1. Experimento 1

Foi realizado no Haras Fazenda das Águas JM, localizado no município de Tijucas do Sul- PR (Latitude 25°55'41'' e Longitude 49°11'56'') no km 639 da BR 376. No período de novembro de 2008 a fevereiro de 2009.

Foram utilizados 40 ciclos estrais de 14 éguas da raça Mangalarga Marchador com idade entre cinco e 24 anos, ciclando regularmente e com bom escore corporal. Os animais foram mantidos em piquetes e alimentados com feno de coast cross (*Cynodon dactylon*), suplementados com ração concentrada sal mineral e água *ad libitum*.

As éguas foram avaliadas por meio de palpação e ultrassonografia transretal utilizando aparelho de ultrassom Aloka modelo 500 com transdutor linear de 5 MHz para acompanhamento do desenvolvimento folicular e detecção do dia da ovulação. O dia da ovulação foi considerado o dia zero (D0). No oitavo dia (D8) todas as éguas receberam 7,5 mg de PGF_{2α} (Dinoprost Trometamida) i.m.. Em seguida, foram

distribuídas aleatoriamente em cinco grupos de acordo com os tratamentos descritos a seguir (n=8 ciclos estrais/grupo):

Grupo F20-23mm 6 mg – As éguas foram tratadas com 6 mg de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações, iniciando-se a partir do momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm;

Grupo D8-6mg – As éguas receberam 6 mg de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações a partir de D8, iniciando-se concomitante à aplicação da PGF2 α .

Grupo F20-23mm 8 mg - As éguas foram tratadas com 8 mg de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações, iniciando-se a partir do momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm;

Grupo D8-8mg – As éguas receberam 8 mg de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações, a partir do D8, iniciando-se concomitante à aplicação da PGF2 α .

Grupo F20-23mm Salina (Controle) - As éguas receberam solução salina a 0.9% (Solução fisiológica) por via i.m. com intervalo de 12 horas a partir do momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm.

Em todos os grupos o tratamento com EPE ou salina continuou até 12 horas antes da detecção de um ou mais folículos com diâmetro de 35 mm, sendo então interrompido. Na avaliação seguinte e coincidindo com a detecção de pelo menos um folículo ≥ 35 mm, foi aplicado dose única de 2500 U.I. de hCG, por via i.v. (Vetecor[®] Calier) para induzir o processo de ovulação.

4.2.2. Experimento 2

Foram utilizados 30 ciclos estrais de éguas mestiças com idade entre quatro e 12 anos, com bom escore corporal e histórico reprodutivo normal. Os animais do foram mantidos no Posto de Monta da Fazenda do Lageado UNESP – Botucatu, São Paulo (Latitude 22° 53'09'' e Longitude 48°26'42''), alojados em piquetes e alimentados com feno de coast cross (*Cynodon dactylon*), silagem de sorgo, sal mineral e água *ad libitum*.

As éguas foram avaliadas por meio de palpação e ultrassonografia transretal utilizando aparelho de ultrassom Aloka modelo 500 com transdutor linear de 5 MHz para acompanhamento do desenvolvimento folicular e detecção do dia da ovulação. O dia da ovulação foi considerado o dia zero (D0). No sexto dia após a ovulação (D6)

todas as éguas receberam $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dinoprost Trometamida; 7,5 mg i.m.). Em seguida, foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de acordo com os tratamentos descritos a seguir:

Grupo F20-23mm 12,5 mg (n=10) – As éguas foram tratadas com 12,5 mg de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações, iniciando-se a partir do momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm;

Grupo D6-12,5mg (n=9) – As éguas receberam 12,5 mg de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações a partir de D6;

Grupo F20-23mm Salina (Controle) (n=10) - As éguas receberam solução salina a 0,9% (Solução fisiológica) por via i.m. com intervalo de 12 horas a partir do momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm.

Em todos os grupos o tratamento com EPE ou salina continuou até a detecção de um ou mais folículos com diâmetro de até 34,9 mm, sendo então interrompido. Na avaliação seguinte e coincidindo com a detecção de pelo menos um folículo ≥ 35 mm, foi aplicado dose única de 2500 U.I. de hCG, por via i.v. (Vetecor[®] Calier) para induzir o processo de ovulação.

4.3. Desenvolvimento Folicular

A partir do momento da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ as éguas foram examinadas com intervalos regulares de 24 horas através de palpação e exame ultrassonográfico transretal, visando acompanhar o crescimento folicular e diagnosticar o momento da ovulação. Em cada exame, mensurou-se o diâmetro dos quatro maiores folículos para o experimento 1 e dos três maiores para o experimento 2, através da média da altura e largura dos folículos em imagem congelada, determinando-se o maior folículo como F1, segundo, terceiro e quarto maiores como F2, F3 e F4, respectivamente. As ovulações foram detectadas pela evacuação do fluido de um ou mais folículos. Os dados obtidos no experimento 1 e 2 foram utilizados para avaliar a média do crescimento folicular diário através da fórmula (diâmetro final – diâmetro inicial) / número de dias. Número de folículos entre 17-19,9; 20-23 e ≥ 25 mm no início do tratamento com EPE ou salina, número de folículos de 25-29,9 e > 30 mm no momento da indução da ovulação, diâmetro máximo atingido pelos F1, F2, F3 e F4 e número de ovulações por égua. O tempo de tratamento e número de aplicações de EPE ou salina foi determinado pelo tempo necessário para que o(s) folículo(s) atingisse(m) diâmetro máximo de 34,9 mm. O

número de embriões coletados também foi avaliado e relacionado ao número de ovulações.

4.4. Inseminação Artificial e Colheita de Embriões

Nos dois experimentos as éguas foram inseminadas 12 e 36 horas após a aplicação do hCG, ou até a detecção de pelo menos duas ovulações sendo as inseminações realizadas a cada 24 horas. Como foram utilizadas doadoras de interesse comercial em programa de transferência de embriões no experimento 1, o sêmen usado foi obtido de quatro diferentes garanhões por diferentes técnicos. No experimento 2 foi utilizado sêmen de dois garanhões com fertilidade conhecida. Em ambos os experimentos o sêmen utilizado foi diluído em extensor a base de leite desnatado, resfriado por até 24 horas e transportado. A dose inseminante variou de 500×10^6 a 1×10^9 espermatozóides móveis pré resfriamento.

As éguas foram submetidas à colheita de embriões no oitavo dia após a detecção da primeira ovulação no experimento 1 e no sexto dia após a ovulação no experimento 2. O meio de coleta foi utilizado Ringer com Lactato de Sódio no volume de um litro por lavado distribuído em ambos os cornos uterinos através da sonda de coleta. Após massagem do útero o meio foi recuperado por gravidade em filtro de 0,75 micrômetros. O mesmo procedimento foi repetido por quatro vezes, perfazendo quatro lavados por coleta. Em seguida, os embriões foram localizados em placa de petri com auxílio de Microscópio estereoscópio (Lupa), lavados em meio de cultivo TQC Holding Plus (Nutricell, Campinas - SP) por dez vezes e avaliados.

4.5. Análise Estatística

Para analisar as variáveis: diâmetro do maior folículo no momento da aplicação de PGF 2α , bem como no final do tratamento, número folículos nas categorias de 17-19,9mm, 20-23mm e ≥ 25 mm no início do tratamento com EPE ou salina, número de folículos entre 25-29,9 mm e >30 mm no momento da indução da ovulação, número de ovulações, embriões recuperados, taxa de crescimento do F1, F2, F3 e F4, intervalo em dias entre a injeção de PGF 2α e o início do tratamento, assim como o intervalo entre a primeira e última aplicação de EPE ou salina e número de aplicações do hormônio e intervalo entre a aplicação de hCG e detecção da primeira ovulação foi utilizada Análise

de Variância de Perfil (ANOVA) teste (F) seguida do teste Scott-Knott para comparação das médias, com nível de significância de 5%.

Para análise do acompanhamento do desenvolvimento folicular diário os dados foram normatizados para o dia da indução da ovulação e tabulados retroativamente, desse modo a análise de cada folículo ocorreu em uma fase de desenvolvimento correspondente entre eles.

5. RESULTADOS

O número de folículos das categorias 17 a 19,9 mm; 20-23 mm e ≥ 25 mm no início do tratamento com EPE ou solução salina 0,9% e número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30 mm no momento da indução da ovulação, número de ovulações e número de embriões coletados (Média $\pm$ EPM) estão representados na Tabela 1 e 2, referente ao experimento 1 e 2, respectivamente.

Os resultados do experimento 1 e 2 quanto ao diâmetro do maior folículo (Média $\pm$ EPM) no momento da aplicação de PGF 2α e no fim do tratamento com EPE ou solução salina 0,9% e intervalo em dias do momento da aplicação da PGF 2α até o início do tratamento com EPE ou solução salina 0,9% e intervalo entre a aplicação de hCG e detecção da primeira ovulação nos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 3 e 4.

O número de aplicações e intervalo em dias entre a primeira e a última aplicação de EPE ou solução salina 0,9% pode ser visualizado na Tabela 5 e 6 (exp 1 e 2, respectivamente).

O diâmetro máximo dos F1, F3 e F4 do experimento 1 foram similares entre os grupos ($p>0,05$). Como esperado, o F2 dos grupos tratados com EPE apresentou maior diâmetro máximo quando comparado ao grupo F20-23 mm Salina (Tabela 7). Ademais, no experimento 2 o diâmetro máximo de F1 não apresentou diferença entre os grupos ($p>0,05$), contudo o tratamento proporcionou desenvolvimento significativamente maior para o F2 e F3 dos grupos F20-23 mm 12,5 mg e D6-12,5 mg em relação ao controle (Tabela 8).

A baixa dose utilizada de EPE foi eficaz em promover o crescimento folicular do F2, apresentando taxa diária de crescimento similar entre os grupos tratados e superior ao grupo Salina ($P<0,05$), entretanto, as doses de 6 e 8 mg de EPE não apresentou diferença estatística quanto ao crescimento dos F3 e F4 em relação ao grupo Salina (Tabela 9). Já com a dose de 12,5 mg de EPE utilizada no experimento 2 houve diferença estatística no crescimento folicular durante o tratamento com EPE para o F2 e F3 somente no grupo que iniciou o tratamento com diâmetro folicular entre 20 e 23mm como representado na Tabela 10.

Tabela 1 – Média $\pm$ EPM: do número de folículos com diâmetro entre 17 e 19,9; 20-23 e $\geq$ 25 mm no início do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%), do número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30 mm no momento da indução da ovulação, do número de ovulações e do número de embriões coletados nos diferentes grupos (experimento 1).

	Grupo				
	F20-23mm 6mg	D8 6mg	F20-23mm 8mg	D8 8mg	F20-23mm Salina
Início do tratamento					
Fol 17-19,9mm	1,25 $\pm$ 0,31	0,13 $\pm$ 0,12	1,13 $\pm$ 0,30	0,50 $\pm$ 0,35	0,88 $\pm$ 0,48
Fol 20-23mm	1,25 $\pm$ 0,16 ^a	0,38 $\pm$ 0,18 ^b	1,00 $\pm$ 0,19 ^a	0,50 $\pm$ 0,38 ^b	1,75 $\pm$ 0,37 ^a
Fol $\geq$ 25mm	0,13 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,12
Momento do hCG					
Fol 25-29,9mm	0,25 $\pm$ 0,25	0,38 $\pm$ 0,26	0,63 $\pm$ 0,26	0,63 $\pm$ 0,37	0,13 $\pm$ 0,12
Fol >30 mm	1,50 $\pm$ 0,19 ^a	1,50 $\pm$ 0,19 ^a	2,25 $\pm$ 0,37 ^b	1,88 $\pm$ 0,12 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
Ovulações					
	1,75 $\pm$ 0,16 ^a	1,38 $\pm$ 0,18 ^b	2,00 $\pm$ 0,27 ^a	1,88 $\pm$ 0,23 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^b
Embriões					
	1,38 $\pm$ 0,18	0,75 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,26	0,38 $\pm$ 0,18

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 2 – Média $\pm$ EPM: do número de folículos com diâmetro entre 17 e 19,9; 20-23 e ≥ 25 mm no início do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%), do número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30 mm no momento da indução da ovulação, do número de ovulações e do número de embriões coletados nos diferentes grupos (experimento 2).

		Grupo		
		F20-23mm 12,5 mg	D6-12,5mg	F20-23mm Salina
Início do tratamento	Fol 17-19,9mm	1,00 $\pm$ 0,30	0,33 $\pm$ 0,24	0,60 $\pm$ 0,22
	Fol 20-23mm	1,10 $\pm$ 0,10 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	1,30 $\pm$ 0,21 ^a
Momento do hCG	Fol 25-29,9mm	0,70 $\pm$ 0,30	0,90 $\pm$ 0,39	0,50 $\pm$ 0,22
	Fol >30 mm	2,40 $\pm$ 0,50 ^a	2,11 $\pm$ 0,26 ^a	1,20 $\pm$ 0,13 ^b
Ovulações		2,70 $\pm$ 0,40 ^a	2,33 $\pm$ 0,37 ^a	1,20 $\pm$ 0,13 ^b
Embriões		0,40 $\pm$ 0,16	0,89 $\pm$ 0,42	0,40 $\pm$ 0,16

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Média $\pm$ EPM do diâmetro do maior folículo (no momento da aplicação da PGF2 α e no fim do tratamento com EPE ou solução salina 0,9%) e dos intervalos (em dias) da PGF2 α ao início do tratamento e indução com hCG e 1^a OV, nos diferentes grupos (experimento 1).

Grupo	Diâmetro do maior folículo (mm)		Intervalo (dias)	
	No momento da PGF2 α	No fim do tratamento	PGF2 α / início do tratamento	Indução com hCG e 1 ^a OV
F20-23mm 6mg	16,73 $\pm$ 1,47	36,02 $\pm$ 0,55 ^a	3,56 $\pm$ 0,51 ^a	1,69 $\pm$ 0,34 ^a
D8-6mg	17,59 $\pm$ 2,51	36,27 $\pm$ 0,69 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	3,19 $\pm$ 0,60 ^b
F20-23mm 8mg	18,08 $\pm$ 1,32	33,31 $\pm$ 0,67 ^b	2,50 $\pm$ 0,28 ^a	2,44 $\pm$ 0,52 ^b
D8-8mg	15,42 $\pm$ 2,09	35,42 $\pm$ 0,95 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	1,31 $\pm$ 0,16 ^a
F20-23mm Salina	15,81 $\pm$ 1,81	33,12 $\pm$ 1,13 ^b	3,38 $\pm$ 0,65 ^a	1,81 $\pm$ 0,13 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 4 - Média $\pm$ EPM do diâmetro do maior folículo (no momento da aplicação PGF2 α e no fim do tratamento com EPE ou solução salina 0,9%) e dos intervalos (em dias) da PGF2 α ao início do tratamento e indução com hCG e 1^a OV, nos diferentes grupos (experimento 2).

Grupo	Diâmetro do maior folículo (mm)		Intervalo (dias)	
	No momento da 9PGF2 α	No fim do tratamento	PGF2 α /início do tratamento	Indução com hCG e 1 ^a OV
F20-23mm 12,5mg	13,95 $\pm$ 0,76	34,55 $\pm$ 0,63 ^b	3,60 $\pm$ 0,58 ^b	2,60 $\pm$ 0,22
D6-12,5mg	15,50 $\pm$ 2,06	31,94 $\pm$ 0,72 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a	2,44 $\pm$ 0,30
F20-23mm Salina	14,95 $\pm$ 1,44	31,75 $\pm$ 0,61 ^a	3,30 $\pm$ 0,37 ^b	2,60 $\pm$ 0,16

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 5 – Média $\pm$ EPM do número de aplicações de EPE ou solução salina 0,9% e intervalo (em dias) do início e final do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%) nos diferentes grupos (experimento 1).

Grupo	Número de aplicações de EPE ou Salina	Intervalo entre início / final do tratamento (dias)
F20-23mm 6mg	9,25 $\pm$ 0,90 ^a	4,62 $\pm$ 0,45 ^a
D8-6mg	13,88 $\pm$ 1,56 ^b	7,00 $\pm$ 0,83 ^b
F20-23mm 8mg	9,38 $\pm$ 1,27 ^a	4,69 $\pm$ 0,63 ^a
D8-8mg	14,63 $\pm$ 1,59 ^b	7,25 $\pm$ 0,76 ^b
F20-23mm Salina	9,75 $\pm$ 0,82 ^a	4,88 $\pm$ 0,69 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Tabela 6 – Média $\pm$ EPM do número de aplicações de EPE ou solução salina 0,9% e intervalo (em dias) do início e final do tratamento (EPE ou solução salina 0,9%) nos diferentes grupos (experimento 2).

Grupo	Número de aplicações de EPE ou salina	Intervalo entre início / final do tratamento (dias)
F20-23mm 12,5mg	10,00 $\pm$ 0,80 ^a	5,00 $\pm$ 0,40 ^a
D6-12,5mg	14,22 $\pm$ 1,10 ^b	7,11 $\pm$ 0,55 ^b
F20-23mm Salina	9,50 $\pm$ 0,83 ^a	4,75 $\pm$ 0,42 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Tabela 7 – Média $\pm$ EPM do diâmetro máximo alcançado pelos primeiro (F1), segundo (F2), terceiro(F3) e quarto(F4) maiores folículos nos diferentes grupos (experimento 1).

Grupo	Diâmetro Máximo			
	F1	F2	F3	F4
F20-23mm 6mg	38,51 $\pm$ 1,38	34,42 $\pm$ 3,57 ^a	21,98 $\pm$ 1,60	18,17 $\pm$ 1,73
D8-6mg	42,39 $\pm$ 1,64	30,34 $\pm$ 3,31 ^a	20,42 $\pm$ 1,69	17,50 $\pm$ 1,51
F20-23mm 8mg	40,10 $\pm$ 2,29	34,15 $\pm$ 2,87 ^a	27,68 $\pm$ 2,51	22,76 $\pm$ 2,25
D8-8mg	38,47 $\pm$ 0,80	36,04 $\pm$ 1,25 ^a	24,14 $\pm$ 2,82	16,86 $\pm$ 3,37
F20-23mm Salina	39,39 $\pm$ 1,27	22,05 $\pm$ 1,71 ^b	18,66 $\pm$ 1,76	17,22 $\pm$ 1,70

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 8 – Média $\pm$ EPM do diâmetro máximo alcançado pelos primeiro(F1), segundo(F2) e terceiro(F3) maiores folículos nos diferentes grupos (experimento 2).

Grupo	Diâmetro Máximo		
	F1	F2	F3
F20-23mm 12,5mg	39,75 $\pm$ 1,30	36,05 $\pm$ 1,04 ^a	23,28 $\pm$ 2,62 ^a
D6-12,5mg	39,20 $\pm$ 1,47	33,92 $\pm$ 1,33 ^a	26,23 $\pm$ 2,87 ^a
F20-23mm Salina	37,77 $\pm$ 0,62	23,00 $\pm$ 1,84 ^b	17,23 $\pm$ 1,11 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 9 - Média $\pm$ EPM do crescimento folicular diário dos quatro maiores folículos (F1, F2, F3 e F4) nos diferentes grupos (experimento 1).

Grupo	Crescimento folicular diário durante o tratamento do			
	F1	F2	F3	F4
F20-23mm 6mg	3,07 $\pm$ 0,27	2,40 $\pm$ 0,31 ^a	2,15 $\pm$ 0,26	1,00 $\pm$ 0,26
D8-6mg	2,84 $\pm$ 0,23	1,93 $\pm$ 0,22 ^a	1,33 $\pm$ 0,23	0,80 $\pm$ 0,27
F20-23mm 8mg	2,73 $\pm$ 0,29	2,08 $\pm$ 0,34 ^a	1,87 $\pm$ 0,35	1,63 $\pm$ 0,37
D8-8mg	2,90 $\pm$ 0,32	2,41 $\pm$ 0,10 ^a	1,48 $\pm$ 0,22	0,89 $\pm$ 0,37
F20-23mm Salina	2,03 $\pm$ 0,26	0,59 $\pm$ 0,15 ^b	0,38 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,06

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 10 - Média $\pm$ EPM do crescimento folicular diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) nos diferentes grupos (experimento 2).

Grupo	Crescimento folicular diário durante o tratamento do		
	F1	F2	F3
F20-23mm 12,5mg	4,45 $\pm$ 0,30 ^b	3,94 $\pm$ 0,29 ^b	2,37 $\pm$ 0,47
D6-12,5mg	2,61 $\pm$ 0,18 ^a	2,43 $\pm$ 0,17 ^a	1,45 $\pm$ 0,25
F20-23mm Salina	3,73 $\pm$ 0,30 ^b	2,27 $\pm$ 0,40 ^a	1,47 $\pm$ 0,25

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

6. DISCUSSÃO

As éguas submetidas a tratamentos superovulatórios sofrem influência de fatores determinantes como momento do ciclo estral, população folicular presente no início do tratamento, dose e frequência das gonadotrofinas utilizada. Tais variáveis influenciam na resposta ovariana ao tratamento quanto ao número de folículos préovulatórios, ovulações, taxa de recuperação embrionária por égua e por ovulação, assim como, no tempo do tratamento hormonal.

Orlandi (2008) obteve melhor resposta quando iniciou o tratamento com 12,5 mg de EPE duas vezes ao dia no momento em que o maior folículo da onda atingia o diâmetro entre 20 e 23 mm.

O número de folículos das categorias 17 a 19,9 mm e 20 a 23 mm no início do tratamento com EPE não refletiu em aumento do número de folículos maiores que 30 mm no momento da aplicação de hCG e nem no número de ovulações. Pois, a população média dos folículos nas categorias F20-23mm 6mg, F20-23mm 8mg (experimento 1) e F20-23mm 12,5 mg (experimento 2) foram similares no início do tratamento, entre os grupos dos respectivos experimentos. Apesar do número de folículos nas duas categorias ser numericamente inferior no grupo F20-23mm 8mg, em relação ao de 6 mg no início do tratamento, observou-se maior número de folículos >30mm no grupo F20-23mm 8mg em relação ao F20-23mm 6mg ou controle ($P<0,05$). Portanto, atribui-se essa diferença à maior dose de EPE utilizada, muito embora não tenha refletido em maior número de ovulação, apenas em relação ao controle (Tabela 1). A mesma observação foi feita no experimento 2, onde observou-se uma população folicular numericamente inferior à dos grupos F20-23mm 6mg e F20-23mm 8mg (experimento 1), no início do tratamento com 12,5mg de EPE. Porém, com resposta maior numericamente quanto ao número de ovulações ($2,70 \pm 0,40$) (Tabela. 8). Ao analisar os resultados do grupo D8-8mg (exp 1), o número de folículos de 20 a 23mm foi significativamente menor que nos grupos F20-23mm 6 e 8 mg, mas o número de folículos >30mm no momento da indução da ovulação foi similar, não refletindo superioridade no número de ovulações, o que reforça a nossa afirmativa (Tab.1).

Diversas pesquisas têm demonstrado que a resposta ovulatória é dose dependente (ALVARENGA *et al.*, 2001; SCOGGIN *et al.*, 2002, MEIRA *et al.*, 2008). Os autores citados utilizaram doses de 12,5 a 50mg, uma ou duas vezes ao dia e são unânimes em relacionar as maiores doses com maior número de ovulações, entretanto

não reflete em maior número de embriões por ovulação. Carmo *et al.* (2006) relacionaram essa queda na recuperação a uma disfunção da captação do oócito pelas fimbrias da tuba uterina, devido a presença de um coágulo sanguíneo formado na fossa de ovulação em éguas superovuladas. No presente trabalho, foi observado menor taxa de embriões/ ovulação nos grupos tratados com 8mg (37,5% e 34%) para os grupos F20-23mm 8mg e D8-8mg, respectivamente (exp 1). Isso pode ser atribuído a variação dos padrões de sêmen utilizado no experimento 1. Para as éguas do experimento 2 que receberam 12,5 mg de EPE, o número de embriões recuperados/ovulação foi de 31% (F20-23 12,5mg) e D6-12,5mg (38%). Essa baixa recuperação embrionária por ovulação pode ser devido ao manejo instituído no local do experimento. A melhor porcentagem de embriões/ovulação foi observada no grupo F20-23mm 6 mg (79%) do experimento 1.

O número de ovulações no grupo D8-6mg foi o menor ($1,38 \pm 0,18$) de todos os grupos tratados, e similar ao controle ($P \geq 0,05$), possivelmente devido ao número de folículos com diâmetro de 20 a 23 mm mais baixo no início do tratamento, deve-se ter cautela em atribuir o baixo resultado à população folicular no presente estudo. Outros dois fatores podem ter contribuído a dose utilizada e uma égua com folículo (31 mm) de diestro foi utilizada nesse grupo, ocorrendo apenas uma ovulação. O início dos tratamentos para indução de múltiplas ovulações em éguas com dominância folicular já estabelecida, evidenciam resultados aquém do esperado. Orlandi (2008) obteve o pior índice de ovulação quando tratou éguas com 12,5 mg de EPE duas vezes ao dia na presença de folículos com diâmetro superior a 26 mm em onda folicular induzida pela aspiração e atribuiu à presença do folículo mencionado.

Para alguns folículos da onda atingir o diâmetro entre os 20 e 23 mm a partir do momento da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no experimento 1 foi necessário um intervalo de $3,56 \pm 0,51$, $2,50 \pm 0,28$ e $3,38 \pm 0,65$ dias nos grupos F20-23mm 6mg, F20-23mm 8mg e F20-23mm Salina, respectivamente. Observa-se no grupo F20-23mm 8mg um intervalo mais curto, porém não significativo. Atribui-se tal fato a uma égua do grupo que apresentava dois folículos entre 20 e 24 mm de diâmetro no momento da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, portanto o tratamento com EPE foi iniciado no mesmo momento, sendo considerado intervalo zero para efeito da análise estatística. Em outras três éguas (37,5%) do mesmo grupo, detectou-se uma população de quatro folículos da onda com diâmetro de 17 a 20 mm, também no dia da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, cujos animais atingiram o diâmetro folicular proposto para o início do tratamento com EPE, um a dois dias mais tarde.

Ademais, no experimento 2, o intervalo em dias requerido para os folículos alcançarem o diâmetro entre 20 e 23mm, foi em média de $3,60 \pm 0,58$ (F20-23mm 12,5mg) e $3,30 \pm 0,37$ (F20-23mm Salina), não sendo diferente do experimento 1.

A duração dos tratamentos convencionais utilizando-se uma ou duas doses diárias de 12,5 a 50 mg de EPE, com início do tratamento no dia 5 ou 7 após ovulação e mantendo até a presença de folículos com 35 mm de diâmetro encontra-se ao redor de 8 dias (SCOGGIN *et al.*, 2002; ALVARENGA *et al.*, 2001), maior que o obtido no presente estudo para os grupos F20-23 mm - 6, 8 e 12,5mg e similar aos grupos D8 – 6 e 8mg e D6-12,5mg .

A duração média do tratamento, bem como o número de administrações da EPE para os grupos F20-23 - 6 e 8mg e F20-23 salina do experimento 1 e F20-23mm 12,5mg e F20-23 salina do experimento 2, foi menor ($P < 0,05$) que para os grupos cujo os tratamentos iniciaram em D8 e D6. O uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$, aguardando-se o crescimento dos folículos da onda atingir diâmetro entre 20 e 23 mm para iniciar o tratamento objetivando a redução do tempo de tratamento, manteve boa resposta ovariana tanto para a baixa dose utilizada, visando obter ovulação dupla, quanto para a dose convencional de 12,5 mg.

Observou-se resultado mais expressivo em relação ao número de folículos $>30\text{mm}$ e número de ovulações no grupo F20-23–8mg. Porém foi similar na taxa de recuperação embrionária (Tabela 1), neste caso outros fatores de interferência no índice de recuperação embrionária devem ser considerados, como a não padronização do sêmen utilizado. Por se tratar de um programa comercial de TE, o sêmen foi obtido de diferentes garanhões, bem como a avaliação, diluição e refrigeração foi realizada por diferentes técnicos, não respeitando um padrão em termos de qualidade, outro fator importante trata-se da idade das doadoras, que variou de cinco a 24 anos, o que pode ter interferido, pois a éguas mais velhas tendem a apresentar fertilidade mais baixa.

O experimento 2 apresentou resultados satisfatórios quanto ao número de folículos $>30\text{mm}$ e número de ovulações, porém, a taxa de recuperação embrionária/ovulação dos grupos tratados foi similar ao grupo controle (34 %). Todavia, o dia da coleta dos embriões foi realizada 6 dias após a detecção da primeira ovulação. Meira *et al.* (1993) e Ferreira *et al.* (1997) não detectaram diferença no número de embriões coletados seis ou sete dias após a ovulação.

Outro fator que pode estar relacionado a baixa taxa de recuperação embrionária em éguas superovuladas, é a presença de altos níveis de LH séricos, que poderiam levar

a uma alteração da maturação oocitária (HYTTEL *et al.*, 1991). Ademais, Carmo *et al.*, (2006) observaram atraso no desenvolvimento embrionário em éguas superovuladas, e sugeriram que o atraso na maturação dos oócitos no momento da ovulação poderia se relacionar a baixa recuperação embrionária.

Os resultados obtidos neste estudo quando o tratamento foi iniciado no momento que os folículos da onda após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, atingiram 20 a 23 mm estão de acordo com os resultados obtidos por Orlandi (2008) e permitiu redução do tempo de tratamento, mantendo resposta ovulatória satisfatória e consequentemente redução de custo.

O intervalo entre a aplicação de hCG e a detecção da primeira ovulação variou de $1,31 \pm 0,16$ a $3,19 \pm 0,60$ dias, no experimento 1, sendo observado intervalo significativamente maior nos grupos D8-6mg e F20-23-8 mg. Uma vez que a literatura menciona o ocorrência da ovulação entre 24 a 48 após a indução com hCG, o maior tempo necessário para a detecção da primeira ovulação após a indução nesses dois grupos foi atípico. No grupo D8 - 6mg um grande intervalo foi observado para a ocorrência da primeira ovulação em 37,5% (3/8) das éguas após indução, sendo que uma demorou quatro dias e as outras duas éguas seis dias após aplicação do hCG para ovularem. No grupo F20-23mm 8mg 12,5% (1/8) das éguas tiveram a ovulação detectada seis dias após a aplicação do hCG. A não resposta desses animais ao hCG refletiu em maior tempo médio para a detecção da primeira ovulação nesses dois grupos, cuja causa não foi determinada. O experimento 2, não apresentou variação ($P < 0,05$) entre os grupos, tendo a média entre $2,44 \pm 0,30$ e $2,60 \pm 0,22$.

A diferença no diâmetro máximo do maior folículo ao fim do tratamento, apresentando-se menor para os grupos F20-23 - 8mg e controle (Tab. 2) deve-se a variação do intervalo do último tratamento até o momento da aplicação do hCG (fol $\geq 35\text{mm}$). Orlandi (2008) observou um intervalo entre 22 a 30 horas entre o final do tratamento até administração de hCG, intervalo reduzido quanto comparado ao encontrado por Welch *et al.* (2006) quando utilizaram a dose de 12,5 ou 25 mg de eFSH e interrompeu o tratamento quando os folículos alcançavam o diâmetro de 32 mm, para realizar o “coasting” e induziu as éguas na presença de folículos de 35 mm. Eles denominaram de coasting esse intervalo entre a última aplicação de eFSH e a aplicação do indutor de ovulação. Entretanto, a presença de LH no EPE, que é responsável pela maturação final e ovulação (GASTAL *et al.*, 2000) pode ter sido um fator favorável ao menor tempo de tratamento observado por Orlandi (2008).

A similaridade na taxa de crescimento diária entre os grupos para o F1, F2, F3 e F4 ocorreu de acordo com o esperado para o experimento 1. Os dois maiores folículos (F1 e F2) cresceram dois a três mm por dia, similar aos resultados de estudos que avaliaram o desenvolvimento do folículo dominante em ondas induzidas pela aspiração folicular (GASTAL *et al.*, 1999a). A baixa dose de EPE utilizada foi suficiente para estimular o desenvolvimento do F2, na maioria das éguas, porém não exerceu ação sobre o F3 e F4. Já a dose de 12,5 mg foi eficiente em estimular o crescimento do F3 evidenciando uma diferença numérica entre os grupos tratados e o grupo controle.

O diâmetro máximo alcançado pelo F2 no experimento 1 foi superior nos quatro grupos tratados com EPE comparado ao controle, pois o tratamento com EPE estimula o desenvolvimento de folículos que se tornariam subordinados, como ocorreu no grupo controle. No experimento 2, houve essa diferença entre os grupos tratados com EPE e solução salina para o F2 e F3.

O número de ovulações do grupo Fol20-23mm 6mg ($1,75 \pm 0,16$) foi similar ao encontrado por Farinasso (2004) $1,84 \pm 0,58$ ao utilizar a mesma dose. Entretanto, somente 37,5% (3/8) das éguas do grupo D8-6mg apresentaram dupla ovulação, o que levou a uma média de ovulações de $1,38 \pm 0,18$ similar à do grupo salina ($1,00 \pm 0,00$).

A resposta ovulatória diante a utilização de 8mg de EPE foi considerada adequada, visto que 75% (6/8) das éguas dos dois grupos responderam com dupla ovulação.

7. CONCLUSÕES

O tratamento com baixa dose de EPE (6 ou 8mg) aumentou o número médio de folículos >30mm e de ovulações quando iniciado na presença de folículos com diâmetro médio entre 20 e 23mm após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, especialmente quando se utiliza 8mg.

Quando se inicia a estimulação ovariana com EPE no momento que os folículos atingem 20 a 23mm de diâmetro posterior a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ reduz-se o tempo de tratamento, tanto para uso de baixas doses como para a dose convencional (12,5 mg) e consequentemente o número de administrações do hormônio mantendo-se resposta ovariana satisfatória.

O intervalo entre a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o início do tratamento com EPE é similar quando realizado no sexto ou oitavo dia após a ovulação.

Embora o número de embriões por ovulação tenha se mantido similar entre os grupos tratados, resultou no dobro de embriões recuperados por colheita em relação ao controle, demonstrando o benefício do tratamento preconizado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLEN, W.R. Embryo transfer in the horse. In: Adams CE (Ed), **Mammalian Egg Transfer**. CRC Press, Boca Raton, FL, p.135-154, 1982.

ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. **Theriogenology**, v. 56, 879-887, 2001.

BEG, M.A.; MEIRA, C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.847-854, 2003.

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

CARMO, M.T.; LOSINNO, L.; AQUILAR, J.J.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.337-339, 2006.

CASTELLANO, J.M., Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castaño JP, Malagón MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M.. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat,. **Molecular and Cellular Endocrinology** v .26 p.257–258, 2006.

CONE, RP; LOW, MJ; ELMQUIST, JK; CAMERON, JL. Neuroendocrinology. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Williams Textbook of Endocrinology, Philadelphia: Saunders, p 81- 176, 2003.

COLLEGE, WH. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling, Trends in **Endocrinology and Metabolism**, v. 20, p.115-121, 2008.

CULLINGFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; SEIDEL, G.E. Attempts at Superovulation of Mares With Porcine Follicle Stimulating Hormone and Recombinant Equine Follicle Stimulating Hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, p.305-309, 2010.

DAVIDSON, T.R.; CHAMBERLAIN, C.S.; BRIDGES, T.S.; SPICER, L.J. Effect of follicle size on in vitro production of steroids and insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and the IGF-binding proteins by equine ovarian granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 1640-1648, 2002.

DE LUCA, C.A.; McCUE, P.M.; PATTEN, M.L.; SQUIRES, E.L. Comparison of three doses of reFSH for superovulation of mares. **Theriogenology**, v.70, p.587, 2008.

DINGER, J.E., NOILES, E.E., BATES, M.J.L. Ovarian activity in progesterone treated mares following administration of pregnant mare serum gonadotropin. **Theriogenology**, v.17, p.305-311, 1982.

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Changes in concentrations of Follicular Fluid During Follicle Selection in Mares. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1111-1118, 2002.

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

FARINASSO, A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2004, 60p. Dissertação de Mestrado.

FERREIRA, J.C.P.; MEIRA, C.; PAPA, F.O.; LANDIN e ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A; BURATINI, J. Cryopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2 propanediol. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p.88-93, 1997.

FERRIS, AH; SHUPNIK, MA. Mechanisms for Pulsatile Regulation of the Gonadotropin Subunit Genes by GNRH1. **Biology of Reproduction**, v.74, p 993-998, 2006.

FORTUNE, J.E., KIMMICH, T.L. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15(Suppl), p.95-98, 1983.

GASTAL E.L., GASTAL M.O, NOGUEIRA, G.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Temporal interrelationship among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.56, p.925-940, 2000.

GASTAL E.L., GASTAL M.O., GINTHER O.J. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 724-630, 1999a.

GASTAL E.L., GASTAL M.O., WILTBANK M.C., GINTHER O.J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 31-39, 1999b.

GASTAL, E.L.; BERGFELT D.R.; NOGUEIRA, G.P.; GASTAL M.O., GINTHER O.J. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v.61, p. 1492-1498, 1999c.

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

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

GINTHER O.J.; GASTAL E.L.; GASTAL M.O.; BEG M.A. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 417-423, 2008.

GINTHER O.J.; GASTAL E.L.; GASTAL M.O.; BEG M.A. Review Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovulatory Hormones: What's New? **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n° 8, 2008.

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, 2007.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., MEIRA, C; KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 99-105, 2004.

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, 2005.

GINTHER O.J.; BEG, M.A.; DONADEUX, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; WOODS B.G.; MEIRA C.; BEG M.A.; BERGFELT D.R. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 126, p. 653-660, 2003.

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

GINTHER, O.J.; KOT, L.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

GINTHER O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**. V.99, p. 105-111, 1993.

GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. Cross Plains: Equiservices, 1992.

GINTHER O.J.; BERGFELT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.119-126, 1990.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BÉZARD, J.; GÉRARD, N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction**, v.64,p.1120-1127, 1999.

GUERRA, P.; MEDEIROS S.A.F Setor Equino Movimenta R\$ 7,3 Bilhões por Ano: an update. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2006. Disponível em:< <http://www.cna.org.br/site/noticia.php?ag=0&n=14684>>. Acesso em: 05 agos. 2008.

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, A.L. Induction of ovulation in anestrous mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Animal.Journal.and Veterinary Research.**, v.47, n.5, p.983-986, 1986.

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

LAPIN, R., GINTHER, O.J Induction of Ovulation and Multiple Ovulations in Seasonally Anovulatory and Ovulatory Mares with an Equine Pituitary Extract **Journal of Animal Science**.v.44,p.834-842, 1977.

LOSINNO, L.; VOLLENWEIDER, A.; CASTAÑEIRA, C.; PASQUALINI, S. Superovulation en yeguas con gonadotrofina menopausica humana (hMG). Resultados preliminares.**Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, Suppl. 3, p.1224, 2007.

McCUE, P.M.; LOGAN, N.L.; ALONSO, M.A.; SQUIRES, E.L. Superovulation of mares: Effects of eFSH treatment during consecutive or alternate cycles and as short-

term therapy before follicle divergency. **Animal Reproduction Science**, v.94, p. 404-407, 2006.

McCUE, P.M. Superovulation. **Vet. Clin. North Amer. Equine Practice**. v.12, n.1, p.1-11, 1996.

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

MEIRA, C.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; OBA, E.;LANDIM e ALVARENGA, F.C. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2 propanediol as cryoprptectants. **Equine Veterinary Journal**.v. 15, p.64-66, 1993.

MEIRA, C; IGNÁCIO, F.S.; FERREIRA, J.C.P.;MONTECHIESI, D.F., BICUDO, S. Estado da Arte na Reprodução Equina Assistida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, Suppl. 2, p187-198, 2008.

MEYERS-BROWN, G.; BIDSTRUP, L.; FAMULA, T.; COLGIN, M.; ROSER, J.F. Increasing embryo recovery from superovulating mares through the use of recombinant equine follicle stimulating hormone and recombinant equine luteinizing hormone, **Animal Reproduction Science**, v. 121s, p.56-57, 2010.

NAVARRO, V.M. et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v.146, p. 1689–1697, 2005.

ORLANDI, C.M.B Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas cíclicas, submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária equina (EPE). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2008, 68p. Dissertação de Doutorado.

ROCHA FILHO, A.N. Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária ou FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005, 70p. Dissertação de Mestrado.

ROSAS C.A., ALBERIO R.H., BARAÑAO J.L., AGÜERO A., CHAVES M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, v. 49, p. 1257-1264, 1997.

ROSER, J.F; MEYERS-BROWN, G.; BIDSTRUP, L.; SIBLEY, L.; DAPHNA-IKEN, D.; JABLONKA-SHARIFF, A.; BOIME, I.; COLGIN, M. The embryo-to-ovulation ratio and hormone profiles in superovulated mares treated with recombinant equine FSH. In: Proceedings from the 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer; Cambridge, UK; 2008: 62–64.

SCHNEYER, A.L.; FUJIWARA, T.; FOX, J.; WELT, C.K.; ADAMS, J.; MESSERLIAN, G.M.; TAYLOR, A.E. Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 85, p. 3319-3330, 2000.

SCOGGIN C.F., MEIRA C., MCCUE P.M., CARNAVALE E.M., NETT T.M., SQUIRES E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 151-164, 2002.

SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna e granulosa cells. **Endocrinology**, v. 128, p. 1159-1166, 1991.

SMITH JT, CUNNINGHAM MJ, RISSMAN EF, CLIFTON DK & STEINER RA Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, p. 3686–3692. 2005.

SQUIRES, E.L *et al.* A review on the use of EFSH to enhance reproduction performance. In: **49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, New Orleans, Louisiana, 2003.

SQUIRES , E.L.; McCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91-104, 1999.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin 8**. Colorado State University, Fort Collins, CO, pp.24-26, 1995.

SQUIRES, E.L., GARCIA, M.C., GINTHER, O.J., VOSS, J.L., SEIDEL, G.E. Jr. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulation hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26,p.661-670,1986.

WRATHALL, J.H.M.; KNIGHT, P.G. Effect of inhibin related peptides and estradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v.145, p.491-500, 1995.

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

WELCH S.A., BRUEMMER J.E. Exogenous eFSH, Follicle Coasting, and hCG as a novel superovulation regimen in mares. **Journal of Equine Veterinary. Science**, v. 26, n.6,p.262-270,2006.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para revista Ciência Rural (normas de publicação especificadas no Anexo 1).

RESPOSTA OVARIANA EM ÉGUAS TRATADAS COM BAIXA DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE)

OVARIAN RESPONSE IN MARES TREATED WITH LOW DOSE OF EQUINE PITUITARY EXTRACT (EPE)

GIMENES, A.M., **RESPOSTA OVARIANA EM ÉGUAS TRATADAS COM BAIXA DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE)**. Botucatu, 2010. Xp. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo visou avaliar a resposta ovariana e a taxa de recuperação embrionária em éguas tratadas com EPE nas doses de 6, 8 e 12,5 mg sendo o tratamento iniciado após a aplicação de prostaglandina F2 α com a finalidade de reduzir o tempo e custo do tratamento. Foram realizados dois experimentos, para o experimento 1, 40 ciclos estrais de éguas Mangalarga Marchador, entre cinco e 24 anos, e para o segundo experimento 30 ciclos estrais de éguas mestiças entre quatro e 12 anos de idade, foram utilizados. Foi aplicada 7,5 mg i.m. de prostaglandina F2 α (Dinoprost Trometamina) no oitavo (experimento 1) ou sexto (experimento 2) dia após a ovulação. Nesse momento as éguas foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos para o experimento 1: (n=8 ciclos estrais/grupo): Grupo F20-23mm 6mg e F20-23mm 8mg receberam 6 e 8mg, respectivamente, de EPE por via i.m. a cada 12 horas, a partir da detecção de folículo(s) entre 20-23mm de diâmetro. Nos Grupos D8 - 6mg e D8 - 8mg foi aplicado 6 ou 8 mg de EPE, respectivamente, a cada 12 horas por via i.m. a partir do D8 (concomitante a

27 PGF2 α). No Grupo F20-23mm Salina (Controle): as éguas receberam solução salina
28 respeitando os mesmos intervalos que os grupos tratados com EPE a partir da detecção
29 de folículo(s) entre 20-23mm de diâmetro. No experimento 2, a metodologia foi similar
30 ao exp 1, contudo, as éguas receberam 12,5 mg de EPE, e o tratamento foi iniciado no
31 sexto dia após a ovulação para o Grupo D6-12,5 mg (n=9), ou quando detectou-se
32 folículo(s) entre 20-23mm, Grupo F20-23mm 12,5 mg (n=10) e F20-23mm Salina
33 (Controle, n=10). Em todos os grupos (Exp. 1 e 2) o tratamento (EPE ou salina) foi
34 mantido até 12 horas anterior a detecção de folículo(s) com diâmetro ≥ 35 mm, nesse
35 momento a ovulação foi induzida com única dose de 2500 U.I. de hCG, i.v. (Vetecor[®]).
36 As variáveis foram analisadas através da Análise de Variância de Perfil (ANOVA) teste
37 (F) seguida do teste Scott-Knott para comparação das médias, com nível de significância
38 de 5%. No momento da aplicação do hCG, o grupo F20-23mm 8mg apresentou aumento
39 ($p < 0,05$) do número de folículos > 30 mm em relação aos demais grupos (exp 1).
40 Ademais, esse aumento foi observado nos grupos tratados com EPE no experimento 2 e
41 refletiu em maior número de ovulações ($2,00 \pm 0,27$) no grupo F20-23mm 8mg (exp1) e
42 nos grupos F20-23mm 12,5mg ($2,70 \pm 0,40$) e D6 - 12,5mg ($2,33 \pm 0,37$) exp 2. Entretanto,
43 a maior porcentagem observada de embriões recuperados por ovulação foi no grupo
44 F20-23mm 6 mg (79%). O tempo de tratamento (dias) assim como o número de
45 aplicações de EPE ou solução salina foi menor ($p < 0,05$) para todos os grupos tratados a
46 partir de folículos entre 20-23 mm em ambos os experimentos. Conclui-se que o início
47 do tratamento com população folicular entre 20-23 mm foi capaz de reduzir o tempo de
48 tratamento, e a dose de 8 mg foi efetiva em promover dupla ovulação.

49 **Palavras chave: Égua, Extrato de Pituitária Equina, Superovulação**

50 GIMENES, A.M., **OVARIAN RESPONSE IN MARES TREATED WITH LOW DOSE**
 51 **OF EQUINE PITUITARY EXTRACT (EPE)**. Botucatu, 2010. Xp. Dissertação
 52 (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu,
 53 Universidade Estadual Paulista.

54 **ABSTRACT**

55 The present study aimed to evaluate the ovarian response and embryonic
 56 recovery in mares treated with doses of 6, 8 and 12.5 mg of EPE. The treatment was
 57 started after application of prostaglandin F2 α to reduce the period and cost of treatment.
 58 Two experiments were conducted, for the first experiment, 40 estrous cycles of
 59 Mangalarga Marchador mares and ranged in age from 5 to 24 yrs, and for the second
 60 experiment 30 estrous cycles of crossbred mares ranged in age from four to 12 yrs was
 61 used. In the eighth (experiment 1) or sixth (experiment 2) after ovulation was applied 7.5
 62 mg i.m. of prostaglandin F2 α (Dinoprost Trometamina). In this moment, all mares in
 63 experiment 1 were randomly assigned to treatment and control groups as follows:
 64 Groups 1 and 2 (n=8 cycles/group) received 6 mg of EPE, i.m. twice daily, beginning
 65 when largest follicle (s) was (were) 20-23 mm (Group F20-23mm 6mg) or regardless of
 66 follicle size on Day 8 (Group D8 – 6 mg); Groups 3 and 4 (n=8 cycles/group), received
 67 8 mg of EPE, i.m. twice daily, beginning when largest follicle was 20-23 mm (Group
 68 F20-23 mm 8 mg) or regardless of follicle size on Day 8 (Group D8 – 8mg); Group F20-
 69 23mm Saline (Control, n=8 cycles) received saline, i.m. beginning when largest follicle
 70 (s) was (were) 20-23 mm in the same range of groups treated with EPE. In the second
 71 experiment was used the same methodology of the experiment 1, however, the mares
 72 received 12.5mg of EPE, and the treatment began in the sixth day after ovulation for the
 73 Group D6- 12.5mg (n=9), or when the largest follicle (s) was (were) 20-23 mm, Group
 74 F20-23mm 12.5 mg (n=10) e F20-23mm Saline (Control, n=10). Treatments with EPE

or saline continued until 12 hours before detection of follicle (s) reached 35 mm, at which time a single dose of hCG (2500 U.I., i.v., Vetecor[®]) was given. Groups were compared using ANOVA and mean differences among groups were located with Scott-Knott Test. There was an effect of group ($P < 0.05$). In the moment of hCG, the group F20-23mm 8mg had largest follicle number $> 30\text{mm}$ ($p < 0.05$) compared with the others groups (exp 1). Furthermore, this increased occurred in the groups receiving EPE in experiment 2, and reflected in an increase of the numbers of ovulations ($2,00 \pm 0,27$) in the group F20-23mm 8 mg (exp1) and in the groups F20-23mm 12,5mg ($2,70 \pm 0,40$) e D6 - 12,5mg ($2,33 \pm 0,37$) exp 2. Nevertheless, the higher percentage of embryo recovery was of group F20-23mm 6 mg (79%). The period of treatment (days) as well as the number of EPE or saline application was lesser ($p < 0.05$) for all the groups treated with follicles of 20-23 mm in both experiments. It is concluded that the starting the treatment with follicle population between 20-23 mm was able to reduce treatment period, and 8 mg dose was effective in promoting double ovulation.

Key words: Equine Pituitary Extract, Mare, Superovulation

10. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O agronegócio do cavalo movimenta R\$ 7,3 bilhões por ano gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no Brasil. O plantel equino do país ocupa a terceira posição no ranking mundial, com 5,9 milhões de animais (GUERRA & MEDEIROS, 2006). Sob essa perspectiva o mercado equino aprimora-se diariamente produzindo animais geneticamente superiores ao longo das gerações. Para acompanhar esse desenvolvimento, a reprodução assistida utiliza biotécnicas visando incrementar a eficiência reprodutiva desses animais. Desse modo, diversos protocolos de superovulação são estudados a fim de aperfeiçoar a técnica para obter um maior número

de embriões por coleta, o que contribui nos programas de transferência de embriões (TE).

Superovulação

A indução de múltiplas ovulações visa aumentar o número de embriões por coleta, por selecionar maior número de folículos de uma mesma onda folicular (ORLANDI, 2008).

Um protocolo eficiente que promova a superovulação trará benefícios para o mercado de transferência de embriões, diminuindo o custo por embrião coletado e promovendo melhor aproveitamento das receptoras que tornam onerosos os programas de TE. As respostas mais eficientes na espécie eqüina são obtidas quando utilizado o Extrato de Pituitária Eqüina (EPE) ou FSH eqüino purificado (eFSH) (ROSAS *et al*, 1997).

Visando avaliar os efeitos de baixa dose de EPE e eFSH sobre o desenvolvimento folicular, taxa de ovulação e de recuperação embrionária, Rocha Filho (2005) utilizou doses de 4 mg de EPE e 5 mg de eFSH uma vez ao dia, detectando maior número de folículos ≥ 30 mm ($1,7 \pm 0,2$) em relação ao controle ($1,2 \pm 0,1$) para o tratamento com EPE. Esse tratamento promoveu uma resposta de duas ou mais ovulações em 30,8% (4/13) das éguas tratadas. Todavia, esse aumento na categoria de folículos >30 mm não refletiu em um aumento do número de folículos pré-ovulatórios e nem no número de ovulações por égua, a baixa resposta foi atribuída heterogeneidade da população folicular no início do tratamento.

Farinasso (2004) obteve melhores resultados na porcentagem de ovulações múltiplas em seu experimento com baixas doses de EPE. Neste experimento, foram utilizados 2 mg, 4 mg e 6 mg de EPE uma vez ao dia para induzir múltiplas ovulações em éguas, o ciclo anterior de cada égua representou o grupo controle sem tratamento. As éguas apresentaram $1,17 \pm 0,39$, $1,92 \pm 0,64$ e $1,84 \pm 0,64$ ovulações após o tratamento com 2 mg, 4 mg ou 6 mg ao dia, respectivamente. O resultado indica que o tratamento

124 utilizando foi superior ao ciclo controle, podendo ser utilizado para aumentar o número
125 de ovulações. A maior incidência de ovulações múltiplas encontradas por Farinasso
126 (2004) ao utilizar 4 mg de EPE foi atribuída à população folicular mais homogênea no
127 início do tratamento. A ampliação do conhecimento em relação às variáveis
128 mencionadas, aliado a utilização de doses mais baixas visando um menor número de
129 ovulações e a coleta de um embrião por égua em média, justificou a realização da
130 presente pesquisa

131 11. MATERIAL E MÉTODOS

132 O experimento 1 foi realizado no Haras Fazenda das Águas JM, localizado no
133 município de Tijucas do Sul- PR (Latitude 25°S e Longitude 49° O) no km 639 da BR
134 376. Foram utilizados 40 ciclos estrais de 14 éguas da raça Mangalarga Marchador com
135 idade entre cinco e 24 anos, ciclando regularmente e com bom escore corporal. Para o
136 experimento 2 foram utilizados 30 ciclos estrais de éguas mestiças com idade entre
137 quatro e 12 anos, com bom escore corporal e histórico reprodutivo normal. Os animais
138 do foram mantidos no Posto de Monta da Fazenda do Lageado UNESP – Botucatu, São
139 Paulo (Latitude 22° 53'09'' e Longitude 48°26'42'') Os animais do experimento 1 e 2
140 foram mantidos em piquetes e alimentados com feno de coast cross (*Cynodon dactylon*),
141 suplementados com ração concentrada sal mineral e água *ad libitum*.

142 As éguas foram avaliadas por meio de palpação e ultrassonografia transretal
143 utilizando aparelho de ultrassom Aloka modelo 500 com transdutor linear de 5 MHz
144 para acompanhamento do desenvolvimento folicular e detecção do dia da ovulação. O
145 dia da ovulação foi considerado o dia zero (D0). No oitavo dia (D8) e sexto (D6) as
146 todas as éguas do experimento 1 e 2, respectivamente, receberam 7,5 mg de PGF_{2α}
147 (Dinoprost Trometamida) i.m.. Em seguida, foram distribuídas aleatoriamente em cinco

148 grupos para o experimento 1 e três grupos para o experimento 2.de acordo com os
149 tratamentos descritos a seguir:

150 **Grupo F20-23mm 6 mg (n=8) e Grupo F20-23mm 8 mg(n=8)** – As éguas
151 foram tratadas com 6 mg e 8 mg, respectivamente de EPE por via i.m. com intervalo de
152 12 horas entre as aplicações, iniciando-se a partir do momento que o maior folículo
153 apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm;

154 **Grupo D8-6mg(n=8) e Grupo D8-8mg(n=8)** – As éguas receberam 6 mg e 8
155 mg, respectivamente de EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações a
156 partir de D8, iniciando-se concomitante à aplicação da PGF2 α .

157 **Grupo F20-23mm Salina (Controle) (n=8)** - As éguas receberam solução salina
158 a 0.9% (Solução fisiológica) por via i.m. com intervalo de 12 horas a partir do momento
159 que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm.

160 Os grupos do experimento 2 foram:

161 **Grupo F20-23mm 12,5 mg (n=10)** – As éguas foram tratadas com 12,5 mg de
162 EPE por via i.m. com intervalo de 12 horas entre as aplicações, iniciando-se a partir do
163 momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm;

164 **Grupo D6-12,5mg (n=9)** – As éguas receberam 12,5 mg de EPE por via i.m.
165 com intervalo de 12 horas entre as aplicações a partir de D6;

166 **Grupo F20-23mm Salina (Controle) (n=10)** - As éguas receberam solução
167 salina a 0,9% (Solução fisiológica) por via i.m. com intervalo de 12 horas a partir do
168 momento que o maior folículo apresentou diâmetro entre 20 e 23 mm.

169 Em todos os grupos o tratamento com EPE ou salina continuou até a detecção de
170 um ou mais folículos com diâmetro de até 34,9 mm, sendo então interrompido. Na
171 avaliação seguinte e coincidindo com a detecção de pelo menos um folículo ≥ 35 mm, foi

172 aplicado dose única de 2500 U.I. de hCG, por via i.v. (Vetecor[®] Calier) para induzir o
173 processo de ovulação.

174 A partir do momento da aplicação de PGF_{2α} as éguas foram examinadas com
175 intervalos regulares de 24 horas através de palpação e exame ultrassonográfico
176 transretal, visando acompanhar o crescimento folicular e diagnosticar o momento da
177 ovulação. Em cada exame, mensurou-se o diâmetro dos quatro maiores folículos para o
178 experimento 1 e dos três maiores para o experimento 2, determinando-se o maior
179 folículo como F1, segundo, terceiro e quarto maiores como F2, F3 e F4,
180 respectivamente. As ovulações foram detectadas pela evacuação do fluido de um ou
181 mais folículos. Nos dois experimentos as éguas foram inseminadas 12 e 36 horas após a
182 aplicação do hCG, ou até a detecção de pelo menos duas ovulações sendo as
183 inseminações realizadas a cada 24 horas. Em ambos os experimentos o sêmen utilizado
184 foi diluído em extensor a base de leite desnatado, resfriado por até 24 horas e
185 transportado. A dose inseminante variou de 500×10^6 a 1×10^9 espermatozóides móveis
186 pré resfriamento. As éguas foram submetidas à colheita de embriões no oitavo dia após a
187 detecção da primeira ovulação no experimento 1 e no sexto dia após a ovulação no
188 experimento 2.

189 Para análise foi utilizada Análise de Variância de Perfil (ANOVA) teste (F)
190 seguida do teste Scott-Knott para comparação das médias, com nível de significância de
191 5%. Para análise do acompanhamento do desenvolvimento folicular diário os dados
192 foram normatizados para o dia da indução da ovulação e tabulados retroativamente,
193 desse modo a análise de cada folículo ocorreu em uma fase de desenvolvimento
194 correspondente entre eles.

195 12. RESULTADOS

196 Os resultados do experimento 1 e 2 estão apresentados em forma de tabela.

197 **Tabela 1** – Média $\pm$ EPM: do número de folículos com diâmetro entre 17 e 19,9;
 198 20-23 e ≥ 25 mm no início do tratamento (EPE ou solução salina
 199 0,9%), do número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30
 200 mm no momento da indução da ovulação, do número de ovulações e do
 201 número de embriões coletados em diferentes grupos (experimento 1).

Grupos			F20-23mm	D8 - 6mg	F20-23mm	D8 - 8mg	F20-23mm
			6mg		8mg		Salina
Início do	Fol 17-19,9mm		1,25 $\pm$ 0,31	0,13 $\pm$ 0,12	1,13 $\pm$ 0,30	0,50 $\pm$ 0,35	0,88 $\pm$ 0,48
tratamento	Fol 20-23mm		1,25 $\pm$ 0,16 ^a	0,38 $\pm$ 0,18 ^b	1,00 $\pm$ 0,19 ^a	0,50 $\pm$ 0,38 ^b	1,75 $\pm$ 0,37 ^a
Momento	Fol 25-30mm		0,25 $\pm$ 0,25	0,38 $\pm$ 0,26	0,63 $\pm$ 0,26	0,63 $\pm$ 0,37	0,13 $\pm$ 0,12
do hCG	Fol >30 mm		1,50 $\pm$ 0,19 ^a	1,50 $\pm$ 0,19 ^a	2,25 $\pm$ 0,37 ^b	1,88 $\pm$ 0,12 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^a
Ovulações			1,75 $\pm$ 0,16 ^a	1,38 $\pm$ 0,18 ^b	2,00 $\pm$ 0,27 ^a	1,88 $\pm$ 0,23 ^a	1,00 $\pm$ 0,00 ^b
Embriões			1,38 $\pm$ 0,18	0,75 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,26	0,38 $\pm$ 0,18

202 Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

203 **Tabela 2** – Média $\pm$ EPM: do número de folículos com diâmetro entre 17 e 19,9;
 204 20-23 e ≥ 25 mm no início do tratamento (EPE ou solução salina
 205 0,9%), do número de folículos com diâmetro entre 25 e 29,9 mm e >30
 206 mm no momento da indução da ovulação, do número de ovulações e do
 207 número de embriões coletados em diferentes grupos (experimento 2).

Grupos			F20-23mm 12,5	D6-12,5mg	F20-23mm
			mg		Salina
Início do	Fol 17-19,9mm		1,00 $\pm$ 0,30	0,33 $\pm$ 0,24	0,60 $\pm$ 0,22
tratamento	Fol 20-23mm		1,10 $\pm$ 0,10 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	1,30 $\pm$ 0,21 ^a
Momento	Fol 25-29,9mm		0,70 $\pm$ 0,30	0,90 $\pm$ 0,39	0,50 $\pm$ 0,22
do hCG	Fol >30 mm		2,40 $\pm$ 0,50 ^a	2,11 $\pm$ 0,26 ^a	1,20 $\pm$ 0,13 ^b
Ovulações			2,70 $\pm$ 0,40 ^a	2,33 $\pm$ 0,37 ^a	1,20 $\pm$ 0,13 ^b
Embriões			0,40 $\pm$ 0,16	0,89 $\pm$ 0,42	0,40 $\pm$ 0,16

208 Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

209 **Tabela 3** – Média $\pm$ EPM do número de aplicações de EPE ou solução salina
 210 0,9% e intervalo (em dias) do início e final do tratamento (EPE ou
 211 solução salina 0,9%) em diferentes grupos (experimento 1).

Grupos	Número de aplicações de EPE ou Salina	Intervalo entre
		início e final do tratamento (dias)
F20-23mm 6mg	9,25 $\pm$ 0,90 ^a	4,62 $\pm$ 0,45 ^a
D8-6mg	13,88 $\pm$ 1,56 ^b	7,00 $\pm$ 0,83 ^b
F20-23mm 8mg	9,38 $\pm$ 1,27 ^a	4,69 $\pm$ 0,63 ^a
D8-8mg	14,63 $\pm$ 1,59 ^b	7,25 $\pm$ 0,76 ^b
F20-23mm	9,75 $\pm$ 0,82 ^a	4,88 $\pm$ 0,69 ^a
Salina		

212 Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

213 **Tabela 4** – Média $\pm$ EPM do número de aplicações de EPE ou solução salina 0,9%
 214 e intervalo (em dias) do início e final do tratamento (EPE ou solução
 215 salina 0,9%) em diferentes grupos (experimento 2).

Grupos	Número de aplicações de EPE ou salina	Intervalo entre
		início e final do tratamento (dias)
F20-23mm	10,00 $\pm$ 0,80 ^a	5,00 $\pm$ 0,40 ^a
12,5mg		
D6-12,5mg	14,22 $\pm$ 1,10 ^b	7,11 $\pm$ 0,55 ^b
F20-23mm	9,50 $\pm$ 0,83 ^a	4,75 $\pm$ 0,42 ^a
Salina		

216 Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

217 DISCUSSÃO

218 As éguas submetidas a tratamentos superovulatórios sofrem influência de fatores
 219 determinantes como momento do ciclo estral, população folicular presente no início do
 220 tratamento, dose e frequência das gonadotrofinas utilizada. Tais variáveis influenciam na

221 resposta ovariana ao tratamento quanto ao número de folículos préovulatórios,
222 ovulações, taxa de recuperação embrionária por égua e por ovulação, assim como, no
223 tempo do tratamento hormonal.

224 Segundo Woods e Ginther (1985) o número de folículos existentes no dia do
225 início do tratamento está diretamente relacionado com o número de ovulações dos
226 animais submetidos a tratamentos superovulatórios. Orlandi (2008) obteve melhor
227 resposta quando iniciou o tratamento com 12,5 mg de EPE duas vezes ao dia no
228 momento em que o maior folículo da onda atingia o diâmetro entre 20 e 23 mm.

229 O número de folículos das categorias 17 a 19,9 mm e 20 a 23 mm no início do
230 tratamento com EPE não refletiu em aumento do número de folículos maiores que 30
231 mm no momento da aplicação de hCG e nem no número de ovulações. Pois, a população
232 média dos folículos nas categorias F20-23mm 6mg, F20-23mm 8mg (experimento 1) e
233 F20-23mm 12,5 mg (experimento 2) foram similares no início do tratamento, entre os
234 grupos dos respectivos experimentos. Apesar do número de folículos nas duas
235 categorias ser numericamente inferior no grupo F20-23mm 8mg, em relação ao de 6 mg
236 no início do tratamento, observou-se maior número de folículos >30mm no grupo F20-
237 23mm 8mg em relação ao F20-23mm 6mg ou controle ($P<0,05$). Portanto, atribui-se
238 essa diferença à maior dose de EPE utilizada, muito embora não tenha refletido em
239 maior número de ovulação, apenas em relação ao controle (Tabela 1). A mesma
240 observação foi feita no experimento 2, onde observou-se uma população folicular
241 numericamente inferior à dos grupos F20-23mm 6mg e F20-23mm 8mg (experimento
242 1), no início do tratamento com 12,5mg de EPE. Porém, com resposta maior
243 numericamente quanto ao número de ovulações ($2,70 \pm 0,40$) (Tabela. 8). Ao analisar os
244 resultados do grupo D8-8mg (exp 1), o número de folículos de 20 a 23mm foi
245 significativamente menor que nos grupos F20-23mm 6 e 8 mg, mas o número de

folículos >30mm no momento da indução da ovulação foi similar, não refletindo superioridade no número de ovulações, o que reforça a nossa afirmativa (Tab.1).

Diversas pesquisas têm demonstrado que a resposta ovulatória é dose dependente (ALVARENGA *et al.*, 2001; SCOGGIN *et al.*, 2002), os autores citados utilizaram doses de 12,5 a 50mg, uma ou duas vezes ao dia e são unânime em relacionar as maiores doses com maior número de ovulações, entretanto não reflete em maior número de embriões por ovulação. Carmo *et al.* (2006) relacionaram essa queda na recuperação a uma disfunção da captação do oócito pelas fimbrias da tuba uterina, devido a presença de um coágulo sanguíneo formado na fossa de ovulação em éguas superovuladas. No presente trabalho, foi observado menor taxa de embriões/ ovulação nos grupos tratados com 8mg (37,5% e 34%) para os grupos F20-23mm 8mg e D8-8mg, respectivamente (exp 1). Isso pode ser atribuído a variação dos padrões de sêmen utilizado no experimento 1. Para as éguas do experimento 2 que receberam 12,5 mg de EPE, o número de embriões recuperados/ovulação foi de 31% (F20-23 12,5mg) e D6-12,5mg (38%). Essa baixa recuperação embrionária por ovulação pode ser devido ao manejo instituído no local do experimento. A melhor porcentagem de embriões/ovulação foi observada no grupo F20-23mm 6 mg (79%) do experimento 1.

O número de ovulações no grupo D8-6mg foi o menor ($1,38 \pm 0,18$) de todos os grupos tratados, e similar ao controle ($p \geq 0,05$), possivelmente devido ao número de folículos com diâmetro de 20 a 23 mm mais baixo no início do tratamento, deve-se ter cautela em atribuir o baixo resultado à população folicular no presente estudo. Outros dois fatores podem ter contribuído a dose utilizada e uma égua com folículo (31 mm) de diestro foi utilizada nesse grupo, ocorrendo apenas uma ovulação. O início dos tratamentos para indução de múltiplas ovulações em éguas com dominância folicular já estabelecida, evidenciam resultados aquém do esperado. Orlandi (2008) obteve o pior

271 índice de ovulação quando tratou éguas com 12,5 mg de EPE duas vezes ao dia na
272 presença de folículos com diâmetro superior a 26 mm em onda folicular induzida pela
273 aspiração e atribuiu à presença do folículo mencionado.

274 A duração dos tratamentos convencionais utilizando-se uma ou duas doses
275 diárias de 12,5 a 50 mg de EPE, com início do tratamento no dia 5 ou 7 após ovulação e
276 mantendo até a presença de folículos com 35 mm de diâmetro encontra-se ao redor de 8
277 dias (SCOGGIN *et al.*, 2002; ALVARENGA *et al.*, 2001), maior que o obtido no
278 presente estudo para os grupos F20-23 mm - 6, 8 e 12,5mg e similar aos grupos D8 – 6 e
279 8mg e D6-12,5mg .

280 A duração média do tratamento, bem como o número de administrações da EPE
281 para os grupos F20-23 - 6 e 8mg e F20-23 salina do experimento 1 e F20-23mm 12,5mg
282 e F20-23 salina do experimento 2, foi menor ($P<0,05$) que para os grupos cujo os
283 tratamentos iniciaram em D8 e D6. O uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$, aguardando-se o crescimento dos
284 folículos da onda atingir diâmetro entre 20 e 23 mm para iniciar o tratamento
285 objetivando a redução do tempo de tratamento, manteve boa resposta ovariana tanto para
286 a baixa dose utilizada, visando obter ovulação dupla, quanto para a dose convencional
287 de 12,5 mg.

288 Observou-se resultado mais expressivo em relação ao número de folículos
289 >30mm e número de ovulações no grupo F20-23–8mg. Porém foi similar na taxa de
290 recuperação embrionária (Tabela 1), neste caso outros fatores de interferência no índice
291 de recuperação embrionária devem ser considerados, como a não padronização do
292 sêmen utilizado. Por se tratar de um programa comercial de TE, o sêmen foi obtido de
293 diferentes garanhões, bem como a avaliação, diluição e refrigeração foi realizada por
294 diferentes técnicos, não respeitando um padrão em termos de qualidade, outro fator

importante trata-se da idade das doadoras, que variou de cinco a 24 anos, o que pode ter interferido, pois a éguas mais velhas tendem a apresentar fertilidade mais baixa.

O experimento 2 apresentou resultados satisfatórios quanto ao número de folículos >30mm e número de ovulações, porém, a taxa de recuperação embrionária/ovulação dos grupos tratados foi similar ao grupo controle (34 %). Todavia, o dia da coleta dos embriões foi realizada 6 dias após a detecção da primeira ovulação. Meira *et al.* (1993) e Ferreira *et al.* (1997) não detectaram diferença no número de embriões coletados seis ou sete dias após a ovulação.

Os resultados obtidos neste estudo quando o tratamento foi iniciado no momento que os folículos da onda após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, atingiram 20 a 23 mm estão de acordo com os resultados obtidos por Orlandi (2008) e permitiu redução do tempo de tratamento, mantendo resposta ovulatória satisfatória e consequentemente redução de custo.

O número de ovulações do grupo Fol20-23mm 6mg ($1,75 \pm 0,16$) foi similar ao encontrado por Farinasso (2004) $1,84 \pm 0,58$ ao utilizar a mesma dose. Entretanto, somente 37,5% (3/8) das éguas do grupo D8-6mg apresentaram dupla ovulação, o que levou a uma média de ovulações de $1,38 \pm 0,18$ similar à do grupo salina ($1,00 \pm 0,00$). A resposta ovulatória diante a utilização de 8mg de EPE foi considerada adequada, visto que 75% (6/8) das éguas dos dois grupos responderam com dupla ovulação.

CONCLUSÃO

O tratamento com baixa dose de EPE aumentou o número médio de folículos >30mm e de ovulações quando iniciado na presença de folículos com diâmetro médio entre 20 e 23mm após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, especialmente quando se utiliza 8mg.

Quando se inicia a estimulação ovariana com EPE no momento que os folículos atingiram 20 a 23mm de diâmetro posterior a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ reduz-se o tempo de

320 tratamento, tanto para uso de baixas doses como para a dose convencional (12,5 mg) e
321 conseqüentemente o número de administrações do hormônio mantendo-se resposta
322 ovariana satisfatória.

323 Embora o número de embriões por ovulação tenha se mantido similar entre os
324 grupos tratados, resultou no dobro de embriões recuperados por colheita em relação ao
325 controle, demonstrando o benefício do tratamento preconizado.

326

327 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

328

329 ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R.
330 Improvement of ovarian superstimulatory response and embryo production in mares
331 treated with EPE twice daily. **Theriogenology**, v. 56, 879-887, 2001.

332 CARMO, M.T.; LOSINNO, L.; AQUILAR, J.J.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA,
333 M. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction**
334 **Science**, v.94, p.337-339, 2006.

335 FARINASSO,A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de
336 ovulações múltiplas em éguas cíclicas. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina
337 Veterinária, Universidade de Brasília, 2004, 60p. Dissertação de Mestrado.

338 FERREIRA, J.C.P.; MEIRA, C.; PAPA, F.O.; LANDIN e ALVARENGA, F.C.;
339 ALVARENGA, M.A; BURATINI, J. Cryopreservation of equine embryos with glycerol
340 plus sucrose and glycerol plus 1,2 propanediol. v. 25, p.88-93, 1997.

341 GUERRA, P.; MEDEIROS S.A.F Setor Equino Movimenta R\$ 7,3 Bilhões por Ano: an
342 update. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2006. Disponível em:<
343 <http://www.cna.org.br/site/noticia.php?ag=0&n=14684>>. Acesso em: 05 agos. 2008.

- 344 MEIRA, C.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; OBA, E.; LANDIM e ALVARENGA,
345 F.C. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2 propanediol as
346 cryoprotectants. **Equine Vet Journal**.v. 15, p.64-66, 1993.
- 347 ORLANDI, C.M.B Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas
348 cíclicas, submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária equina
349 (EPE). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
350 Estadual Paulista, 2008, 68p. Dissertação de Doutorado.
- 351 ROCHA FILHO, A.N. Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária ou
352 FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação
353 embrionária em éguas. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
354 Universidade Estadual Paulista, 2005, 70p. Dissertação de Mestrado.
- 355 ROSAS C.A., ALBERIO R.H., BARAÑAO J.L., AGÜERO A., CHAVES M.G.
356 Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, v. 49, p.
357 1257-1264, 1997.
- 358 SCOGGIN C.F., MEIRA C., MCCUE P.M., CARNAVALE E.M., NETT T.M.,
359 SQUIRES E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in
360 cyclic mares. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 151-164, 2002

ANEXO

Normas de Publicação da Revista Ciência Rural

ISSN 0103-8478

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa**

envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests **Tribolium confusum** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Tenebrio molitor** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Sitophilus granarius** (Coleoptera: Curculionidae) and **Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.avis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000.

Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.