

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

INDUÇÃO DE MÚLTIPLAS
OVULAÇÕES EM ÉGUAS UTILIZANDO
BAIXAS DOSES DE ACETATO DE
DESLORELINA

JANAÍNA FERREIRA NAGAO

BOTUCATU – SP
AGOSTO 2011

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

INDUÇÃO DE MÚLTIPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS UTILIZANDO BAIXAS DOSES DE ACETATO DE DESLORELINA

JANAÍNA FERREIRA NAGAO

ORIENTADOR: Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU – SP
AGOSTO 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **SELMA MARIA DE JESUS**

Nagao, Janaína Ferreira.

Indução de múltiplas ovulações em éguas utilizando baixas doses de acetato de deslorelina / Janaína Ferreira Nagao. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: José Antônio Dell'Aqua Júnior

Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução - Aspectos farmacológicos. 2. Ovulação. 3. Égua - Reprodução.

Palavras-chave: Égua; Superovulação; Transferência de embrião.

Nome do Autor: Janaína Ferreira Nagao

Título: INDUÇÃO DE MÚLTIPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS UTILIZANDO
BAIXAS DOSES DE ACETATO DE DESLORELINA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Adj. Marco Antônio Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Adj. Júlio César Ferraz Jacob
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UFRRJ, Rio de Janeiro/RJ

Data da Defesa: 02 de Agosto de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Célia e Massaru, que sempre me apoiaram incondicionalmente e com isso demonstram a cada conquista que me amam acima de tudo.

A minha família que sempre compreendeu minha ausência nos momentos importantes.

Ao meu amor, marido e amigo André, pela força, carinho e compreensão e por ter me ajudado a seguir em frente, sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram e fizeram parte deste trabalho.

Especialmente agradeço:

Primeiramente a Deus que iluminou meu caminho até aqui e que a cada dia prova o quanto está presente em minha vida.

Ao Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior pela oportunidade e orientação ao longo deste trabalho.

A todos os professores pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos desde a residência.

Aos funcionários, residentes, estagiários e colegas de pós graduação do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo apoio e convívio.

Ao Dr. José Rodrigues Neves Neto pela oportunidade de elaboração do experimento, por fornecer espaço, animais e todo o suporte necessário. Ao Médico Veterinário Thiago Preto de Godoy pela grande ajuda e apoio na elaboração do experimento e pela amizade formada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro fornecido para realização deste projeto.

A minha família que sempre me apoiou em todos os momentos. Em especial a minha querida mãe Célia, pelo exemplo de superação e dignidade, por estar SEMPRE presente, principalmente nos momentos difíceis, mesmo à distância, sempre dedicando muito de sua vida em função da minha e ao meu pai Massaru, que NUNCA mediu esforços investindo nos meus sonhos para que estes se tornassem realidade.

Aos meus irmãos, Natacha e Marcel, que mesmo a distância me apoiaram e as minhas sobrinhas Alice e Maria Luíza, que proporcionaram e continuam proporcionando um sentimento único e muitos momentos de alegria.

Ao meu marido, amigo e acima de tudo meu amor André, que desde que entrou em minha vida não deixou que eu desanimasse, sempre me incentivando e acima de tudo me confortando com muito amor, carinho e paciência nas muitas vezes que precisei sempre se fazendo presente.

E finalmente aos animais, razão pela qual estou aqui, em especial à espécie eqüina, a qual dediquei meus últimos anos de estudo e as minhas três cadelinhas vira-latas, Tamy, Vicky e Pretinha, que nunca deixaram de me receber felizes da vida, com muitas lambidas e rabos abanando, contribuindo muito para que eu recarregasse minhas energias a cada volta pra casa. Amo vocês.

A todos meu sincero, **Muito Obrigada!!!**

**“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um tem o direito de fazer mudanças, recomeçar, e,
fazer um novo fim.”**

Legrand

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. - Tamanho em mm dos dois maiores folículos no oitavo dia do ciclo estral, número de dias até o momento da indução da ovulação, tamanho em mm dos folículos no momento da indução, número de ovulações por égua e número de embriões recuperados 25

TABELA 2. -Dados absolutos ou médios e desvios padrões das variáveis entre o grupo controle e o tratado com acetato de deslorelina para obtenção de múltiplas ovulações 27

TABELA 3. - Porcentagem da lateralidade e da recuperação embrionária de éguas que apresentaram múltiplas ovulações 28

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Ciclo estral eqüino.....	4
2.1.1 Período pré ovulatório e ovulação.....	5
2.2 Ovulações múltiplas espontâneas.....	6
2.3 Superovulação na espécie eqüina.....	6
2.4 Fatores que influenciam a resposta superovulatória.....	7
2.4.1 Início do tratamento.....	7
2.4.2 Dose e frequência das aplicações	8
2.4.3 Resposta ovariana.....	10
2.4.4 Hormônio.....	11
2.4.4.1 Extrato de Pituitária Eqüina (EPE).....	11
2.4.4.2 FSH suíno (FSHp)	12
2.4.4.3 Imunoneutralização da inibina.....	13
2.4.4.4 FSH eqüino (FSHe).....	14
2.4.4.5 FSH recombinante (FSHre).....	14
2.4.4.6 GnRH e seus agonistas.....	16
3 OBJETIVOS.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Controle Ultrassonográfico.....	18
4.3 Inseminação Artificial.....	19
4.4 Colheita de Embriões	19
4.5 Experimento 1.....	20

4.5.1 Grupos Experimentais.....	20
4.5.1.1 Grupo Controle.....	21
4.5.1.2 Grupo Tratado.....	21
4.6 Experimento 2.....	22
4.6.1 Grupos Experimentais.....	22
4.6.1.1 Grupo Controle.....	22
4.6.1.2 Grupo Tratado.....	23
4.7 Análise Estatística.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Experimento 1.....	24
5.2 Experimento 2.....	26
6 DISCUSSÃO.....	28
7 CONCLUSÃO.....	31
8 REFERÊNCIAS.....	31
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	41
10 ANEXO 1.....	54

NAGAO, J.F. **Indução de múltiplas ovulações em éguas utilizando baixas doses de acetato de deslorelina.** Botucatu. (2011) Dissertação Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo objetivou verificar a utilização do acetato de deslorelina indução de dupla ovulação em éguas. No experimento 1 as foram utilizados 16 ciclos de 8 éguas, que foram tratadas com 100 µg de acetato de deslorelina (IM) a cada 12 horas ou solução salina, partir do D8 do ciclo estral até no mínimo dois folículos atingirem 33 mm quando foi induzida a ovulação com 2500 UI de hCG. A inseminação artificial foi realizada 24 horas após a indução com 1×10^9 de espermatozóides viáveis e a colheita dos embriões foi realizada no oitavo dia após a primeira ovulação detectada. No experimento 2 foram utilizados 112 ciclos de 56 éguas, neste experimento o protocolo com o acetato de deslorelina foi iniciado somente quando foi detectado um folículo com diâmetro de 25 mm e pelo menos um segundo folículo com diâmetro $\geq 21 \pm 1$ mm nesse momento foi efetuada a aplicação de 100 µg de acetato de deslorelina (IM) a cada 12 horas ou solução salina e os demais procedimentos foram semelhantes aos descritos no protocolo do experimento 1. Para as análises estatísticas das variáveis estudadas foram utilizados os testes “t de Student” e teste Exato de Fisher. No experimento 1 apenas duas éguas do grupo tratado com acetato de deslorelina responderam com dupla ovulação. Já no experimento 2 a porcentagem de animais que responderam com dupla ovulação foi de 82% e a recuperação embrionária por ciclo foi de $1,12 \times 0,57$ no grupo tratado com acetato de deslorelina e no grupo controle, respectivamente ($p < 0,05$). O acetato de deslorelina é eficiente na indução de duplas ovulações em éguas desde que o protocolo seja iniciado com no mínimo dois folículos entre 20 e 25 mm de diâmetro nos ovários e permite uma recuperação embrionária de um embrião por lavado uterino em média.

Palavras chave: égua, acetato de deslorelina, transferência de embrião.

NAGAO, J.F. **The induction of multiple ovulations in mares using low doses of deslorelin acetate.** Botucatu. (2011) Dissertação Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to verify whether deslorelin acetate could induce double ovulation in equine mares. In Experiment 1, we studied 16 estrous cycles in eight mares treated with 100 µg of deslorelin acetate or saline intramuscularly (IM) every 12 hours from D8 of the estrous cycle until at least two follicles reached 33 mm. At this time, ovulation was induced with 2500 IU of hCG. Artificial insemination was performed using 1×10^9 viable sperm 24 hours after induction, and embryos were collected on the eighth day after ovulation was first detected. In Experiment 2, we studied 112 cycles in 56 mares. In this experiment, the deslorelin acetate protocol was initiated only after a follicle with a diameter of 25 mm and at least one second follicle with a diameter $\geq 21 \pm 1$ mm was detected, at which time 100 mg deslorelin acetate or saline was administered IM every 12 hours. The other procedures were similar to those described in Experiment 1. The variables studied were analyzed using Student's t-test and Fisher's exact test. In the first experiment, only two mares in the group treated with deslorelin acetate responded with double ovulation. In the second experiment, 82% of animals per cycle responded with double ovulation, and the embryo recovery per cycle was 1.12 and 0.57 in the group treated with deslorelin acetate and the control group, respectively ($p < 0.05$). Deslorelin acetate is effective in inducing double ovulation in mares when the protocol is initiated when at least two follicles are between 20 and 25 mm in diameter. On average, it allows for the recovery of one embryo by uterine lavage.

Keywords: mare, deslorelin acetate, embryo transfer.

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para o profissional que atua em programas de transferência de embriões em eqüinos é elevar a eficiência reprodutiva de animais de grande interesse genético (FARINASSO, 2005), isto porque a taxa de recuperação embrionária por ciclo é de 60% e com uma taxa de prenhez de 60% por transferência de embriões, são necessários 3 ciclos por doadora de embrião para se garantir uma prenhez (ALVARENGA et al., 2008)

O tratamento superovulatório recruta um maior número de folículos de uma determinada onda de crescimento folicular, estimulando seu desenvolvimento e posterior ovulação (MEIRA e BURATINI, 1998). Dessa forma, a indução de ovulações múltiplas em éguas tem como objetivo principal aumentar o número de ovulações por ciclo, melhorando os índices de recuperação embrionária e reduzindo os custos relacionados a essa técnica.

Os protocolos de superovulação em éguas, até agora desenvolvidos, têm apresentado eficiência reduzida e resultados inconsistentes. Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar os fatores que influenciam a resposta ovariana, que varia de acordo com tratamento hormonal (ROSAS et al., 1998; SCOGGIN et al., 2002), e melhorar os resultados da recuperação embrionária pois esta decresce a medida que o número de ovulações aumenta (ALVARENGA et al., 2001).

Dentre os fatores que influenciam a resposta ovariana e recuperação embrionária já foram citados na literatura: o hormônio utilizado (MCCUE et al., 1993; DIPPERT et al., 1994; ALVARENGA et al., 2003; MACHADO et al., 2003; IGNACIO et al., 2008; ROSER et al., 2008; RAZ et al., 2009), a frequência e dose das aplicações (ALVARENGA et al., 2001; CARMO, 2003; FARINASSO, et al., 2005; ALONSO et al., 2006, GIMENES et al., 2010) e o dia do início do tratamento (DIPPERT, et al., 1992; SQUIRES E MCCUE, 2006; ORLANDI, 2008).

Em relação aos hormônios utilizados, o extrato de pituitária eqüina (EPE) e o hormônio folículo estimulante eqüino purificado (FSH-e) e mais recentemente o FSH eqüino recombinante (FSH-re) são as drogas com o maior número de

estudos até o momento. Entretanto, resultados inconstantes, dificuldade de aquisição dessas drogas e algumas vezes o custo limitam uma maior difusão da superovulação na espécie eqüina.

As perspectivas para uma maior sedimentação dessa técnica junto à reprodução assistida em eqüinos são o desenvolvimento de drogas sintéticas com alta taxa de repetibilidade por tratamento, que possam promover duplas ou triplas ovulações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral eqüino

As éguas são consideradas poliéstricas estacionais, ou seja, manifestam vários ciclos estrais em um determinado período do ano, o que ocorre de setembro a março no hemisfério sul, coincidindo com os dias de maior luminosidade (GINTHER, 1992; MCKINNON & VOSS, 1992; OLIVEIRA & SOUZA, 2003).

O conhecimento da fisiologia do ciclo estral é base indispensável para o desenvolvimento de protocolos de estimulação hormonais eficientes para determinar os pontos críticos do processo. (IGNÁCIO, 2009)

A duração média do ciclo estral nos eqüinos é de 21 a 22 dias com variação de 16 a 26 dias, sendo dividido em estro (fase estrogênica) e diestro (fase progesterônica). O estro caracteriza-se pelo predomínio de estrógenos, cujas fontes são as células da granulosa de folículos ovarianos, o qual dura em média 6,5 dias. Os sinais característicos são: relaxamento cervical, presença de folículo pré-ovulatório e edema endometrial. A ovulação, que ocorre na maioria das vezes 24 a 48 horas antes do término do estro, culmina com a liberação do oócito e sua captação pela tuba uterina. O diestro é o período que vai da ovulação, à regressão do corpo lúteo (CL), há o predomínio da progesterona ($>2\text{ng/mL}$), rejeição ao garanhão, presença de CL, cérvix fechada, tensão uterina e perda de edema endometrial (BLANCHARD et al, 1998 e SAMPER, 2008).

2.1.1 Período Pré-ovulatório e Ovulação

A maioria das éguas ovula com folículo medindo 40 a 45mm, no período correspondente ao final do estro. Entretanto, apesar destes parâmetros estarem bem estabelecidos para a maioria das éguas, tanto o diâmetro folicular pré-ovulatório, bem como a duração do ciclo estral são amplamente variáveis. Algumas éguas podem ovular com um folículo de 35mm de diâmetro e com a consistência firme, considerando que outras não ovularão até que o folículo atinja 50mm (SAMPER, 1997).

Durante o período pré ovulatório, os folículos sofrem três alterações: a) o oócito sofre maturação citoplasmática e nuclear, b) ruptura da coesão entre as células do *cumulus* e as células da granulosa e c) adelgaçamento e ruptura da parede folicular externa (HAFEZ, 2000).

Nesse momento as mudanças bioquímicas que ocorrem no folículo após a estimulação do LH são: aumento na produção de progesterona, ativação de enzimas proteolíticas, aumento na síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) e F_{2α} (PGF_{2α}), aumento na síntese de prostaciclina (PGI₂) e diminuição na produção de glicosaminoglicano (PIERSON, 1992).

Próximo ao momento da ovulação o folículo cresce o suficiente para fazer uma protuberância na superfície do ovário, tanto que o estroma oferece pouca ou nenhuma resistência à ovulação. O oócito tem que passar através do epitélio folicular, da lâmina basal, teca interna, teca externa, estroma ovariano, túnica albugínea e epitélio germinativo (MCKINNON & VOSS, 1992). Ocorre o enfraquecimento da parede folicular como um todo, porém, a ruptura acontece na fossa da ovulação. A parede do folículo é reorganizada, facilitando a transformação em corpo lúteo (PIERSON, 1992).

2.2 Ovulações múltiplas espontâneas

Apesar de a espécie eqüina ser considerada monovulatória, ou seja, apenas um folículo dominante é selecionado durante cada onda folicular, algumas raças, apresentam particularidades como a incidência de múltiplas ovulações por ciclos estrais, como é o caso do Puro Sangue Inglês (15-30%), Polo Argentino (38%), Quarto de Milha (9%) e Apaloosa (8%) (SETICH, 1989, GINTHER et al., 1992; LOSINNO et al., 2000).

Segundo Hughes et al. (1972), há uma maior incidência de ovulações duplas do que tripla ou quádrupla, pois observaram que 99% de ovulações múltiplas foram duplas e apenas 1% triplas e quádruplas.

Duarte, (2003) avaliou a lateralidade das múltiplas ovulações e verificou uma maior incidência de ovulações unilaterais (70,4%) do que bilaterais (29,6%). Já Riera et al. (2006), ao avaliarem a incidência de duplas ovulações espontâneas de 1300 ciclos de éguas de Pólo, verificaram que a porcentagem de ovulações uni ou bilaterais não diferiram entre si.

Em relação à sincronia das ovulações múltiplas, Duarte (2003) verificou que 53,9% das ovulações foram sincrônicas e 46,1% assincrônicas. Sendo que a grande maioria das assincrônicas se deu num período de até 48 horas e uma porcentagem pequena ovularam com mais de 48 horas de intervalo entre as ovulações.

Com relação ao índice de recuperação embrionária de éguas com múltiplas ovulações, Riera, et al.,(2006) verificaram que as ovulações bilaterais (66%) foram significativamente maiores quando comparadas aos animais que ovularam de forma unilateral (54%). Estes autores também relatam que a quantidade de lavados com dois embriões foram maiores nas ovulações bilaterais (48%) do que nas unilaterais (35%).

2.3 Superovulação na espécie eqüina

Atualmente, a maioria das colheitas de embriões realizadas em eqüinos são de ovulações únicas e induzidas, resultando em um índice de recuperação embrionária em torno de 65% (ORLANDI, 2008). Um dos principais custos da transferência de embriões é a manutenção de receptoras que estão programadas mas não são usadas para a transferência de embrião. Um método para reduzir substancialmente o custo da T.E é aumentar o numero de

embriões recuperados por doadora, através da indução de múltiplas ovulações (SQUIRES et al., 2003).

Outras vantagens da estimulação ovariana incluem um aumento no numero de folículos que podem ser aspirados para a coleta de oócitos para fertilização in vitro ou a transferência de oócitos, além da aplicação de biotécnicas como a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) (MCCUE, 1996 e SQUIRES, et al., 2003).

Além disso, pode ser possível aumentar a taxa de prenhez de éguas subférteis por indução de ovulações múltiplas, ou talvez um aumento das taxas de prenhez de garanhões subférteis, por inseminação em éguas que têm vários folículos pré ovulatórios. Como o sêmen congelado geralmente resulta em baixa fertilidade, a inseminação em uma égua superovulada poderia aumentar as taxas de prenhez após inseminação com esse tipo de sêmen (SQUIRES, et al, 2003).

2.4 Fatores que influenciam a resposta superovulatória

Vários são os fatores que afetam a resposta superovulatória nas éguas, dentre os principais citados na literatura temos o dia do início do tratamento, a dose e freqüência de aplicação, a resposta ovariana e finalmente o tipo de substância utilizada nos tratamentos. Estes principais tópicos serão discutidos a seguir.

2.4.1 Início do tratamento

A resposta de éguas cíclicas ao tratamento superovulatório depende da população ovariana de folículos no início do tratamento, sendo que o momento ideal é no início da onda folicular, antes do aparecimento de um folículo dominante. Em geral preconiza-se que os tratamentos superovulatórios sejam iniciados entre os dias 5 e 7 pós-ovulação, período coincidente com a emergência da onda folicular primária na maioria dos animais (MEIRA E BURATINI, 1998; DIPPET et al. 1994; SCOGGIN et al. 2002).

Segundo Machado et al. (2003) existe uma correlação positiva entre a população de folículos de 16 a 20 mm de diâmetro 48 horas após o início do tratamento e o número de ovulações nos grupos tratados com EPE e FSH-e. De acordo com os autores pode-se ter uma probabilidade da resposta superovulatória pela avaliação da população folicular durante o início do tratamento.

As melhores respostas superovulatórias obtidas por Carmo (2003) utilizando EPE ocorreram quando, no início do tratamento, as éguas apresentavam folículos ovarianos variando entre 10 e 20 mm. Enquanto que em outro estudo envolvendo aspiração folicular e tratamento superovulatório com EPE, verificou-se que as melhores respostas ovarianas foram observadas quando o tratamento teve início no momento em que o maior folículo atingiu o diâmetro médio entre 20 mm e 23 mm (ORLANDI, 2008).

2.4.2 Dose e frequência das aplicações

A resposta superovulatória é afetada também pela frequência de administração e a dose utilizada. Duas aplicações diárias a cada 12 horas são mais eficientes em aumentar a taxa de ovulação e a recuperação embrionária do que somente uma (SQUIRES, 2003). Doses elevadas de EPE (25mg) aumentam o número de ovulações e embriões recuperados por lavado. Quando 25 mg de EPE foram administrados a cada 12 horas, as médias das ovulações variaram de 4,7 (SCOGGIN et al., 2002) a 7,1 (ALVARENGA et al., 2001), sendo o maior resultado uma resposta atípica em relação ao encontrado na literatura, enquanto que o uso de 12,5 mg a cada doze horas resultou em 3,4 ovulações (SCOGGIN et al., 2002).

Carmo (2003) comparou doses constantes (25 mg EPE a cada 12 horas) e decrescentes (40mg, 35mg, 30mg, 25mg, 20mg, 15 mg, 10mg, respectivamente, no primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo dia de tratamento) de EPE na indução de superovulação em éguas. O uso de doses decrescentes objetivou reduzir as concentrações de LH exógeno próximas ao momento ovulatório. Concluiu que a utilização de doses decrescentes de EPE proporcionou uma melhora numérica, embora não

significativa, de ovulações (3,5 x 5 – doses constantes e decrescentes respectivamente) e de embriões recuperados (1,2 x 1,8).

Na tentativa de induzir múltiplas ovulações em éguas com a administração de baixas doses de EPE, Farinasso et al. (2005), compararam a administração diária de 6mg, 8mg, e a administração duas vezes ao dia de 4mg. O percentual de éguas com ≥ 2 ovulações foi de 54%; 60% e 63%, respectivamente para os grupos tratados com EPE 4mg, 6mg e 8mg, e o número médio de embriões recuperados foi de 0,94; 1 e 1, respectivamente aos grupos citados anteriormente.

Ainda utilizando baixas doses de EPE e avaliando também a frequência de administração na taxa de ovulação e recuperação embrionária Alonso et al., (2006) utilizaram 6mg/duas vezes ao dia e 12mg/uma vez ao dia nos tratamentos. No tratamento de 6mg duas vezes ao dia o número de ovulações por égua não apresentou diferença em relação ao seu controle, entretanto o número de embriões por égua aumentou significativamente. No tratamento com 12mg uma vez ao dia tanto o número de ovulações quanto o de embriões por égua aumentou significativamente. Concluindo que os dois tratamentos foram efetivos em aumentar a recuperação embrionária, porém a aplicação de 12mg uma vez ao dia foi superior, aumentando a taxa de ovulação.

Com o mesmo intuito e na tentativa de diminuir o tempo de tratamento, Gimenes et al., (2010) utilizou dois protocolo de superovulação usando 6 e 8 mg de EPE a cada 12 horas e os tratamentos eram iniciados quando as éguas apresentavam o maior folículo medindo entre 20-23mm de diâmetro ou no dia oito pós ovulação independente do tamanho do folículo. Concluíram que o início do tratamento com 8mg a cada 12 horas, quando o maior folículo atingiu 20 a 23 mm foi o mais eficaz para aumentar o número de folículos > 30 mm (2,2) e ovulação (2,0) com o mínimo de dias de tratamento (4,6).

Sá et al., 2010, testaram o EPE para indução de múltiplas ovulações em éguas Mangalarga Marchador com intuito de conseguir pelo menos 01 embrião recuperado por ciclo. O tratamento consistia em duas aplicações de 8,0 mg de EPE iniciado no D8 até pelo menos dois folículos atingirem 35mm. Neste momento era feita a indução da ovulação com aplicação IV de 1000 UI de hCG. Verificaram que ocorreu diferença entre as taxas de recuperação de embriões entre grupo controle e tratado 83% (5/6) e 150% (9/6)

respectivamente, apresentando diferença significativa entre os grupos ($P < 0.05$). Estes autores demonstram que o EPE foi efetivo no aumento da taxa de recuperação de embriões por animal.

2.4.3 Resposta ovariana

O ovário da égua possui particularidades quando comparado aos das outras espécies, sendo seu tamanho superior e com a posição invertida das camadas do córtex e da medula. De acordo com essa organização anatômica, os folículos só podem ovular através da fossa da ovulação (HIRANO et al., 2009).

Como consequência desta particularidade, Carmo et al. (2006) verificaram que a redução na taxa de recuperação embrionária de éguas com grande número de ovulações pode ser devido à interferência na captação e no transporte de oócitos pelo oviduto após a ocorrência de várias ovulações no mesmo ovário. Neste estudo, as éguas foram divididas em dois grupos, tratado (25mg de EPE a cada 12h, IM.) e não tratado, as ovulações foram induzidas com 2500 UI de hCG e as éguas abatidas de 12 às 24h após a detecção da primeira ovulação, sendo então o oviduto lavado visando à recuperação de oócitos. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre número de oócitos degenerados recuperados por grupo, no entanto, quanto maior o número de ovulações por ovário, menor foi o número de oócitos recuperados no grupo tratado. Concluíram que, uma menor taxa de recuperação de oócitos do oviduto é vista quanto maior o número de ovulações num mesmo ovário, cuja causa foi atribuída a formação de coágulo de sangue na fossa de ovulação, especialmente nas éguas com múltiplas ovulações (>3) no mesmo ovário. (CARMO, 2007)

2.4.4. Hormônio

2.4.4.1 Extrato de Pituitária Equina (EPE)

O EPE é um extrato de hipófise rico em gonadotrofina eqüina, o qual possui FSH e LH em sua composição, sendo uma das primeiras substâncias utilizadas na superovulação (DOUGLAS, et al. 1974), mostrando-se efetivo em induzir múltiplas ovulações em éguas. Entretanto, grande variabilidade na resposta ovariana é observada na dependência da dose utilizada, do dia do ciclo estral e dependendo das características foliculares no momento do início do tratamento (MEIRA & BURATINI, 1998; DIPPET et al. 1992; ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al. 2002; CARMO, 2003; MACHADO et al., 2003; 2006; SQUIRES et al., 2003; FARINASSO et al., 2005; ALONSO et al., 2006;)

Ao compararem a taxa de fertilização entre éguas superovuladas com EPE e éguas com ovulações espontâneas Dippert et al. (1994) encontraram números de ovulações maiores para as éguas tratadas (3,6) que para éguas não tratadas (1,1). O número de embriões recuperados das éguas tratadas (2,0) também foi maior.

Os níveis de FSH e LH presentes no EPE variam de acordo com a partida preparada, devido à variação individual, sexo, faixa etária, estágio reprodutivo e época do ano que são coletadas as pituitárias para produção do extrato, apresentando em torno de 40% de FSH para 60% de LH (CARMO, 2003).

Estudos realizados por Alvarenga et al. (2001) e Scoggin et al. (2002) demonstraram uma melhora no percentual de ovulações múltiplas em éguas superovuladas com a administração de 25mg de EPE duas vezes ao dia. Contudo, ambos obtiveram taxas de recuperação embrionária insatisfatórias, tendo sido levantada a hipótese de que as altas concentrações de LH no EPE possam estar envolvidas neste entrave (ALVARENGA et al., 2003; MACHADO et al., 2003).

Rosas et al. (1998), demonstraram que tanto o EPE como o FSH-e tem a mesma eficiência no tempo requerido para a obtenção de pelo menos dois folículos pré-ovulatórios e no número de ovulações por égua (EPE 3,6 e FSHe 4,6) e no número de embriões recuperados por égua (EPE 2,0 e FSHe 2,0). Sendo que a alta quantidade de LH no EPE provavelmente não afetou a resposta ovulatória das éguas submetidas à superovulação.

Orlandi (2008) ao avaliar a resposta ovulatória e concentração plasmática de FSH em éguas cíclicas submetidas à aspiração folicular e

tratadas com EPE verificou que o tratamento com EPE antes, durante ou após o desvio folicular esperado em onda induzida pela aspiração foi capaz de elevar e manter a concentração de FSH durante o tratamento.

2.4.4.2 FSH suíno (FSH-p)

Devido a sua ampla disponibilidade vários estudos se pautaram na utilização do FSH de origem suína para indução de múltiplas ovulações em éguas. Em síntese, a administração dessa gonadotrofina duas vezes ao dia, durante a metade ou o final do diestro até o início do estro, forneceu resultados pouco satisfatórios no que diz respeito à taxa de ovulação por ciclo estral. Além de produzir uma resposta bem inferior a obtida na espécie bovina, trata-se de um método oneroso por requerer administração de elevadas doses sendo portanto, de aplicabilidade restrita (FORTUNE e KIMMICH, 1993; HOFFERER et. al., 1991; SQUIRES et al 1986).

A utilização de FSH-p nas doses de 8 a 50 mg em éguas cíclicas demonstrou baixa efetividade, não sendo capaz de aumentar satisfatoriamente o número de ovulações, mantendo uma média inferior a 1,8 ovulações/égua (MCCUE, 1996; SQUIRES et al., 1986; SQUIRES e SEIDEL, 1995). Uma exceção é o trabalho de Krekeler et al., (2006), que demonstraram resultados promissores com relação a protocolos utilizando FSH de origem Porcina (FSH-p). Neste estudo foram utilizados dois protocolos de superovulação com FSHp nas doses de 10 e 25 mg IM, aplicadas duas vezes ao dia. As éguas tratadas obtiveram maior número de ovulações que as não tratadas. As doses de FSHp, 10 e 25 mg, aumentaram o número de ovulações por ciclo (2,2 e 2,28, respectivamente), sendo que um número menor de embriões por ciclo foi recuperado das éguas tratadas com 10 mg de FSHp (0,7) quando comparadas as tratadas com 25 mg (1,32).

Ignácio et al., (2007) e Mendes et al., (2008), em estudos recentes, não obtiveram ovulações múltiplas nem aumentaram satisfatoriamente o índice de recuperação embrionária, utilizando doses de 25 mg e de 50 mg, com a mesma frequência de aplicação.

Castro Chaves et al. (2008) testaram o FSHp nas doses de 15mg IM duas vezes ao dia em éguas da raça Mangalarga Paulista e Quarto de Milha e

obtiveram 14,3% (2/10) de duplas ovulações e média de 1,1 ovulações por égua, o que não diferiu do grupo controle.

A baixa resposta das éguas ao FSHp, independente da dose e da raça utilizadas, provavelmente está relacionada à especificidade do hormônio utilizado e talvez uma reduzida afinidade deste hormônio pelos receptores foliculares eqüino tenham interferido na resposta. O FSH é um hormônio pertencente à família de hormônios glicoprotéicos compostos por uma subunidade α comum e uma subunidade hormônio específica β não covalentemente associada (PIERSE e PARSONS, 1981). A subunidade β é a que determina a especificidade da ligação ao receptor e, conseqüentemente, sua resposta biológica (COMBARNOUS, 1992; MOYLE et al., 1994).

2.4.4.3 Imunoneutralização da inibina

A secreção da inibina pelo folículo dominante do ovário suprime a secreção de FSH (GINTHER et al., 2001). A imunoneutralização ativa ou passiva contra a inibina consiste na utilização de fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade α , que promove o bloqueio do mecanismo de feedback negativo da liberação de FSH, permitindo dessa forma a elevação dos níveis de FSH endógeno durante a fase folicular. Assim, visando manter as concentrações de FSH elevada previne-se a atresia folicular e, conseqüentemente promove a obtenção de múltiplas ovulações, mas os resultados foram inconsistentes (MCCUE, 1996).

Dois estudos relataram taxas de múltiplas ovulações (MCKINNON et al., 1992; MCCUE et al. 1993), porém seu uso tem sido limitado em decorrência a relatos de choque anafilático e abscesso no sítio de administração, devido ao prolongado tempo de administração da droga, o qual é realizado em torno de duas ou mais semanas (SQUIRES et al., 1999).

2.4.4.4 FSH eqüino purificado (FSH-e)

O FSH eqüino purificado é uma preparação enriquecida de FSH obtida a partir do extrato de pituitária eqüina. Estava disponível comercialmente desde

2003 nos Estados Unidos e Canadá (Bioniche Animal Health, Canadá Inc.), tendo sua comercialização interrompida em 2007.

Os tratamentos superovulatórios com FSHe aumentam o número de ovulações por ciclo e de embriões coletados por lavado. Segundo Niswender et al. (2003), a taxa de recuperação embrionária para éguas superovuladas com FSHe seguido de hCG foi três a quatro vezes maior que o encontrado para éguas controle. Além disso, a taxa de recuperação embrionária por ovulação por éguas tratadas não foi diferente da encontrada em éguas controle.

Por ter apresentado melhores resultados em vários trabalhos (ALVARENGA et al., 2003; NISWENDER et al., 2003; MACHADO et al., 2004; LOGAN et al., 2006; PERES, 2004 WELCH & BRUEMMER, 2006), a dose mais utilizada foi a de 12,5 mg de FSHe duas vezes ao dia e apresenta uma taxa de ovulação média variando de 3,3 - 5,6 ovulações por égua, taxa de recuperação embrionária variando de 1,6 - 2,6 embriões.

2.4.4.5 FSH eqüino recombinante (FSH-re)

O FSH-re utilizado para estimular o desenvolvimento folicular oferece a vantagem de ser um produto puro e sintético, sem as proteínas contaminantes encontradas no EPE.

Niswender et al. (2008) utilizaram o FSH-re e avaliaram o desenvolvimento folicular em éguas cíclicas, estas foram divididas em 4 grupos: 850µ FSH-re a cada 12 horas (G1), 850µ FSH-re a cada 24 horas (G2), 500µg FSH-re a cada 12 horas (G3) e 12,5mg de FSHe a cada 12 horas (controle). Não houve diferença entre a média de dias de tratamento (6,0; 8,0; 7,2 e 6,6 dias para G1, G2, G3 e controle respectivamente) nem para a média do número de ovulações detectadas (3,4; 5,4; 3,2; 3,8; respectivamente). Todos os grupos tratados desenvolveram múltiplos folículos pré-ovulatórios e múltiplas ovulações. Estes resultados indicam que o FSH-re pode ser utilizado para estimular o desenvolvimento folicular em éguas cíclicas (NISWENDER et al., 2008).

Jennings, et al. (2009), testaram o tratamento com FSH-re em éguas, que previamente passaram por um modelo de supressão folicular, utilizando as doses de 0,50mg IV, BID e 0,85 IV na mesma frequência de aplicação e um

grupo controle. As éguas tratadas apresentaram um maior número de folículos totais e pré ovulatórios em relação ao controle, porém não apresentaram diferença entre si. As éguas tratadas apresentaram maiores concentrações de estradiol e inibina e menor concentração de LH no final do tratamento. O estudo não demonstrou aumento significativo no número de ovulações possivelmente devido a observação de folículos que não ovularam no grupo tratado e da estimulação deficiente do LH-re com agente indutor de ovulação.

Em estudo recente, Meyers-Brown et al., 2010 avaliaram o aumento da recuperação embrionária de éguas superovuladas através do uso de FSH-re e LH-re. Quando folículos de 22-25mm de diâmetros eram detectados, o grupo tratado recebeu 0,65mg de FSH-re a cada 12 horas durante 3 dias e após esse período, uma vez por dia até que um ou mais folículos atingissem 29 mm de diâmetro. Neste momento eram adicionados ao tratamento 1.5mg de LH-re a cada 12 horas até a presença de folículos de 32mm de diâmetro quando o FSH-re foi interrompido. Depois disso as éguas só receberam LH-re três vezes ao dia até que a maioria dos folículos atingissem 35-38mm de diâmetro quando o tratamento foi interrompido. A indução da ovulação foi realizada com 2500UI de hCG i.v e a recuperação embrionária realizada no D8. O grupo controle diferiu apenas na utilização de salina no lugar de LH-re. O número de ovulações foi maior no grupo tratado e o número de folículos que não ovularam foi maior no grupo controle. O número de embriões recuperados por lavagem foi maior no grupo tratado ($3,9 \pm 0,87$) do que no controle ($2,0 \pm 0,53$), mas a taxa de embriões por ovulação foi similar entre os grupos. Estes autores concluíram que o FSH-re com a adição do LH-re foi eficaz no aumento no número de ovulações e embriões recuperados, bem como reduzir o número de folículos anovulatórios.

2.4.4.6 GnRH e seus agonistas

O GnRH e seus muitos análogos têm como função principal estimular a secreção de FSH e LH, podendo ser usado, por exemplo, para iniciar um crescimento folicular, para indução da secreção de FSH em éguas em anestro ou que não desenvolvem folículos durante a estação de monta (MCKINNON e VOSS, 1992).

Em várias espécies, a administração contínua de doses elevadas de um agonista de GnRH induz inicialmente uma hipersecreção de gonadotrofinas e posteriormente a dessensibilização da hipófise, promovendo a diminuição da liberação de gonadotrofina, evento denominado “down regulation” (IRVINE, 1983).

Os receptores de GnRH quando estimulados continuamente e uma eventual redução no número de receptores são fatores que levam a refratariedade deste hormônio, acarretando na supressão das gonadotrofinas endógenas. A falta de gonadotrofinas inibe a função reprodutiva, incluindo o desenvolvimento folicular, a ovulação e a fase luteal (FRASER, 1981).

Devido a essa inibição fisiológica pela aplicação de GnRH exógeno, poucos trabalhos citados na literatura obtiveram sucesso em induzir múltiplas ovulações em éguas cíclicas. A prolongada supressão das gonadotrofinas pelo *down regulation* seguido do estímulo elevado e constante pelo GnRH geralmente é ocasionado pela redução da sensibilidade dos receptores (HEBER and SWERDLOFF, 1981; NETT et al., 1981; SANDOW, 1983), mais que pela estimulação do GnRH (BELCHETZ et al., 1978; ZILBERSTEIN et al., 1983).

De um modo geral, acredita-se que as éguas sejam relativamente refratárias ao *down regulation* ocasionado pelos análogos do GnRH (IRVINE and ALEXANDER, 1993; FITZGERALD et al., 1993). Em eqüinos, o tratamento com análogos de GnRH por período prolongado (28 dias) e altas doses (1,3 mg/kg/dia) reduziu a concentração de LH semelhante às outras espécies (FITZGERALD et al. 1993).

Embora a contínua administração de GnRH induza a refração das gonadotrofinas em muitas espécies, experimentos sugerem que doses extremamente altas são necessárias para que isso ocorra na égua. (GINTHER et al., 1990).

Irvine et al., (1992) notaram que a administração de gosarelin na taxa de liberação de 180µg/dia induziu taxas elevadas de desenvolvimento folicular e uma taxa de ovulação entre 50 e 75% sem efeito adverso a longo e curto prazo no eixo reprodutivo.

Ginther e Bergfeldt, (1990) avaliaram o efeito do tratamento com GnRH com a substituição da alanina na 6^a posição e da amidação da 9^aprolina em

éguas em anestro e relataram que injeções intramusculares duas vezes ao dia de 100 a 400µg dessa substância, induziu a ovulação dentro de 21 dias em 57% das éguas em acíclicas. A taxa de múltiplas ovulações foi maior nas éguas tratadas (27/86) do que no controle (2/35). Concluíram que ocorre um aumento da incidência das ovulações, conforme o diâmetro do maior folículo no início do tratamento. Éguas com folículos pequenos têm uma resposta menor, e estão mais propensas a retornar ao estado de anestro após o tratamento.

Raz et al., (2009) compararam os efeitos do FSH-e do tratamento com um agonista do GnRH (acetato de deslorelina) na estimulação ovariana e produção de embriões de éguas em transição. No grupo FSH-e as éguas foram tratadas duas vezes por dia com 12,5 mg IM até atingirem um folículo de 35 mm, e a indução da ovulação aconteceu 36 horas depois. No grupo deslorelina, éguas foram tratadas duas vezes por dia com 63µg IM, até que um folículo de 35 mm foi detectado, e em seguida foi realizada a indução da ovulação. Em cada grupo, 78% éguas ovularam após o tratamento com FSH-e ou deslorelina. No grupo FSH-e, o número de ovulações foi significativamente maior (3,4 x 1,1 ovulações) e mais embriões foram recuperados (2,6 x 0,4 embriões). Os autores concluíram que FSH-e e o tratamento com deslorelina foram igualmente eficazes na indução da ovulação de éguas em transição, porém, o FSH-e aumentou o número de ovulações e embriões recuperados por égua.

3 OBJETIVOS

Verificar a resposta ovariana e a recuperação embrionária de éguas tratadas com acetato de deslorelina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente trabalho foi realizado nas dependências da Fazenda Haras Paulista, situada no município de Santo Antônio de Posse, São Paulo, Brasil.

Os animais eram mantidos sob sistema de criação extensiva em piquetes de capim *coastcross* (*Cynodondactylon*) com acesso a água e sal mineralizado à vontade, além de receberem 2 kg de ração comercial peletizada própria para eqüinos uma vez ao dia.

Todas as éguas utilizadas possuíam histórico reprodutivo normal e estavam ciclando regularmente. Foram acompanhados ciclos estrais anteriores ao início do experimento e realizada a colheita de embriões.

4.2 Controle ultrassonográfico

A partir do início do tratamento, as éguas foram examinadas diariamente por ultra-sonografia transretal, com um transdutor linear de 5 MHz, para mensuração do diâmetro dos folículos, ou seja, média dos valores referentes à largura e altura dos folículos em imagens congeladas.

O acompanhamento ultrasonográfico forneceu dados de intervalo entre o início do tratamento e a ovulação e ovulações por égua.

4.3 Inseminação Artificial

O sêmen foi colhido com uma vagina artificial modelo Botucatu (Papa & Alvarenga, 1984) sendo imediatamente avaliado sobre os seguintes aspectos: volume (ml), motilidade total subjetiva (%) e concentração (10^6 /ml).

As éguas foram inseminadas 24 horas após a indução da ovulação com sêmen a fresco obtido de um garanhão de fertilidade conhecida no Experimento 1 e com sêmen a fresco de 5 garanhões de fertilidade conhecida no Experimento 2, diluído com extensor a base de leite desnatado (Botu-sêmen[®], Botupharma, Botucatu, Brasil) e a dose inseminante foi de 1×10^9 espermatozóides viáveis.

4.4 Colheita de embriões

A colheita de embriões foi realizada no oitavo dia após a primeira ovulação (D8), em seguida com o objetivo de causar a lise do corpo lúteo foi administrado $\text{PGF}_{2\alpha}$, IM (5mg de Dinoprost-thrometamine, Lutalyse®; Pfizer, Nova Iorque, EUA) fazendo com que o animal retornasse o mais rapidamente ao estro.

Para o procedimento da técnica de colheita dos embriões utilizou-se uma sonda de Foley modelo Bivona® (Bivona Medical Technologies, Gary, IN, EUA). Após a introdução via transcervical, com mão enluvada, o balonete ("cuff") localizado no ápice da sonda foi inflado com 45 ml de ar, de forma a ficar fixado na abertura cervical e impedir o refluxo do meio infundido no útero. Realizou-se a infusão de um litro, por lavado uterino, de solução de Ringer com Lactato de Sódio® (J.P. Indústria Farmacêutica-Ribeirão Preto-SP) aquecido a 37°C, o qual foi drenado do útero por gravidade, passando por um filtro de embriões de 75µm. Realizou-se um total de três lavados uterinos.

Em seqüência, o conteúdo do filtro foi transferido para uma placa de Petri 100 x 20 mm com o fundo demarcado e o filtro foi lavado com 20 ml de RL, utilizando uma pressão, que foi realizada com auxílio de uma seringa de 20 ml conectada a uma agulha 30 x 10, de modo a remover todo o conteúdo do filtro para dentro da placa.

A procura dos embriões foi realizada em um estereomicroscópio com aumento de 10 vezes. Quando localizados, os embriões foram transferidos para uma nova placa de Petri estéril, onde foram lavados por 8 a 10 passagens sucessivas em um meio de manutenção Holding plus- Embriocare® (Cultlab, Campinas-SP). No processo de manipulação dos embriões, palhetas de 0,25 ou 0,5 mL (IMV, França) foram utilizadas, de acordo com o diâmetro do embrião obtido, para evitar qualquer lesão.

As palhetas de 0,25 ou 0,5 mL foram utilizadas para a transferência dos embriões da seguinte forma: uma coluna de meio de manutenção foi colocada inicialmente + coluna de ar + coluna de meio com o embrião + coluna de ar + coluna de meio. As colunas de ar e meio tiveram como objetivo auxiliar a saída do embrião da pipeta para o interior do útero. Em seguida, a palheta foi

colocada no interior de uma bainha francesa (Cultilab, Campinas-SP) com um aplicador.

A transferência foi realizada por via transcervical, na qual a bainha francesa foi protegida por uma camisa sanitária (IMV, França) objetivando evitar a entrada de agentes contaminantes presentes na vagina e vestibulo, para o interior do útero.

4.5 Experimento 1

4.5.1 Grupos experimentais

Foram utilizados inicialmente 16 ciclos estrais de 8 éguas da raça Puro Sangue Árabe, com idade entre 3 e 22 anos e pesando de 350 a 500 Kg para verificação do efeito do acetato de deslorelina no desenvolvimento folicular e na recuperação embrionária.

Nesse experimento todas as éguas receberam 5 mg de dinoprost-trometamina (Lutalyse®; Pfizer, Nova Iorque, EUA) no dia oito (D8) do ciclo estral (D0 = ovulação). Aleatoriamente 4 éguas foram direcionadas ao grupo controle e 4 ao grupo tratado, sendo que no ciclo subsequente as éguas foram redirecionadas ao grupo oposto, desta forma, todas as éguas foram tratadas em um ciclo e não tratadas em outro ciclo, sendo assim, seu próprio controle.

4.5.1.1 Grupo controle

Imediatamente após a administração do agente luteolítico no D8, as éguas recebiam 1mL de solução salina 0,9% IM a cada 12 horas e foram monitoradas diariamente por ultra-sonografia transretal para o acompanhamento do desenvolvimento folicular. O tratamento perdurou até que um folículo atingiu 33 mm de diâmetro. Quando um folículo de 35 mm de diâmetro foi detectado foram administrados 2500UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana - Vetecor® Laboratório Calier, São Paulo, Brasil) por via intravenosa, visando à indução da ovulação. Vinte quatro horas após a indução

da ovulação os animais foram inseminados. Oito dias após a detecção da ovulação as éguas foram submetidas a lavagens uterinas para recuperação embrionária.

4.5.1.2 Grupo tratado

Imediatamente após a indução da luteólise no D8, iniciou-se o tratamento com 100µg de acetato de deslorelina (Bachem, USA) diluído em veículo de liberação controlada, a cada 12 horas por via intramuscular. O tratamento perdurou até que dois folículos atingissem no mínimo de 33 mm, ou quando não houvesse crescimento folicular por três dias consecutivos. Nesse momento foi efetuada a indução da ovulação com 2500UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana - Vetecor® Laboratório Calier, São Paulo, Brasil) por via intravenosa e a ultra-sonografia transretal foi efetuada a cada 6 horas. A inseminação artificial foi realizada 24 horas após. A colheita de embriões foi realizada oito dias após as ovulações.

4.6 Experimento 2

Três animais do Experimento 1 não apresentaram crescimento folicular durante 3 dias consecutivos. O tratamento com acetato de deslorelina nestes animais teve duração de 7 dias e após o sétimo dia de tratamento, os folículos estacionaram seu crescimento, mantendo o mesmo diâmetro por mais de 3 dias, e em seguida estes folículos regrediram, não ocorrendo a ovulação. Em várias espécies, a administração contínua de doses elevadas de um agonista de GnRH induz inicialmente uma hipersecreção de gonadotrofinas e posteriormente a dessensibilização da hipófise, promovendo a diminuição da liberação de gonadotrofina, evento denominado “down regulation” (IRVINE, 1983). Em virtude destes três animais desenvolverem um quadro semelhante ao descrito como “down regulation” foi definida uma modificação no protocolo de tratamento com acetato de deslorelina para minimizar a quantidade de aplicações por tratamento.

Neste experimento foram utilizados 112 ciclos estrais de 56 éguas de diferentes raças, com idade entre 3 e 22 anos e pesando de 350 a 500 Kg para verificação do efeito do acetato de deslorelina no desenvolvimento folicular e na recuperação embrionária. Os animais foram distribuídos em grupos da mesma forma como descrito no Experimento 1.

4.6.1 Grupos experimentais

4.6.1.1 Grupo controle

Após a indução da luteólise no D8, as éguas foram monitoradas diariamente por ultra-sonografia transretal. Quando os ovários apresentavam um folículo de 25 mm de diâmetro e um segundo folículo $\geq 21 \pm 1$ mm de diâmetro iniciaram-se as aplicações de solução salina 0,9%, a cada 12 horas pela via intramuscular, e as aplicações foram efetuadas até que dois folículos atingissem no mínimo ≥ 33 mm diâmetro. Nesse momento realizou-se a indução da ovulação e a ultra-sonografia transretal a cada 6 horas. Vinte quatro horas após a indução das ovulações, foi realizada a inseminação artificial e a colheita dos embriões foi realizada oito dias após a primeira ovulação detectada.

4.6.1.2 Grupo tratado

Após a indução da luteólise no D8, as éguas foram monitoradas diariamente por ultra-sonografia transretal. Quando os ovários apresentavam um folículo de 25 mm de diâmetro e um segundo folículo $\geq 21 \pm 1$ mm de diâmetro iniciaram-se as aplicações de acetato de deslorelina (100 μ g), a cada 12 horas pela via intramuscular, e as aplicações foram efetuadas até que dois folículos atingissem no mínimo ≥ 33 mm diâmetro. Nesse momento realizou-se a indução da ovulação e a ultra-sonografia transretal a cada 6 horas. Vinte quatro horas após a indução das ovulações, foi realizada a inseminação artificial e a colheita dos embriões foi realizada oito dias após a primeira ovulação detectada.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas através do programa SAS, versão 9.1. Para análise das variáveis estudadas foi efetuado teste “t de Student” ou o teste Exato de Fisher. Todas as estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do Experimento 1

O tamanho dos dois maiores folículos no início do tratamento (D8) variou de folículos menores que 10 mm de diâmetro até folículos com 27 mm no grupo controle enquanto que no grupo tratado variou de 10 a 24 mm de diâmetro, sendo que no grupo tratado as duas únicas éguas que responderam ao tratamento apresentavam folículos de 21 a 24 mm de diâmetro (Tabela 1).

O número de dias do momento do início do tratamento até o momento da indução da ovulação variou de 2 a 11 dias no grupo controle e nas éguas tratadas variou de 3 a 6 dias, sendo que 3 éguas do grupo tratado não apresentaram crescimento folicular em 3 dias consecutivos durante o controle do ciclo estral após o sétimo dia de tratamento (Tabela 1).

O tamanho dos folículos no momento da indução da ovulação variou da mesma maneira no grupo controle e no grupo tratado, de 33 a 37 mm de diâmetro (Tabela 1).

O número de ovulações no grupo controle foi de uma ovulação por égua e no grupo tratado duas éguas apresentaram dupla ovulação e 3 éguas, as mesmas que não apresentaram crescimento folicular, não ovularam (Tabela 1).

O número de embriões recuperados no grupo controle foi de 5 e no grupo tratado 6, sendo que duas éguas que apresentaram dupla ovulação tiveram dois embriões recuperados no mesmo lavado uterino (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho em mm dos dois maiores folículos no oitavo dia do ciclo estral, número de dias até o momento da indução da ovulação, tamanho em mm dos folículos no momento da indução, número de ovulações por égua e números de embriões recuperados.

Éguas	TA (mm) dos 2 maiores fols (D8)	Dias até indução	TA (mm) fol(s) na indução	Número de ovulações	Número de embriões recuperados
Controle	17 – 20	5	36	1	0
	18 – 18	9	35	1	1
	<10 – <10	8	36	1	1
	<10 – <10	11	33	1	1
	23 – 26	5	36	1	0
	16 – 18	7	35	1	1
	15 – 16	7	37	1	1
	20 – 27	2	36	1	0
Tratado	10 – 18	NR	-----	0	0
	16 – 17	6	36	1	1
	15 – 16	NR	-----	0	0
	18 – 16	6	33	1	1
	21 – 24	3	34 – 37	2	2
	20 – 24	3	33 – 36	2	2
	15 – 18	5	36	1	0
	10 – 15	NR	-----	0	0

D8 = dia 8 do ciclo estral; TA = tamanho (mm); fol(s) = folículo(s); NR = éguas que não apresentaram crescimento folicular durante 3 dias consecutivos e receberam mais do que 7 dias de tratamento.

5.2 Resultados do Experimento 2

O número médio de dias de tratamento com acetato de deslorelina foi de 3,5 dias, este foi o tempo médio que as éguas levaram em dias para a indução da ovulação. Já as éguas do grupo controle levaram em média 6,7 dias para atingirem o mesmo tamanho de folículo (Tabela 2).

O tamanho dos folículos no momento da indução da ovulação foi similar entre os grupos e o intervalo em horas entre o momento da indução à primeira ovulação apresentou diferença estatística entre os grupos sendo menor no grupo tratado (Tabela 2).

O intervalo entre as ovulações do grupo tratado foi de 13,5 horas em média. Já o número de éguas que apresentaram ovulações assíncronicas foram 9 animais, ou 19,5%, sendo que o intervalo entre estas ovulações assíncronicas foi de 21,6 horas (Tabela 2).

O número de éguas que ovularam dois folículos por ciclo diferiu estatisticamente entre os grupos sendo maior no grupo tratado (46 éguas, 82%) (Tabela 2).

O número de ovulações, a média do número de ovulações por ciclo, o número de embriões recuperados e o número de embriões recuperados por ciclo foram estatisticamente diferentes entre os grupos sendo maior no grupo tratado (102 ovulações; 1,82 ovulações por ciclo; 63 embriões; 1,12 embriões recuperados por ciclo) do que no controle (56 ovulações; 1,0 ovulações por ciclo; 32 embriões; 0,57 embriões recuperados por ciclo) respectivamente (Tabela 2).

Já o número de embriões recuperados por ovulação e a porcentagem de embriões recuperados por ovulação não apresentou diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

TABELA 2. Dados absolutos ou médios e desvios padrões das variáveis entre o grupo controle e tratado com acetato de deslorelina para obtenção de múltiplas ovulações.

Variáveis	Controle	Tratado
Número de ciclos utilizados	56	56
Início do tratamento após a aplicação de PGF _{2α} (dias)	2,3 (±1,1)	2,3 (±1,0)
Diâmetro do maior folículo início do tratamento (mm)	24,1 (±2,1)	23,7 (±2,2)
Diâmetro do segundo maior folículo início do tratamento (mm)	22,1 (±1,6)	21,0 (±1,0)
Dias de tratamento	6,75 (±2,8) *	3,5 (±0,9)
Tamanho do(s) folículo(s) momento da indução	35,3 (±2,7)	35,3 (±2,6)
Intervalo em horas entre o momento da indução à 1ª ovulação	42 (±5,1) *	35 (±6,1)
Intervalo em horas entre as ovulações	0,0 (±0,0)	13,5 (±11,9)
Número de éguas que ovularam assincrônica	0	9
Porcentagem de éguas que ovularam assincrônica	0	19,5
Intervalo em horas entre as ovulações assincrônicas	0	21,6 (±4,8)
Número de éguas que ovularam 2 folículos por ciclo	0*	46
Porcentagem de éguas com dupla ovulação por ciclo	0,0*	82,0
Número de ovulações	56*	102
Média do número de ovulações por ciclo	1,0 (±0,0)*	1,82 (±0,5)
Número de embriões recuperados	32*	63
Número de embriões recuperados por ciclo	0,57*	1,12
Porcentagem de embriões recuperados por ciclo	57,0*	112,5
Número de embriões recuperados por ovulação	0,57	0,61
Porcentagem de embriões recuperados por ovulação	57	61

*p<0,05

Em relação à lateralidade observou-se diferença estatística da porcentagem das ovulações unilaterais em comparação as bilaterais, entretanto a taxa de recuperação embrionária não diferiu independentemente da lateralidade das ovulações (Tabela3).

TABELA 3. Porcentagem da lateralidade e da recuperação embrionária de éguas que apresentaram múltiplas ovulações.

	Unilateral	Bilateral
Lateralidade	75,0*	25,0
Recuperação Embrionária	60,5	62,5

*p<0,05

6 DISCUSSÃO

O protocolo de tratamento com acetato de deslorelina funciona através da estimulação da secreção de gonadotrofina da hipófise, aumentando a secreção endógena de FSH e LH. Este aumento de FSH promove o crescimento folicular, pois o FSH responde a aplicações exógenas de GnRH (GINTHER, et al, 1990). Já os tratamentos utilizados para superovulação através do EPE e FSH eqüino purificado, que são amplamente utilizados comercialmente para indução de múltiplas ovulações me éguas, possuem altas concentrações de FSH que atuam diretamente no ovário.

A substância testada neste experimento é uma substância de baixo custo e apresentou resultados constantes vistos no experimento 2, quando comparada aos preparados a base de gonadotrofinas como EPE (ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al. 2002). Além disso, é uma droga sintética, não apresentando desta maneira a variação de partidas como relatado por Carmo, 2003.

Um único trabalho (GINTHER e BERGFELDT, (1990); na literatura cita a utilização do GnRH em éguas acíclicas para indução da ciclicidade e relata a incidência de múltiplas ovulações em alguns animais. O GnRH estimula a secreção de FSH e LH, e em várias espécies a sua administração exógena prolongada promove a diminuição da liberação desta gonadotrofina promovendo o “down regulation” (IRVINE, 1983). Este evento chamado de “down regulation” possivelmente ocorreu em alguns animais do Experimento 1,

no qual o protocolo de indução de múltiplas ovulações estava sendo definido. Neste experimento o tratamento foi iniciado no oitavo dia do ciclo estral, assim como é efetuado na maioria dos protocolos de indução de múltiplas ovulações que utilizam outras drogas (ALVARENGA et al., 2001; SCOOGIN et al., 2002; CARMO et al., 2006), e perdurou por mais de 7 dias em alguns animais, levando-os a uma paralisação do crescimento folicular.

Os dois animais que responderam ao protocolo com dupla ovulação no Experimento 1 apresentavam no mínimo dois folículos com diâmetro variando entre 20-24 mm no início do tratamento, resultando na ovulação de múltiplos folículos. Nesses animais ficou claro que o tratamento por um período de tempo menor (3 dias), minimiza a probabilidade do desencadeamento do fenômeno “down regulation” e possibilita a ocorrência de múltiplas ovulações durante o ciclo.

Esta estratégia de reduzir a duração dos protocolos de indução de múltiplas ovulações foi relatada Gimenes et al. (2010), que observaram que o tempo de administração da droga diminui quando o tratamento é iniciado com folículos de diâmetro variando entre 20-23 mm.

Foi confirmada também a importância do momento ideal para o início do tratamento superovulatório, como já demonstrado por Orlandi (2008), que verificou que as melhores respostas ovarianas foram observadas no momento que o maior folículo atingiu o diâmetro médio entre 20-23 mm. Este fato reafirma a importância do acompanhamento do crescimento folicular nas éguas submetidas aos protocolos de indução de múltiplas ovulações, principalmente para que o início do tratamento seja realizado no momento ideal.

O número de animais que respondeu ao protocolo utilizado com no mínimo duas ovulações foi de 82% demonstrando uma boa estimulação ovariana da droga utilizada.

O protocolo utilizado no experimento 2 promoveu uma estimulação ovariana baixa, quando comparado aos trabalhos utilizando o EPE, onde o número de folículos pré ovulatórios variou de 4,7 a 7,1 (ALVARENGA et. al., 2001 e SCOOGIN et. al. 2002).

Entretanto a recuperação embrionária por ovulação apresentou índices semelhantes aos obtidos pelo grupo controle e diferentemente aos encontrados

nos trabalhos que apresentam uma superestimulação ovariana (ALVARENGA et. al., 2001; CARMO, 2006; DIPPERT et al 1994; SCOGGIN et. al. 2002).

A presença de vários folículos pré ovulatórios no ovário foi a explicação para a baixa taxa de recuperação embrionária encontrada por Carmo et al. (2006), que observaram que um grande número de ovulações pode interferir na captação e no transporte de oócitos pelo oviduto após a ocorrência da ovulação, devido a formação de um grande coágulo de sangue na fossa de ovulação. Estes autores concluíram que, quanto maior o número de ovulações menor a taxa de recuperação de oócitos do oviduto. Este fato está relacionado principalmente as particularidades que o ovário da égua apresenta, tendo a posição invertida das camadas do córtex e da medula, e desta maneira os folículos só podem ovular através da fossa da ovulação (HIRANO et al., 2009).

Para que a recuperação embrionária por folículo ovulado não seja afetada Carmo et al., 2006 sugerem no máximo 2 ovulações por ovário, resultado similar ao observado no Experimento 2.

A porcentagem de éguas que tiveram ovulações unilaterais foi maior do que as éguas que tiveram ovulações bilaterais, corroborando com os achados de Duarte (2003), entretanto, discordando de Riera et al., (2006) que verificaram não haver diferença na porcentagem de ovulações uni ou bilaterais em éguas com múltiplas ovulações.

A taxa de recuperação embrionária com relação a lateralidade não diferiu discordando dos dados de Riera et al., (2006) que observou uma maior recuperação embrionária em éguas com múltiplas ovulações bilatrais.

Esses dados discordam dos dados citados por Riera et al. (2006) que verificaram uma recuperação embrionária e uma quantidade de lavados com dois embriões maiores em éguas que apresentaram ovulações bilaterais.

Segundo Alvarenga et al., (2008) a taxa de recuperação embrionária por ciclo é de 60% e com uma taxa de prenhez de 60% por T.E, pode-se concluir que são necessários 3 ciclos por doadora de embrião para se ter uma prenhez. O presente estudo apresentou um protocolo que possibilita a recuperação de um embrião por ciclo, o que permite uma redução nos custos dos programas de T.E. e uma maior chance de prenhez.

7 CONCLUSÃO

O acetato de deslorelina é eficiente na indução de duplas ovulações em éguas desde que o protocolo seja iniciado com no mínimo dois folículos entre 20 e 25 mm nos ovários e permite uma recuperação embrionária de um embrião por lavado uterino em média.

8 REFERÊNCIAS

ALONSO, M.A., FLEURY, P.D.C., ALVARENGA, M.A. Efeito da frequência do tratamento com baixas doses do extrato de pituitária eqüina na indução de múltiplas ovulações em éguas. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.34, Supl2, p.532, 2006.

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

ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L; MACHADO, M, S.; ARANTES, M.; PERES, K.R.; LEAO, K.M.; OLIVEIRA, J.V.; ROSER, J.F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH equino purificado. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, p.216-217, 2003.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulations in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.88-91, 2008.

BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D., SCHUMACHER, J. Manual of Equine Reproduction, 1 ed., St. Louis: Mosby-Year Book, 208p., 1998.

BELCHETZ, P. E., T. M. PLANT, Y. NAKAI, E. J. KEOGH, E. KNOBIL. Hyperphysical responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin releasing hormone. **Science**, v.202, p.631-633, 1978.

CARMO, T.M. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas. 2003. **Dissertação**(mestrado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

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

CARMO, T.M. Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária eqüina. 2007. **Tese** (doutorado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

CASTRO CHAVES, M.M.B.; PESSOA, M.; CANNIZA, A.P.; ALVARENGA, M.A. Falhas em obter múltiplas ovulações em éguas tratadas com FSH suíno purificado e não purificado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, Supl. 2, p.634, 2008.

COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocrine Reviews**, v.13, p.670-691, 1992.

CROWDER, M. E., R. D. HERRING, AND T. M. NETT. Rapid recovery of gonadotroph function after down-regulation of receptors for GnRH in ewes. **Journal of Reproduction Fertility**, v.78, p.577-585. 1986.

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

DIPERT, K.D., JASKO, D.J., SEIDEL Jr., G.E., SQUIRES, E.L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41, p.1141-23, 1994.

DOUGLAS, R.H.; NUTI, L.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, v.2, p. 133-142, 1974.

DUARTE, M.B. Incidência de ovulações duplas, gestações gemelares e eficácia da redução manual de gêmeos em éguas quarto de milha. 2003. **Dissertação** (mestrado na área de reprodução animal) – Universidade Federal de Uberaba, Uberaba/MG.

FARINASSO, A., BRANQUINHO, J.A., RUMPF, R. & ALVARENGA, M.A., Utilização de baixas doses de extrato de pituitária eqüina para indução de ovulações múltiplas em éguas. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33, p135-38, 2005.

FITZGERALD, B. P., PETERSON, K. D., SILVIA, P. J. Effect of constant administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist on reproductive activity in mares: Preliminary evidence on suppression of ovulation during the breeding season. **Animal Journal of Veterinary Res.**, v.54, p.1746-1751, 1993.

FRASER, H. M. Luteinizing hormone-releasing hormone and fertility control. Oxford. **Rev.Reprod. Biol.**, v.3, p.1-48, 1981.

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

IRVINE, C. H. G. Gonadotropin-releasing hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.3:168-170,1983.

GIMENES, A.M.; IGNÁCIO, F.S.; BOFF, A.L.N.; BERGFELT, D.R.; MEIRA, C. Enhanced ovarian response to low-dose treatment with equine pituitary Extract in mares. **Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Córdoba, Argentina, 9–12 January 2010**, v.22, p.410.

GINTHER, O.J., BERGFELDT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development

during the existing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88: 119- 126, 1990.

GINTHER, O.J., **Reproductive Biology of mare**: basic and applied aspects. 2a. Ed. Crossplains: Equiservices, p.642,1992.

GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K., Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**. 65, 638–647., 2001.

HAFEZ, E.S.E., **Reproduction in farmanimals**, 7. ed, Philadelphia: Lea &Febiger, 2000.

HEBER, D & SWERDLOFF, R. S. Down-regulation of pituitary gonadotropin secretion in postmenopausal females by continuous gonadotropin-releasing hormone administration.**Journal of Clinic Endocrinology & Metabolism**, v.52, p.171-172, 1981.

HIRANO,Y.; KIMURA, J.; NAMBO, Y.; YOKOTA, H.; NAKAMURA, S.; TAKEMOTO, S.; HIMENO, R.; MISHIMA, T.; MATSUI, M.; MIYAKE, Y.I.Population of follicles and luteal structures during the oestrous cycle of mares detected bythree-dimensional internal structure microscopy. **Anatomia Histologia Embryologia**,v.38, p.214-218, 2009.

HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins.**Journal of Reproduction Fertility Suppl.**, v.44, p.341, 1991.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. In: Proc. Ann. Conv. of Am. Assn of Equine Practitioners, San Francisco, Proceeding, San Francisco, 1972, p. 119 - 148.

IGNACIO, F. S. Resposta ovariana e taxa de recuperação embrionária em éguas tratadas com FSH suíno. 2009. **Tese** (mestrado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

IGNACIO, F.S.; BERGFELT, D.R.; ORLANDI, C.; MONTECHIESI, D.F.; WECHSLER, F.S.; MEIRA, C. Ovarian response to pFSH and embryo recovery following follicular wave emergence induced by follicle ablation in mares. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.35, p.1245, 2007.

IGNACIO, F.S., BERGFELT, D.R., MONTECHIESE, D.F., ARAUJO, G.H.M., CARVALHO, R.L., MEIRA, C. Resposta ovariana e recuperação embrionária em éguas tratadas com 50mg de FSH-p, precedido de aspiração folicular para indução da emergência da nova onda folicular. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, p.504, 2008.

IRVINE, C. H. G. & ALEXANDER, S. L. GnRH. In: **Equine Reproduction** . Malvern: Lea &Febiger, p.37-44, 1993.

JENNINGS, M.W.; BOIME, I. B; DAPHNA-IKEN, D.; JABLONKA-SHARIFF, A.; CONLEY, A.J. ; COLGIN, M.; BIDSTRUP, L.A.; MEYERS-BROWN, G.A.; FAMULA, T.R.; ROSER J.F. The efficacy of recombinante equine follicle stimulanting hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. **Animal Reproduction Science**.(2009), doi:10.1016/j.anireprosci.2009.01.027.

KREKELER, N.; HOLLINSHEAD, F.K.; FORTIER, L.A.; VOLKMANN, D.H. Improved ovulation and embryo recovery rates in mares treated with porcine FSH. **Theriogenology**, v. 66, p.663-687, 2006.

LOGAN, N.L.; MCCUE,P.M.; ALONSO M.A.; SQUIRES E.L. Evaluation of three equine FSH superovulationprotocols in mares. **Animal Reproduction Science**.(2006), doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.027.

LOSINNO, L.; AGUILAR, J.J. AND LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. **Equine EmbryoTransfer**. v. 03, p. 81 – 83, 2000.

MACHADO, M.S., ARANTES, M.; PERES, K.R., LEO, K.M., CARMO, M.T., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatorio

utilizando o extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.506-8, 2003.

MACHADO, M.S.; CARMO, M.T.; SQUIRES, E.L.; ROSER, J.F.; ALVARENGA, M.A. Follicular dynamic, superovulatory response and embryo recovery rates in mare treated with constant and decreasing doses of equine pituitary extract (EPE) and purified equine FSH. **Hovemeyer Foundation Monographis Series**, n.15, p.75-76, 2004.

MACHADO, M.S. Avaliação do perfil endócrino de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária e FSH eqüino purificado. 2008. **Tese** (doutorado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 5a Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

MCCUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASHLEY, B.L. Effect on ovulation rate of possible immunization of mares against inhibin. **Equine Veterinary Journal**, v.15 (suppl), p.103-106, 1993.

MCCUE, P.M. Superovulation. **Veterinary Clinic North America Equine Practice**, v.12, n.1, p.1-11, 1996.

MCKINNON, A.O. e VOSS, J.L. GnRH clinical application. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, C.H.G. Irvine, p. 329 – 333. 1992.

MCKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASSION, R.L. Increased ovulation rate in mares after immunization against recombinant bovine inhibin subunit. **Equine Vet. J.**, v.24, p.144-146, 1992

MEIRA e BURATINI Jr. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Univesidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.26, n.(suplemento.), p.125-140, 1998.

MENDES, D., IGNÁCIO, F.S., BERGFELT, D.R., OLIVEIRA, J.V., CARVALHO, R.L., MEIRA, C. Resposta ovulatoria e recuperação embrionária em éguas

brasileiro de hipismo submetidas a tratamentos com FSHp ou EPE. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, p.586, 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**. (2010), doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.109.

MOYLE, W.R.; CAMPBELL, R.K.; MYERS, R.V.; BERNARD, M.P.; HAN, Y.; WANG, X. Co-evolution of ligand-receptor pairs. **Nature**, v.368, p.251-155, 1994.

NETT, T. M., M. E. CROWDER, G. E. MOSS, AND T. M. DUELLO. GnRH receptor interaction. V. Down-regulation of pituitary receptors for GnRH in ovariectomized ewes by infusion of homologous hormone. **Biology of Reproduction**, v.24, p.1145-1155, 1981.

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

NISWENDER, K.D.; McCUE, P.M.; HARDY, Q.P.; SQUIRES, E.L. Effect of purified equine follicle-stimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, p.37-39, 2004.

NISWENDER, K.D.; JENNINGS, M., BOIME, I., COLGIN, M., ROSER, J.F. In vivo activity of recombinant equine follicle stimulating hormone in cycling mares. 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer. **Abstract Book**, p. 61, 2008.

OLIVEIRA, L.A., SOUZA, J.A.T. Eficiência do hCG e LH na indução de ovulação e taxa de gestação em éguas da raça Quarto de Milha submetidas à cobertura única em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.504-506, 2003.

ORLANDI, C.; BERGEFELT, D.R.; WECHSLER, F.S.; NOGUEIRA, G.P.; POULI FILHO, J.N. P, MEIRA, C. Resposta ovariana durante a superovulação precedida pela emergência da onda folicular induzida por aspiração dos folículos em éguas cíclicas. **Acta Scientiae Veterinarie**, supl.34, p.278, 2006.

ORLANDI, C.M.B. Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas submetidas a aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE). 2008. 68f **Tese** (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, "Julio de Mesquita Filho".

PALMER, E. & QUELLIER, P. Uses of LHRH and analogues in the mare. In: **Proc. 5th International Congress of Animal Reproduction Artificial Insemination.**, Dublin, Irlanda. P.339-346, 1988.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Revista Hippius**, São Paulo, v. 62, p. 62- 64, 1984.

PERES, K.R. Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) visando à antecipação da estação reprodutiva e a superovulação em éguas na fase de transição de primavera. **Biblioteca digital da UNESP** (www.biblioteca.unesp.com.br) Cod. 1997, 2004.

PIERSE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu.Rev.Biochem**, v.50, p.465-495, 1981.

PIERSON, R.A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L.**Equine Reproduction**. Malvern: Williams & Wilkins, 1992. p.172-175.

RAZ, T.; CARLEY, S.; CARD, C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. **Theriogenology**, v.71, p.1358-1366, 2009.

RIERA, F.L.; ROLDÁN, J.E.; HINRICHS, K. Patterns of embryo recovery in mares with unilateral and bilateral double ovulations.**Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 398-399, 2006.

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

SAMPER, J.C. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares, **AAEP PROCEEDINGS**, v.43, p.189-191, 1997.

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

SANDOW, J. The regulation of LHRH action at the pituitary and gonadal receptor level: A review. **Psychoneuroendocrinology**, v.8, p.277-297, 1983.

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

SETICH, P.L. Transcervical embryo transfer in performance mares. **Journal of the American Association**, v. 195, p. 940 – 944, 1989, n.7.

SQUIRES, E.L., GARCIA, R.H., GINTHER, O.J., VOSS, J.L., SEIDEL Jr. G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, n.5, p.661-70, 1986.

SQUIRES, E.L., SEIDEL Jr, G.E. Superovulation. In: Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction and Biotechnology**. Bulletin of Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory of the Colorado State University, Fort Collins, n.08, p.32-8, 1995.

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

SQUIRES, E.L., MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.1-8, 2006.

ZILBERSTEIN, ZAKUT, M., H., NAOR, Z. Coincidence of down-regulation and desensitization in pituitary gonadotrophs stimulated by gonadotropin releasing hormone. **Life Science**, v.32, p.663-669, 1983.

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, p.262-270, 2006.

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

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para a revista Animal Reproduction Science (normas de especificação no Anexo 1)

Induction of double ovulation in equine mares using deslorelin acetate

J.F. Nagao¹, J.R. Neves Neto², F.O. Papa¹, M.A. Alvarenga¹, C.P. Freitas-Dell'Aqua¹, J.A. Dell'Aqua Junior¹

dellaquajunior@uol.com.br

¹ Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, College of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, BOTUCATU, SP 18610970, Brazil.

² Institute of Animal Reproduction, São José dos Pinhais, SP, Brazil.

Abstract

This study aimed to verify whether deslorelin acetate could induce double ovulation in equine mares. In Experiment 1, we studied 16 estrous cycles in eight mares treated with 100 µg of deslorelin acetate or saline intramuscularly (IM) every 12 hours from D8 of the estrous cycle until at least two follicles reached 33 mm. At this time, ovulation was induced with 2500 IU of hCG. Artificial insemination was performed using 1×10^9 viable sperm 24 hours after induction, and embryos were collected on the eighth day after ovulation was first detected. In Experiment 2, we studied 112 cycles in 56 mares. In this experiment, the deslorelin acetate protocol was initiated only after a follicle with a diameter of 25 mm and at least one second follicle with a diameter $\geq 21 \pm 1$ mm was detected, at which time 100 mg deslorelin acetate or saline was administered IM every 12 hours. The other procedures were similar to those described in Experiment 1. The variables studied were analyzed using Student's t-test and Fisher's exact test. In the first experiment, only two mares in the group treated with deslorelin acetate responded with double ovulation. In the second experiment, 82% of animals per cycle responded with double ovulation, and the embryo recovery per cycle was 1.12 and 0.57 in the group treated with deslorelin acetate and the control group, respectively ($p < 0.05$). Deslorelin acetate is effective in inducing double ovulation in mares when the protocol is

initiated when at least two follicles are between 20 and 25 mm in diameter. On average, it allows for the recovery of one embryo by uterine lavage.

Keywords: mare, deslorelin acetate, double ovulation, embryo transfer.

1. Introduction

Currently, most embryo collections in horses are from unique and spontaneous ovulations, resulting in an embryo recovery rate of around 60% (ALVARENGA et al., 2008). One of the main costs associated with embryo transfer is maintaining the recipients that are scheduled but not used for embryo transfer. One method for reducing the cost of embryo transfer is to increase the number of embryos recovered per donor through the induction of multiple ovulations (SQUIRES et al., 2003).

A mare ovary has special features compared to other species, including its larger size and the inverted position of the layers of the cortex and medulla. According to this anatomical organization, the follicles can only ovulate through the ovulation fossa (HIRANO et al., 2009).

As a result of this feature, Carmo et al. (2006) found that the reduction in the rate of embryo recovery from superovulated mares may be due to interference in the capture and transport of oocytes through the oviduct by the formation of a large blood clot in the ovulation fossa. This was particularly observed in mares with multiple ovulations in the same ovary as opposed to in mares that have single, double and triple ovulations. They observed a significant decrease in the number of oocytes/ovulations when there were ovulations in more than three follicles.

The purpose of this study was to assess the effect of deslorelin acetate on the induction of double ovulations in mares.

2. Materials and Methods

2.1 Experiment 1

We initially used 16 estrous cycles of eight purebred Arabian mares between 3 and 22 years of age, weighing between 350 and 500 kg. In this experiment, all mares received 5 mg of dinoprost tromethamine (Lutalyse[®], Pfizer, New York, NY, USA) on day eight (D8) of the estrous cycle (D0 = ovulation) and were randomly divided into the control group (n = 4) and treated group (n = 4). In the subsequent cycle, mares were placed in the opposite group. Thus, all mares were treated in one cycle and not treated in the other cycle as an internal control.

For the treated group, immediately after the induction of luteolysis on D8, treatment was initiated with 100 µg of deslorelin acetate (Bachem, USA), which was diluted in a vehicle for controlled release and given every 12 hours via intramuscular (IM) injection. The control group received 1-mL IM injections of a saline solution. The treatment lasted until at least two follicles reached a minimum of 33 mm or until there was no follicular growth for 3 consecutive days. At this point, ovulation was induced with 2500 IU of human chorionic gonadotropin (hCG, Vetecor, Calier Laboratory, São Paulo, Brazil) intravenously, and a transrectal ultrasound was performed every 6 hours. Artificial insemination was performed 24 hours after the induction of ovulation with 1×10^9 sperm from a stallion known to be fertile, and embryos were collected 8 days after ovulation.

2.2 Experiment 2

This experiment used 112 estrous cycles of 56 mares of different breeds between 3 and 22 years of age and weighing 350 to 500 kg. The animals were divided into control and treated groups, as described in Experiment 1.

After luteolysis induction on D8, the mares were monitored daily using transrectal ultrasound. When the ovaries had a follicle 25 mm in diameter and a second follicle $\geq 21 \pm 1$ mm in diameter, we started administering deslorelin acetate (100 µg) or 1 mL saline IM every 12 hours. Each was administered until at least two follicles reached ≥ 33 mm in diameter. We then induced ovulation and performed transrectal ultrasonography every 6 hours. Twenty-four hours after ovulation induction, we performed artificial insemination with 1×10^9 sperm

from five stallions known to be fertile, and embryo collection was performed 8 days after the first ovulation was detected.

2.3 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the program SAS, version 9.1. The variables were analyzed using Student's t-test or Fisher's exact test. All statistics were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Results from Experiment 1

The size of the two largest follicles at the beginning of treatment (D8) ranged from < 10 to 27 mm in diameter in the control group; in the treated group, they ranged from 10 to 24 mm in diameter. Among the mares in the treated group, the only two that responded to treatment had follicles between 21 and 24 mm in diameter at the start of treatment (Table 1).

The number of days from the start of treatment until the moment of ovulation induction varied from 2 to 11 days in the control group and from 3 to 6 days in the treated mares. Three mares in the treated group showed no follicular growth for 3 consecutive days, and treatment was stopped in those cases (Table 1).

The size of the follicles at the time of ovulation induction varied similarly for the both control and treated groups from 33 to 37 mm in diameter (Table 1).

There was one ovulation per mare in the control group, whereas two mares in the treated group had double ovulation, three mares had simple ovulation, and three mares showed follicular growth for 3 consecutive days but did not ovulate (Table 1).

Five embryos were recovered from the control group and six from the treated group. We recovered two embryos from the same uterine lavage for the two mares that presented with double ovulation (Table 1).

Table 1. Size (in mm) of the two largest follicles on D8 of the estrous cycle, number of days from treatment until ovulation induction, follicle size (in mm) at the time of induction, number of ovulations per mare and number of embryos recovered.

Mares	SZ (mm) of the 2 largest fols (D8)	Days before induction	SZ (mm) fol(s) at induction	Number of ovulations	Number of embryos recovered
Control	17–20	5	36	1	0
	18–18	9	35	1	1
	<10–<10	8	36	1	1
	<10–<10	11	33	1	1
	23–26	5	36	1	0
	16–18	7	35	1	1
	15–16	7	37	1	1
	20–27	2	36	1	0
Treated	10–18	NR	-----	0	0
	16–17	6	36	1	1
	15–16	NR	-----	0	0
	18–16	6	33	1	1
	21–24	3	34–37	2	2
	20–24	3	33–36	2	2
	15–18	5	36	1	0
	10–15	NR	-----	0	0

D8 = Day 8 of the estrous cycle; SZ = size (mm); fol(s) = follicle(s); NR = mares that did not show follicular growth for 3 consecutive days.

3.2 Results from Experiment 2

The average number of days of deslorelin acetate administration until ovulation induction was 3.5 days. The mares in the control group took an average of 6.7 days to achieve a 33-mm follicle and for ovulation to be induced (Table 2).

The size of the follicles at the time of ovulation induction was similar between the two groups. The interval between induction and the first ovulation was significantly lower in the treated group than in the control group (Table 2).

The interval between ovulations in the treated group was 13.5 hours on average. Nine mares (19.5%) presented with asynchronous ovulations, and the interval between the asynchronous ovulations was 21.6 hours (Table 2).

The number of mares that ovulated two follicles per cycle was significantly higher in the treated group (46 mares, 82%) (Table 2).

The number of ovulations, the average number of ovulations per cycle, the number of embryos recovered and the number of recovered embryos per cycle was significantly higher in the treated group (102 ovulations; 1.82 ovulations per cycle, 63 embryos; 1.12 embryos recovered per cycle) than in the control group (56 ovulations; 1.0 ovulations per cycle; 32 embryos; 0.57 embryos recovered per cycle) (Table 2).

The number and percentage of embryos recovered per ovulation were not significantly different between groups (Table 2).

Table 2. Absolute or average data and standard deviations for the variables measured between the control group and the group treated with deslorelin acetate to obtain multiple ovulations.

Variables	Control	Treated
Number of cycles utilized	56	56
Time to treatment after application of PGF _{2α} (days)	2.3 (±1.1)	2.3 (±1.0)
Diameter of the largest follicle at the initiation of treatment (mm)	24.1 (±2.1)	23.7 (±2.2)
Diameter of the second largest follicle at the initiation of treatment (mm)	22.1 (±1.6)	21.0 (±1.0)
Days of treatment	6.75 (±2.8) *	3.5 (±0.9)
Size(s) of follicle(s) at induction	35.3 (±2.7)	35.3 (±2.6)
Interval between induction and the first ovulation (hours)	42 (±5.1) *	35 (±6.1)
Interval between ovulations (hours)	0.0 (±0.0)	13.5 (±11.9)
Number of mares that ovulated asynchronously	0	9
Percentage of mares that ovulated asynchronously	0	19.5
Interval between asynchronous ovulations (hours)	0	21.6 (±4.8)
Number of mares that ovulated 2 follicles per cycle	0*	46
Percentage of mares with double ovulation per cycle	0.0*	82.0
Number of ovulations	56*	102
Average number of ovulations per cycle	1.0 (±0.0)*	1.82 (±0.5)
Number of embryos recovered	32*	63
Number of embryos recovered per cycle	0.57*	1.12
Percentage of embryos recovered per cycle	57.0*	112.5
Number of embryos recovered per ovulation	0.57	0.61
Percentage of embryos recovered per ovulation	57	61

*p<0.05

For the laterality of double ovulation, we observed a statistically significant difference in the percentage of unilateral ovulations compared to bilateral ovulations. However, the rate of embryo recovery did not differ and was independent of the laterality of ovulation (Table 3).

Table 3. Percentage of laterality and the embryo recovery rate from mares that presented with multiple ovulations.

	Unilateral	Bilateral
Laterality (%)	75.0*	25.0
Embryo recovery (%)	60.5	62.5

*p < 0.05

4. Discussion

Three animals from Experiment 1 showed no follicular growth for 3 consecutive days. The treatment with deslorelin acetate in these animals lasted 7 days, and after the seventh day of treatment, the follicles stopped growing and maintained the same diameter for 3 more days. These follicles then regressed, and ovulation did not occur. In several species, continuous administration of high doses of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist induces an initial hypersecretion of gonadotropins and a subsequent desensitization of the pituitary gland, promoting a reduction in the release of gonadotropin, an event termed, “downregulation” (IRVINE, 1983). Because three of these animals developed a similar downregulation pattern, we modified the treatment protocol with deslorelin acetate to minimize the number of applications per treatment.

The substance tested in this study is available at a low cost and produces consistent results, as seen in Experiment 2, compared to substances based on gonadotropins, such as equine pituitary extract (EPE) (ALVARENGA et al. 2001; SCOGGIN et al., 2002). Moreover, deslorelin acetate is a synthetic drug, so it has little to no lot-to-lot variation (CARMO et al., 2006).

A single study (GINTHER and BERGFELDT, 1990) in the literature cited the use of GnRH in acyclic mares to induce cyclicity and reported the incidence of multiple ovulations in some animals. They reported that when the applications of deslorelin acetate are started when there are at least two follicles with diameters ranging between 20 and 24 mm, double ovulation occurs the majority of the time (82%). In these animals, it is clear that treatments for a

shorter period of time (3 days) minimize the likelihood of triggering the downregulation phenomenon and allow for the occurrence of multiple ovulations during the cycle.

A similar strategy of reducing the duration of the protocols for inducing multiple ovulations has been reported by Gimenes et al. (2010), who observed that the duration of drug administration decreases when the treatment is initiated with follicles with a diameter of 20–23 mm.

The interval between induction and the first ovulation in the mares in the treated group was lower compared to the control group. This likely occurred because at the moment of ovulation induction, the mares in the treated group had larger follicles, with a diameter exceeding 35 mm, and may have promoted the release of endogenous luteinizing hormone.

The protocol used in Experiment 2 promoted a low ovarian stimulation compared to studies using EPE, where the number of pre-ovulatory follicles varied from 4.7 to 7.1 (ALVARENGA et al., 2001 and SCOGGIN et al., 2002).

However, the embryo recovery per ovulation showed similar rates to those obtained in the control group and different from those seen in studies that have shown ovarian hyperstimulation (ALVARENGA et al., 2001; CARMO et al., 2006; DIPPERT et al., 1994; SCOGGIN et al., 2002).

The presence of multiple pre-ovulatory follicles in the ovary was the explanation offered for the low rate of embryo recovery found by Carmo et al. (2006), who observed that a large number of ovulations may interfere with the uptake and transport of oocytes via the oviduct after ovulation occurs, due to the formation of a large blood clot in the ovulation fossa. These authors concluded that when more ovulations occur, the recovery rate of oocytes from the oviduct is lower. This fact is mainly related to the specific features of the mare's ovary, in which the positions of the layers of the cortex and medulla are inverted; thus, the follicles can only ovulate through the ovulation fossa (HIRANO et al., 2009).

Carmo et al. (2006) suggest a maximum of two ovulations per ovary so that the embryo recovery per follicle ovulated is not affected; a similar result was observed in this experiment. The percentage of mares that had unilateral ovulations was higher than the mares that had bilateral ovulations, corroborating the findings seen by Duarte (2003). However, these results differ

from those seen by Riera et al. (2006), who found no difference in the percentages of unilateral and bilateral ovulations in mares with multiple ovulations.

The rate of embryo recovery in relation to laterality did not differ, which contradicts the findings of Riera et al. (2006), who observed a higher embryo recovery in mares with multiple bilateral ovulations. Our findings also contrast with Riera et al. (2006) in that they found a higher embryo recovery and a higher number of lavages with two embryos in mares that had bilateral ovulations.

According to Alvarenga et al. (2008), the rate of embryo recovery per cycle is approximately 60%. Thus, with a 60% rate of pregnancy for embryo transfer, we can conclude that it takes three cycles per embryo donor to achieve a pregnancy. This study presents a protocol that allows for the recovery of one embryo per cycle, which reduces the cost of embryo transfer programs and increases the probability of achieving a pregnancy.

5. Conclusion

Deslorelin acetate is effective in inducing double ovulation in mares when the protocol is initiated when there are at least two follicles between 20 and 25 mm in the ovaries. On average, this protocol allows for the recovery of one embryo per uterine lavage.

6. Acknowledgments

This experiment was funded by FAPESP - The State of São Paulo Research Foundation.

7. References

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

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulations in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.88-91, 2008.

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

DUARTE, M.B. Incidence of double ovulation, twin pregnancy and efficacy of manual reduction of twins in Quarter Horse mares. 2003. **Dissertation** (Master's degree in animal reproduction) - Federal University of Uberaba, Uberaba, MG.

FRASER, H.M. Luteinizing hormone-releasing hormone and fertility control. Oxford. **Rev. Reprod. Biol.**, v.3, p.1-48, 1981.

GIMENES, A.M.; IGNÁCIO, F.S.; BOFF, A.L.N.; BERGFELT, D.R.; MEIRA, C. Enhanced ovarian response to low-dose treatment with equine pituitary extract in mares. **Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Córdoba, Argentina**, 9–12 January 2010, v.22, p.410.

GINTHER, O.J.; BERGFELDT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development during the existing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88: 119- 126, 1990.

HIRANO, Y.; KIMURA, J.; NAMBO, Y.; YOKOTA, H.; NAKAMURA, S.; TAKEMOTO, S.; HIMENO, R.; MISHIMA, T.; MATSUI, M.; MIYAKE, Y.I. Population of follicles and luteal structures during the oestrous cycle of mares detected by three-dimensional internal structure microscopy. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.38, p. 214-218, 2009.

IRVINE, C.H.G.; ALEXANDER, S.L. GnRH. In: **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, p.37-44, 1993.

MACHADO, M.S., ARANTES, M.; PERES, K.R., LEO, K.M., CARMO, M.T., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A. Follicular dynamics, number of ovulations

and recovered embryos in mares submitted to superovulatory treatment using equine pituitary extract and purified equine FSH. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v.27, n.3, p.506-8, 2003.

RIERA, F.L.; ROLDÁN, J.E.; HINRICHS, K. Patterns of embryo recovery in mares with unilateral and bilateral double ovulations. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 398-399, 2006.

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

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

ANEXO 1

Normas de Publicação da revista Animal Reproduction Science

ISSN: 0378-4320

PREPARATION

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

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

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

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

Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

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

Acknowledgements

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

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes

into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Web references

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:

<http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These Will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.