



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Medicina Veterinária
Câmpus de Araçatuba

Letícia Rodrigues Santana

Eficácia do hormônio folículo-estimulante equino recombinante (reFSH) para superovulação em éguas

**Araçatuba – SP
2017**

Letícia Rodrigues Santana

**Eficácia do hormônio folículo-estimulante
equino recombinante (reFSH) para
superovulação em éguas**

Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Carlos Antonio de Miranda Bomfim

**Araçatuba – SP
2017**

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Santana, Letícia Rodrigues

S231d

Eficácia do hormônio folículo-estimulante equino
recombinante (reFSH) para superovulação em éguas. / Letícia
Rodrigues Santana.
Araçatuba: [s.n], 2017.
24 f.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina
Veterinária, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Carlos Antônio de Miranda Bomfim

1. Cavalo. 2. Ovulação. 3. Hormônio. I. T.

CDD 636.1

ENCAMINHAMENTO

Encaminhamos o presente Trabalho Científico para que a Comissão de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis.

Letícia Rodrigues Santana
Estagiária

Prof. Ass. Dr. Carlos Antonio de Miranda Bomfim
Orientador

Araçatuba – SP
Junho / 2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço e ao meu pai, que sempre foi um exemplo para mim, me fortaleceu e sempre esteve ao meu lado. Não existe um sentimento maior do que a gratidão e o amor que sinto por vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me conduziu por todo o caminho e me deu forças para superar as dificuldades.

Ao professor Carlos Antônio de Miranda Bomfim pela paciência, orientação, apoio e inspiração que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora de Português Miriam Tallon pela revisão ortográfica deste trabalho.

À UNESP que me proporcionou excelentes mestres e ensinamentos que levarei para a vida toda.

EFICÁCIA DO HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE EQUINO RECOMBINANTE (reFSH) PARA SUPEROVULAÇÃO EM ÉGUAS

Letícia Rodrigues Santana

RESUMO

Na equideocultura há necessidade de melhorar a eficiência reprodutiva para maior aproveitamento dos animais. A superovulação em éguas facilitaria as biotecnologias da reprodução existentes, aumentando os ganhos de produção. Na égua, muitos folículos ovarianos iniciam o processo de maturação, mas geralmente um único ovula devido à inibição da liberação de hormônio folículo-estimulante. Portanto, manter altas concentrações desse hormônio circulantes, poderia aumentar as taxas de ovulações/ciclo. Algumas substâncias com esse hormônio já se mostraram eficazes para superovulação de éguas, porém como seus suprimentos se tornaram difíceis de adquirir, foi desenvolvido um hormônio folículo-estimulante equino recombinante como alternativa. Com base nisto, desenvolveu-se esta revisão sistemática de literatura com o objetivo de avaliar a hipótese de que o uso do hormônio folículo-estimulante equino recombinante seja eficaz para superovulação de éguas. Foram analisadas várias bases de dados por meio do Portal de Periódicos CAPES, utilizando duas estratégias de pesquisa com os descritores mare e reFSH, superovulation ou multiple ovulations. Os critérios de inclusão foram: publicações relacionadas ao assunto, que apresentavam o delineamento do tipo ensaio clínico randomizado, publicadas em inglês, resultando em sete artigos. Mesmo que o hormônio folículo-estimulante equino recombinante na maioria dos experimentos tenha se mostrado eficaz para superovulação em éguas, para que se chegue a uma conclusão mais confiável sobre o assunto, verifica-se a necessidade de se realizar mais ensaios clínicos com melhor qualidade científica e que tenham protocolos, sazonalidade das éguas e grupos comparados padronizados.

Palavras-chave: Cavalos. Ovulação. Hormônios.

THE EFFICACY OF RECOMBINANT EQUINE FOLLICLE STIMULATING HORMONE (reFSH) FOR SUPEROVULATION IN MARES

Leticia Rodrigues Santana

SUMMARY

In equideoculture there is a need to improve the reproductive efficiency for a greater exploitation of the animals. Superovulation in mares would facilitate the biotechnologies of existing reproduction, increasing production gains. In mare, many follicles initiate the maturation process, but usually have a single ovulated due to inhibition of follicle stimulating hormone release. Therefore, maintaining high concentrations of this circulating hormone could increase ovulation rates per cycle. Some substances with this hormone have already proved effective for superovulation of mares, but as their supplies became difficult to acquire, a recombinant equine follicle stimulating hormone was developed as an alternative. Based on this, this systematic literature review was developed with the objective of evaluating the hypothesis that the use of recombinant equine follicle stimulating hormone is effective for mares superovulation. Several databases were analyzed through CAPES Journals Portal, using two search strategies with the descriptors mare and reFSH, superovulation or multiple ovulations. The inclusion criteria were: publications related to the subject, which presented the design of the randomized clinical trial, published in English, resulted in seven articles. Even though the recombinant equine follicle stimulating hormone in most experiments has been shown to be effective for superovulation in mares, in order to arrive a more reliable conclusion on the subject, there is a need to carry out more scientific trials with better scientific quality that have protocols, seasonality of mares and standardized groups compared.

Palavras-chave: Horses. Ovulation. Hormones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Características dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática segundo os grupos comparados e os protocolos utilizados.....	18-21
--	-------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática quanto ao ano de publicação, tipo de estudo e sua confiabilidade e qualidade científica, utilizando-se as escalas de Cook et al. (1995) e Jadad et al. (1996).....	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BID = Duas vezes ao dia

eCG = Gonadotrofina coriônica equina

ECR = Ensaio clínico randomizado

eFSH = Hormônio folículo-estimulante equino

eLH = Hormônio luteinizante

EPE = Extrato de pituitária equino

FSH = Hormônio folículo-estimulante

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG = Gonadotrofina coriônica humana

IM = Intramuscular

IV = Intravenoso

LH = Hormônio luteinizante

n = número de animais ou ciclos

P & E = Progesterona e estradiol

PBS = Solução salina tamponada com fosfato estéril

pFSH = Hormônio folículo-estimulante suíno

PGF₂α = Prostaglandina F₂ alfa

PICO = Paciente, Intervenção, Comparação e *Outcome*

reFSH = Hormônio folículo-estimulante equino recombinante

reLH = Hormônio luteinizante equino recombinante

SID = Uma vez ao dia

TE = Transferência de embriões

TID = Três vezes ao dia

US = Ultrassonografia

LISTA DE SÍMBOLOS

α = Alfa

β = Beta

$\geq$ = Maior ou igual que

% = Por cento

$\leq$ = Menor ou igual que

$<$ = Menor que

$>$ = Maior que

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	23

INTRODUÇÃO

Na equideocultura atual há necessidade de melhorar a eficiência reprodutiva para maior aproveitamento dos animais geneticamente superiores. Neste sentido, se faz necessário o desenvolvimento e utilização de biotecnologias mais produtivas.

O sucesso da utilização de biotecnologias avançadas de reprodução na égua pode ser facilitado pela superovulação efetiva, a qual tem o potencial de aumentar o fornecimento de oócitos e embriões múltiplos, beneficiando diretamente biotécnicas rotineiras como a transferência de embriões (TE) e outras mais avançadas como a transferência intratubárica de gametas e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ROSER; MEYERS-BROWN, 2012). A superovulação poderia valorizar a TE por possibilitar colheita de embriões múltiplos, a qual eleva as taxas de prenhez e favorece o emprego da congelação de embriões (MCKINNON; SQUIRES, 2006).

O aumento da quantidade de ovulações pode melhorar as taxas de prenhez em éguas normais e até nas subférteis. Este pode viabilizar a utilização de sêmen de garanhões subférteis (ROSER; MEYERS-BROWN, 2012).

Os protocolos para múltiplas ovulações podem antecipar a estação de monta por possibilitar a primeira ovulação viável ainda no período de transição da estação de monta fisiológica, aumentando as chances de melhores taxas de prenhez (MEYERS-BROWN et al., 2017).

Apesar do grande potencial de agregação de valor às biotécnicas da reprodução, a superovulação nas éguas ainda carece de melhor entendimento quanto ao número de ovulações e repetibilidade das respostas diante dos protocolos utilizados. Parece que outras limitações como a recuperação dos oócitos em nível tubárico, qualidade embrionária e viabilidade ovariana são fatores limitantes à superovulação nas éguas (CARMO et al, 2006). Entretanto, entende-se que a pesquisa deve ser conduzida inicialmente ao entendimento da eficácia de uma metodologia para superovulação e depois para sua viabilidade comercial.

O padrão regular do ciclo estral das éguas depende do equilíbrio entre hormônios produzidos pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) estimula a síntese e liberação do hormônio folículo-estimulante de gonadotrofina (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. Estes hormônios entram na circulação sistêmica e,

nos ovários, o FSH é responsável pelo recrutamento folicular, enquanto o LH pela maturação folicular, produção de estrogênio, ovulação e luteinização. A inibina e o estrogênio produzidos por folículos que estão crescendo têm efeito de retroalimentação negativa na liberação de FSH. Muitos folículos iniciam o processo de maturação, mas geralmente somente um se torna dominante e ovula. (BRINSKO et al., 2010).

A porcentagem de duplas ovulações em éguas é baixa (ROSER; MEYERS-BROWN, 2012), mas se mantidas as concentrações de FSH circulantes em altas concentrações durante o desenvolvimento folicular, pode haver aumento do número de folículos ovulatórios e ovulações (JENNINGS et al., 2009).

O extrato de pituitária equino (EPE) e o hormônio folículo estimulante equino (eFSH) tiveram sucesso em induzir consistentemente ovulações múltiplas em éguas (SQUIRES; MCCUE, 2007), entretanto, a obtenção dos suprimentos dessas substâncias, encontradas na pituitária de equídeos, tornou-se difícil e onerosa desde o fechamento de matadouros desta espécie nos Estados Unidos, o que resultou na retirada dos produtos comerciais do mercado (CULLINGFORD et al., 2010).

O hormônio folículo estimulante equino recombinante (reFSH) surgiu como alternativa potencial para substituir o EPE e o eFSH, o qual foi projetado como uma quimera de cadeia única, anexando as subunidades α e β de eFSH usando o peptídeo carboxílico terminal de gonadotrofina coriônica equina / hormônio luteinizante equino (eCG / eLH) β (JENNINGS et al., 2009). As vantagens de sua preparação incluem pureza, esterilidade e consistência da bioatividade de FSH (MCCUE et al., 2015). Como o reFSH pode ser clonado repetidas vezes e em quantidades consideráveis, pode ser usado como recurso para aprimorar a superovulação em éguas (MEYERS-BROWN et al., 2010). Com base nas informações apresentadas, desenvolveu-se esta revisão sistemática de literatura com o objetivo de avaliar a hipótese de que o uso do reFSH seja eficaz para superovulação de éguas.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se esta revisão sistemática de literatura com o intuito de avaliar a eficácia do reFSH para superovulação em éguas. A pergunta – O reFSH para superovulação em éguas é eficaz? – utilizada para a realização da revisão

sistemática foi estruturada com base nos elementos do PICO – Paciente, Intervenção, Comparação e *Outcome* – conceituado pela “Medicina Baseada em Evidência”. **Paciente:** éguas. **Intervenção:** uso do reFSH. **Comparação:** grupo controle e/ou várias doses de reFSH e/ou outros protocolos de superovulação e/ou associação com hormônio luteinizante equino recombinante (reLH). **Outcome:** superovulação. Essa pergunta de pesquisa gerou a seguinte estratégia para busca: mare AND reFSH AND superovulation.

O levantamento bibliográfico foi realizado em maio de 2017 por meio do Portal de Periódicos CAPES, o qual selecionou 13 bases de dados que mais possuem publicações sobre o assunto: Science Direct Journals (Elsevier), Elsevier (CrossRef), Scopus (Elsevier), Science Citation Index Expanded (Web of Science), One Fire (GALE), AGRIS (United Nations, Food and Agriculture Organization), MEDLINE/PubMed (NLM), Technology Research Database, Materials Science & Engineering Database, BioOne, SpringerLink e PMC (PubMed Central).

Por meio da estratégia de busca utilizada foram encontradas 16 publicações. O critério de inclusão utilizado neste trabalho foi a análise do resumo e da metodologia, selecionando as publicações relacionadas com a utilização de reFSH para superovulação em éguas, que apresentavam o delineamento do tipo ensaio clínico randomizado, publicadas em inglês, resultando então em sete artigos. Entretanto, devido à existência de duas publicações que continham o mesmo experimento, a mais antiga foi excluída por se tratar de um resumo, reduzindo para seis artigos.

Para aumentar a quantidade de trabalhos, foi utilizada uma nova estratégia de busca utilizando termos sinônimos de superovulação. A nova estratégia foi mare AND reFSH AND (multiple ovulations), em que o Portal de Periódicos CAPES selecionou as bases de dados ScienceDirect Journals (Elsevier), Elsevier (CrossRef), Scopus (Elsevier), Science Citation Index Expanded (Web of Science), OneFile (GALE), AGRIS (United Nations, Food and Agriculture Organization), MEDLINE/PubMed (NLM), BioOne, sendo encontradas 12 publicações. Após excluir as que estavam duplicadas e selecionar aquelas que se enquadravam nos critérios de inclusão, foi selecionada apenas uma publicação, totalizando sete artigos. Nenhum critério de seleção foi aplicado se baseando no ano de publicação dos artigos.

Os trabalhos foram classificados de acordo com as escalas de Cook et al. (1995) e de Jadad et al. (1996), avaliando-se quanto a confiabilidade e qualidade. Além disso, os resultados relacionados às taxas de ovulação de cada artigo avaliado foram utilizados para concluir se o uso de reFSH em éguas é eficaz para superovulação, baseando-se no consenso ou não dos autores a respeito do assunto. Literatura complementar relacionada ao assunto, mas sem critério específico foi utilizada para redação da introdução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analizou-se sete trabalhos envolvendo o uso do reFSH para a superovulação de éguas, sendo que um deles apresentava três experimentos, totalizando nove experimentos analisados, todos ensaios clínicos randomizados (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática quanto ao ano de publicação, tipo de estudo e sua confiabilidade e qualidade científica, utilizando-se as escalas de Cook et al. (1995) e Jadad et al. (1996).

Autores	Ano de publicação	Tipo de Estudo*	Escala de Jadad	Escala de Cook
Jennings et al.	2009	ECR	0	III
Meyers-Brown et al. (Experimento 1, 2 e 3)	2010	ECR	0	III
Cullingford et al.	2010	ECR	0	III
Meyers-Brown et al.	2011	ECR	0	III
Ross et al.	2012	ECR	0	III
Meyers-Brown et al.	2013	ECR	3	III
Meyers-Brown et al.	2017	ECR	0	III

*ECR = Ensaio Clínico Randomizado

Os trabalhos foram classificados de acordo com a escala de Cook et al. (1995), a qual possui pontuação de I a VII, aumentando o grau de confiabilidade de forma decrescente. Todas as publicações estudadas receberam pontuação III, sendo classificadas como de boa confiabilidade. Os artigos também foram classificados pela escala de Jadad et al. (1996), avaliando-se quanto a qualidade científica. Nessa classificação, as notas aplicadas variam de 0 a 5, sendo que apenas aqueles que têm pontuação ≥ 3 são considerados de alta qualidade. Dentre os trabalhos, apenas um foi classificado como de alta qualidade (Tabela 1). Tendo

isso em vista, pode-se perceber que a maioria dos artigos encontrados na literatura sobre o assunto não possui qualidade científica satisfatória.

Entre os sete trabalhos analisados existem muitas variações em relação aos protocolos utilizados, aos grupos comparados e a sazonalidade em que se encontravam as éguas (Quadro 1). Entretanto, todos comparam a quantidade de ovulações entre os grupos analisados e utilizaram ultrassonografia (US) via transretal para confirmar a data e quantidade dessas ovulações. Em relação à ciclicidade das éguas utilizadas, 77,8% dos experimentos trabalharam com éguas que já estavam ciclando e 22,2% deles utilizaram éguas em anestro. O critério adotado para o anestro foi a existência de folículos ≤ 20 mm e os níveis séricos de progesterona $< 1,0$ ng / mL, quando examinados uma vez por semana durante três semanas consecutivas antes do início dos estudos.

Quadro 1. Características dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática segundo os grupos comparados e os protocolos utilizados.

Referência	Grupos comparados	Protocolo utilizado
Jennings et al. (2009)	n total = 15 animais • Grupo 1 (n=5): 0,5 mg de reFSH em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) duas vezes ao dia (BID) intravenoso (IV); • Grupo 2 (n=5): 0,85 mg de reFSH em 1 mL de PBS BID IV; • Grupo 3 (n=5): placebo de 1 mL de PBS BID IV.	As éguas receberam prostaglandina F_2 alfa ($PGF_{2\alpha}$) – 5 mg de dinoprost ² - durante a fase lútea para sincronização do estágio dos ciclos. A ovulação foi detectada por US via transretal. Nos dias um a 14 pós-ovulação, as concentrações endógenas de gonadotrofina e atividade folicular foram suprimidas por injeção diária de 150 mg de progesterona e 10 mg de 17β -estradiol (P & E) em óleo (3 mL, Havyard Pharmacy, Lexington, KY) intramuscular (IM). A $PGF_{2\alpha}$ foi administrada no dia seis pós-ovulação para induzir a luteólise. As éguas foram distribuídas aleatoriamente aos grupos e os tratamentos foram realizados entre os dias oito e 14 pós-ovulação. Quando havia um folículo de 35 mm, as éguas receberam 0,75 mg IV de reLH ³ para induzir ovulação.
Meyers-Brown et al. (2010)	Experimento 1 n total = 16 animais • Grupo 1 (n=8): placebo de PBS BID e uma vez ao dia (SID) IV; • Grupo 2 (n=8): 0,85 mg de reFSH³ em 1,0 mL de PBS BID e SID IV	As éguas passaram por um ciclo estral e a detecção da ovulação foi realizada por US via transretal. Quando um folículo de 22 a 25 mm estava presente, as éguas foram distribuídas aleatoriamente aos grupos e começaram a receber o tratamento. No segundo dia de tratamento, todas elas receberam $PGF_{2\alpha}$ IM - 250 μ g de Cloprostenol sódico ⁴ para lisar o corpo lúteo. As éguas foram tratadas BID por três dias e SID, até que houvesse folículo de aproximadamente 32 mm de diâmetro, quando o tratamento com reFSH ³ foi cessado. As éguas ficaram 36 horas sem receber medicamentos. Quando havia folículo de 35 a 38 mm de diâmetro, as éguas receberam 0,75 mg IV de reLH ³ e 12 horas depois 2.500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) ⁵ IV para induzir ovulação.

Continuação

Continuação

Quadro 1. Características dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática segundo os grupos comparados e os protocolos utilizados.

Referência	Grupos comparados	Protocolo utilizado
Meyers-Brown et al. (2010)	Experimento 2 n total = 67 ciclos (28 animais) • Grupo 1 (n=19): Controle; • Grupo 2 (n=11): 12,5 mg eFSH⁶ BID IM; • Grupo 3 (n=14): 0,35 mg reFSH BID IM; • Grupo 4 (n=11): 0,5 mg reFSH BID IM; • Grupo 5 (n=12): 0,65 mg reFSH BID IM;	As éguas passaram por um ciclo estral, a detecção da ovulação foi realizada por US via transretal e então foram distribuídas em grupos aleatoriamente. As éguas foram usadas em mais de um grupo de tratamento, desde que passassem por um ciclo sem tratamento antes de serem incluídas no novo grupo. O tratamento foi iniciado quando havia folículo de 22-25 mm de diâmetro e continuou até que $\geq 50\%$ dos folículos atingiram 32 mm de diâmetro. As éguas receberam PGF₂α - 250 μg de Cloprostenol sódico⁴ - no segundo dia de tratamento. As éguas ficaram 36 horas após o tratamento sem receber medicamentos antes de receberem 2.500 UI IV de hCG⁵ para induzir ovulação.
Meyers-Brown et al. (2010)	Experimento 3 n total = 20 animais • Grupo 1 (n=5): 0,85 mg de reFSH BID IV; • Grupo 2 (n=5): 0,85 mg de reFSH SID IV; • Grupo 3 (n=5): 0,50 mg de reFSH BID IV; • Grupo 4 (n=5): 12,5 mg eFSH⁶ BID IM.	As éguas passaram por um ciclo estral e a detecção da ovulação foi realizada por US via transretal. O tratamento foi iniciado quando havia folículo de 22 a 25 mm de diâmetro. As éguas foram distribuídas aleatoriamente em um dos grupos. No segundo dia de tratamento as éguas receberam PGF₂α IM - 10 mg de dinoprost². Os tratamentos foram continuados até pelo menos dois folículos chegarem ao tamanho de aproximadamente 32 - 35 mm de diâmetro. As éguas ficaram 36 horas sem receber medicamentos, após o que receberam 1,5 mg de reLH IV para induzir a ovulação.
Cullingford, et al. (2010)	n total = 66 ciclos (29 animais) • Grupo 1 (n=23): Controle; • Grupo 2 (n=8): 0,50 mg de reFSH BID IM; • Grupo 3 (n=10): 25 mg de hormônio folículo estimulante suíno (pFSH) BID IM; • Grupo 4 (n=9): 50 mg de pFSH BID IM; • Grupo 5 (n=8): 100 mg de pFSH BID IM; • Grupo 6 (n=8): 150 mg de pFSH BID IM.	As éguas foram usadas até três vezes. Elas passaram por um ciclo estral com a ovulação monitorada por US via transretal. Quando um folículo de 20 a 22 mm estava presente, as éguas foram distribuídas aleatoriamente aos grupos e começaram a receber o tratamento de 25, 50 ou 100 mg de pFSH (Folltropin-V[®], Bioniche Animal Health, Bogart, GA, EUA), BID até que a maioria dos folículos tivessem diâmetro ≥ 30 mm. No dia dois do tratamento, foram administrados PGF₂α IM - 250 μg de Cloprostenol sódico⁴. As éguas receberam 2.500 UI IV de hCG⁵, 24 a 38 horas após a última injeção de pFSH. O grupo controle foi composto de 23 ciclos de 23 das éguas após os primeiros ciclos de tratamento. Neste grupo, quando vários folículos atingiram ≥ 35 mm de diâmetro, foi administrado 1,5 mg / mL IM de acetato de deslorelina (Franck's Pharmacy, Ocala, FL, EUA) para induzir ovulação. Os tratamentos 150 mg de pFSH e 0,5 mg de reFSH foram constituídos após o grupo controle.

Continuação

Continuação

Quadro 1. Características dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática segundo os grupos comparados e os protocolos utilizados.

Referência	Grupos comparados	Protocolo utilizado
Meyers-Brown et al. (2011)	n total = 16 animais • Grupo 1 (n=8): 0,65 mg de reFSH³ em 1 mL de PBS BID e SID IV / placebo de 2 mL de PBS BID e três vezes ao dia (TID) IV; • Grupo 2 (n=8): 0,65 mg reFSH³ em 1 mL de PBS BID e SID IV / 0,75 mg de reLH³ em 2 mL de PBS BID e TID IV.	As éguas passaram por um ciclo estral e a detecção da ovulação foi realizada por US via transretal. Quando um folículo de 22 a 25 mm estava presente, as éguas foram distribuídas aleatoriamente aos grupos e começaram a receber o tratamento. Todas elas receberam reFSH³ BID durante 3 dias e SID até que um folículo ou mais atingissem aproximadamente 32 mm de diâmetro. Quando havia um ou mais folículos de 29 mm de diâmetro foram administrados IV BID ao Grupo 1 dois mL de PBS e ao Grupo 2, dois mL de reLH³ em PBS. Quando um ou mais folículos atingiram 32 mm de diâmetro passou-se para TID até que a maioria dos folículos atingira 35-38 mm. No segundo dia de tratamento, todas as éguas receberam 250 µg de Cloprostenol sódico (Schering-Plough, Atlanta, GA) para lisar o corpo lúteo. Quando os folículos atingiram 35 a 38 mm foi administrado 2.500 UI IV de hCG⁵ para induzir ovulação.
Ross et al. (2012)	n total = 48 animais • Grupo 1 (n=12): reFSH³ / reLH³ + Acetato de deslorelina; • Grupo 2 (n=12): reFSH³ / reLH³ + reLH³; • Grupo 3 (n=12): reFSH³ + Acetato de deslorelina; • Grupo 4 (n=12): reFSH³ + reLH³.	As éguas passaram por um ciclo estral e a detecção da ovulação foi realizada por US via transretal. Uma vez que o maior folículo estava entre 20-25 mm, o tratamento com reFSH³ foi iniciado. Foi administrado 0,65 mg IM de reFSH³ BID durante 3 dias e depois SID até um folículo de 32 mm (Grupos 1-2) ou 35 mm (Grupos 3-4) ter sido detectado. As éguas nos Grupos 1 e 2 receberam 1,5 mg IV de reLH³ BID quando havia folículo de 29 mm e TID ao atingir 32 mm de diâmetro. No dia dois do tratamento, todas as éguas receberam cloprostenol sódico. As éguas ficaram 24-36 horas sem receber medicamentos após um folículo >35 mm ser detectado. Em seguida, foram administrados 1,5 mg de acetato de deslorelina (IV, Grupo 1 e 3) ou 3 mg de reLH³ (IV, Grupo 2 e 4) para induzir ovulação. Éguas que não ovularam em um período de 48 horas também receberam 1.500 IU hCG (IV).
Meyers-Brown et al. (2013)	n total = 60 animais • Grupo 1 (n=30): 0,65 mg de reFSH³ em 1,3 mL de PBS IM; • Grupo 2 (n=30): placebo de 1,3 mL de PBS IM.	As éguas em anestro estacional foram distribuídas em dois grupos aleatoriamente. O período de tratamento foi realizado até: a égua desenvolver um ou mais folículos de ≥35 mm de diâmetro ou por um período máximo de 15 dias consecutivos. As éguas que desenvolveram um folículo de ≥35 mm de diâmetro durante o período de tratamento, com turgidez uterina apropriada e relaxamento cervical, ficaram 36 horas sem medicamento e depois receberam 2.500 UI de hCG⁵ para induzir ovulação. Neste experimento, o tratamento BID foi realizado como 8 horas de intervalo.

Continuação

Continuação

Quadro 1. Características dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática segundo os grupos comparados e os protocolos utilizados.

Referência	Grupos comparados	Protocolo utilizado
Meyers-Brown et al. (2017)	n total = 30 animais • Grupo 1 (n=10): 0,65 mg de reFSH³ em 1,3 mL de PBS IM BID / placebo de PBS BID. Fotoperíodo natural. • Grupo 2 (n=10): 0,65 mg de reFSH³ em 1,3 mL de PBS IM BID e SID / 1,5 mg de reLH³ em 2 mL de PBS IV BID e TID. Fotoperíodo natural. • Grupo 3 (n=10): placebo 1,3 mL de PBS IM BID. Fotoperíodo Artificial.	Foram utilizadas éguas que estavam em anestro estacional. O desenvolvimento folicular foi monitorado durante os tratamentos e até no máximo 14 dias. No Grupo 1, as éguas receberam reFSH ³ IM BID. Quando um ou mais folículos atingiram 32 mm de diâmetro, as éguas receberam PBS BID, até que um folículo ou mais atingissem 35 mm de diâmetro. As éguas ficaram sem tratamento por 36 horas após o que foi administrado 2.500 IU IV de hCG ⁵ para induzir ovulação. As éguas no Grupo 2 receberam o reFSH ³ BID até que um folículo atingira 29 mm de diâmetro, quando então passaram a receber SID até atingir 32 mm. Concomitante à administração de reFSH ³ SID, também receberam 1,5 mg de reLH ³ em 2 mL de PBS IV BID até um folículo ou mais atingirem 32 mm de diâmetro e depois TID. Quando atingiram ≥35 mm de diâmetro, as éguas receberam hCG ⁵ IV para induzir ovulação. As éguas no Grupo 3 receberam, além de PBS, 16 horas de luz artificial. Todos os tratamentos foram continuados até haver folículo de ≥35 mm de diâmetro ou por no máximo 14 dias consecutivos. Neste experimento, o tratamento BID foi realizado como 8 horas de intervalo.

1. n = número de animais ou ciclos
2. Lutalyse®, Pharmacia e Upjohn CO, Kalamazoo, MI, EUA
3. AspenBio Pharma, Castle Rock, CO, EUA
4. Estrumate® Intervet / Schering Plough Animal Health, Rosewood, NJ, EUA.
5. Chorulon®, Intervet, Millsboro, EUA.
6. Bioniche Animal Health Inc., Athens, GA, USA.

Meyers-Brown et al. (2010), no experimento 1 e Meyers-Brown et al. (2013) fizeram comparação entre dois grupos: um que recebeu reFSH e outro que recebeu o placebo. O primeiro utilizou éguas que já estavam ciclando e observaram que o número de ovulações foi maior no grupo tratado com reFSH (0,85 mg) em comparação com o grupo controle. Já o segundo estudo utilizou éguas em anestro e demonstrou que as éguas tratadas com reFSH (0,65 mg) tiveram múltiplas ovulações enquanto o grupo controle não teve desenvolvimento folicular. Portanto, a condição de ciclicidade das éguas não interferiu na ação do reFSH, o qual mostrou-se promissor para aumentar a taxa de ovulação em ambas metodologias utilizadas.

Jennings et al. (2009) testaram diferentes doses de reFSH (0,85 e 0,5 mg) e verificaram que não houve diferença significativa do número de ovulações entre os grupos tratados com diferentes doses de reFSH. Entretanto, mesmo não obtendo

resultado significativo, citaram que algumas éguas individualmente tiveram ovulações de até seis folículos após o tratamento com 0,5 mg de reFSH BID e até quatro folículos após 0,85 mg de reFSH BID. Desta maneira, o estudo deles sugere que doses menores como 0,5 mg de reFSH possam ser usadas.

Meyers-Brown et al. (2010) em seu experimento 2 (Quadro 1) usando as doses de 0,35; 0,5 e 0,65 mg de reFSH não tiveram resultados favoráveis apenas na primeira dose, enquanto nas duas últimas os resultados foram positivos e semelhantes. Quando em outra oportunidade (experimento 3 – Quadro 1) aumentaram a dose para 0,85 mg comparada a 0,5 mg, também não obtiveram diferença significativa. Logo, a dose de 0,5 mg realmente mostrou-se ser a dose mínima efetiva para superovulação em éguas. Além disso, as doses 0,65 e 0,85 mg também mostraram-se eficientes para aumentar as taxas de ovulações.

Neste último experimento os autores também testaram o uso de BID, que até então vinha sendo utilizado (Meyers-Brown et al., 2010; Jennings et al., 2009; Meyers-Brown et al., 2013), com SID na dose de 0,85 mg, e não observaram diferença nas taxas de ovulação.

O reFSH (doses de 0,35; 0,5 e 0,65 mg) pode ser comparado ao eFSH (12,5 mg) quanto a sua eficiência em produzir múltiplas ovulações (experimento 2, Meyers-Brown et al., 2010), em que os autores verificaram que reFSH nas doses de 0,5 e 0,65 foi efetivo e semelhante ao eFSH. Na sequência (experimento 3) fizeram a mesma comparação nas doses de 0,5 e 0,85 mg de reFSH comparado a dose 12,5 mg de eFSH repetindo-se os resultados. Portanto, várias doses de reFSH mostram-se eficazes, entretanto, sua eficácia é semelhante a do eFSH para múltiplas ovulações.

Cullingford et al. (2010) comparam o reFSH (0,5 mg) com o pFSH (25; 50; 100 e 150 mg) não obtendo diferença estatística, havendo taxas de ovulação decepcionantes (0,85 a 1,31 ovulações/ciclo). Estes autores não repetiram os resultados com reFSH observados anteriormente por outros pesquisadores (Meyers-Brown et al., 2010; Jennings et al., 2009; Meyers-Brown et al., 2013).

Pode-se encontrar três estudos que compararam a utilização do reFSH associado ao reLH. Meyers-Brown et al. (2011) e Ross et al. (2012) utilizaram éguas ciclando e Meyers-Brown et al. (2017) éguas em anestro. No primeiro, observou-se maior número de ovulações múltiplas no grupo que recebeu reFSH / reLH. No

segundo, mesmo que não tenham sido detectadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis analisadas, no geral, 4,7 ovulações por égua tratada foram registradas, demonstrando que o uso do reFSH para superovulação em qualquer um dos grupos tratados foi eficiente. Entretanto, no terceiro estudo, observaram um número significativamente maior de ovulações nas éguas que receberam reFSH do que nas éguas que receberam reFSH / reLH. Sendo assim, pode-se dizer que a necessidade de associar o reFSH com reLH para aumentar as ovulações pode estar associada à condição da égua estar ciclando. Os resultados do uso de reFSH, nestes experimentos, continua reforçando sua efetividade para causar múltiplas ovulações em éguas, independente da associação com o reLH, a qual tem o potencial de melhorar resultados desde que utilizada em éguas ciclando.

CONCLUSÃO

Mesmo que na maioria dos experimentos o uso do reFSH para superovulação em éguas tenha se mostrado eficaz, esta conclusão não tem um alto grau de confiabilidade, uma vez que entre os trabalhos há muitas variações em relação ao protocolo utilizado, aos grupos comparados e à sazonalidade em que se encontravam as éguas tratadas. Além disso, como a maioria dos trabalhos recebeu baixa classificação na escala de Jadad et al. (1996), observa-se sua qualidade científica insatisfatória. Portanto, para que se chegue a uma conclusão confiável sobre o assunto, há a necessidade de se realizar mais ensaios clínicos com melhor qualidade científica e que tenham protocolos, sazonalidade das éguas e grupos comparados padronizados.

REFERÊNCIAS

BRINSKO, S. P. et al. Reproductive physiology of the nonpregnant mare. In: _____. **Manual of Equine Reproduction**. 3. ed. Maryland Heights, MO: Mosby Elsevier, 2010. cap. 2 p.10-18.

CAPES. Portal de periódicos da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior. 2017. Disponível em: < http://www-periodicos-capes-gov-br.ez87.periodicos.capes.gov.br/index.php?option%3Dcom_phome%26Itemid%3D68%26 >. Acesso em: 15 maio 2017.

CARMO, M. T. et al. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4 p. 337-339, 2006.

COOK, D. J. et al. Clinical recommendations using levels of evidence for antithrombotic agents. **CHEST Journal**, v. 108, n. Suppl. 4, p. 227S-230S, 1995.

CULLINGFORD, E. L. et al. Attempts at superovulation of mares with porcine follicle stimulating hormone and recombinant equine follicle stimulating hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 6, p. 305-309, 2010.

JADAD, A. R. et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? **Controlled Clinical Trials**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 1996.

JENNINGS, M. W. et al. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 3, p. 291-307, 2009.

MCCUE, P. M. et al. Superovulation. In: _____. **Equine Embryo Transfer**. 1. ed. Jackson, MS: Teton New Media, 2015. cap. 5 p. 35-38.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related technologies. In: SAMPER, J. C. et al. **Current Therapy in Equine Reproduction**. 1. ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, 2006. cap. 51, p. 319-334.

MEYERS-BROWN, G. A. et al. Deep anestrous mares under natural photoperiod treated with recombinant equine FSH (reFSH) and LH (reLH) have fertile ovulations and become pregnant. **Theriogenology**, v. 98, p. 108-115, 2017.

MEYERS-BROWN, G. A. et al. Induction of ovulation in seasonally anestrous mares under ambient lights using recombinant equine FSH (reFSH). **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 456-462, 2013.

MEYERS-BROWN, G. A. et al. Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone: ovulation rates, embryo retrieval, and hormone profiles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 10, p. 560-568, 2010.

MEYERS-BROWN, G. A. et al. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v. 128, n. 1, p. 52-59, 2011.

ROSER, J. F.; MEYERS-BROWN, G. A. Superovulation in the mare: a work in progress. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 7, p. 376-386, 2012.

ROSS, P. J. et al. Superovulation of cycling donor mares using recombinant equine gonadotropins and different ovulation induction agents. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 7, p. 403, 2012.

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