

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

RESPOSTA OVAVRIANA E TAXA DE
RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS
TRATADAS COM FSH SUÍNO

FERNANDA SAULES IGNÁCIO

BOTUCATU – SP
JUNHO 2009

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

RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS TRATADAS COM FSH SUÍNO

FERNANDA SAULES IGNÁCIO

ORIENTADOR: Prof. Adj. Cezinande de Meira

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

BOTUCATU – SP
JUNHO 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ignácio, Fernanda Saules.

Resposta ovariana e taxa de recuperação embrionária em
éguas tratadas com FSH suíno / Fernanda Saules Ignácio. –
Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2009.

Orientador: Cezinande de Meira

Assunto CAPES: 50405004

1. Eqüino - Reprodução - Aspectos farmacológicos 2.
Ovulação - Égua

CDD 636.10824

Palavras-chave: Aspiração folicular; Éguas; Embriões;
Superovulação

Nome do Autor: Fernanda Saules Ignácio

Título: RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS TRATADAS COM FSH SUÍNO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Cezinande de Meira

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: 30 de Junho de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, mãe, pai, meus avós e meus irmãos, que sempre me incentivaram simplesmente por apoiarem meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma e de todas as formas ajudaram na elaboração e no bom desenvolvimento deste trabalho.

No entanto, alguns agradecimentos especiais são essenciais:

Ao professor Cezinande de Meira, pela orientação e amizade. Pelo dia a dia que sempre fez dos trabalhos e reuniões encontros enriquecedores, tanto para a minha vida profissional quanto para minha vida pessoal. Um exemplo de perseverança e honestidade.

Ao pesquisador Donald Rick Bergfelt pela disponibilidade e acessibilidade. Sempre disposto a me ajudar com todos os trabalhos e dúvidas, não importando com hora ou se veio de tão longe em uma viagem familiar... Sempre amigo e acrescentador!

Às famílias de Cezinande de Meira e Donald Rick Bergfelt, pela compreensão devido as horas mais inoportunas que resolvemos trabalhar e, principalmente, pelo ótimo recebimento.

A todos os professores, funcionários, residentes, estagiários e colegas de pós do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo bom convívio e pelo apoio, o que faz nosso departamento sempre forte.

Aos funcionários Miguel Alves e Benedito Fogaça pela ajuda e cuidado com os animais usados nesse experimento, além do ótimo convívio e amizade.

Ao professor Nicolau Puoli Filho pela manutenção de nossos animais na Fazenda Edgárdia durante e fora da estação de monta.

À professora Lúcia R. Carvalho e ao colega Gustavo H. Araújo pelas análises estatísticas.

À FAPESP pelo suporte financeiro fornecido para realização deste projeto.

À empresa Bioniche pelo fornecimento do hormônio Folltropin-V®.

A José Victor de Oliveira por fornecer espaço, animais e todo o suporte para a realização de um dos experimentos na fazenda experimental de Alta Mogiana, Colina, SP da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA). Junto a ele não posso deixar de agradecer a todos os funcionários que participaram e me ajudaram diariamente no desenvolvimento do experimento. Muito obrigada pela amizade e confiança que me foram dadas durante os quase quatro meses que lá vivi.

Ao Pedro Victor por toda a ajuda, reclamações, implicas e... Gargalhadas!!! Nosso convívio e hoje a amizade que formamos é muito importante para mim, principalmente por ter sido formada num momento quando as alegrias se misturaram às perdas... Ele me fez rir em todos estes momentos!

Ao Juliano Roman, amigo que conheci também em Colina e que, além de termos tido uma ótima convivência durante nossa estadia na pensão, mostrou-se, acima de tudo, uma pessoa de coração imenso. Deu-me forças para superar a minha dor e permitiu-me dar o último (porém, transitório) Adeus a uma das pessoas mais importantes da minha vida.

Aos meus amigos que moram em meu coração, são, definitivamente, a família que me foi permitido escolher. Desde os tempos da faculdade: Andreza, Luciana, Daiane, Carol e Juliana

acompanham-me sempre, mesmo de longe. Nossa amizade é eterna!!! Aos amigos que, apesar de muitos fazerem parte de minha história antes de Botucatu, principalmente hoje são essenciais a mim: Andreza (de novo), Ana Paula, Gabriel, Jair, Simone, Giovana, Priscilla, Danizinha e Dani! Tudo o que passamos juntos, desde as festas até os momentos de estudos, formam e fortalecem hoje o que sou. Sem vocês seria muito mais difícil estar tão longe de casa... Nós fizemos aqui a nossa casa!

Às amigas-irmãs, um agradecimento muito especial! Daniela Mendes, Daniela Montechiesi, Cássia Orlandi e eu trabalhamos juntas, uma no experimento da outra, tomando a responsabilidade para todas nós! Cássia colocou em nós este sentimento e, hoje, temos o orgulho de dizer que somos uma equipe: Equipe Meira.

A todas as pessoas que passaram pelo meu caminho em qualquer fase da minha vida... Assim como os lugares... As nossas experiências são o que nos formam e, com certeza, eu não teria desenvolvido este trabalho da mesma maneira se não tivesse passado por TODAS as experiências pelas quais passei... Por isso, também saio agora uma nova pessoa.

Às éguas... O maior motivo pelo qual hoje faço tudo isso! O amor a elas é antigo e, espero, em um futuro próximo, poder voltar a elas todo o benefício que elas hoje me proporcionam. Sei que hoje meu amor é quase que expresso somente em “exploração”, são elas que me fornecem tudo para que eu possa crescer e aprender, por isso, meus profundos agradecimentos.

À minha família... Sem palavras para expressar o que representam para mim... Minha mãe Marcia nunca polpou esforços para me fornecer subsídios, de todas as fontes e formas, para que eu pudesse sempre crescer e correr atrás dos meus sonhos. É para mim prova de amor sem limites! Meu pai Fernando que nunca deixou de me apoiar com palavras de crescimento. Muitas palavras que mudaram meu modo de ver o mundo. Meus irmãos, Paula e Carlos Henrique, um dos meus maiores presentes na vida, estamos sempre um com outro. Meus avós... Minha vó Áurea, a nossa mãe... Sempre carinhosa... Meu vô Léo, que nunca nos deixou faltar nada! Sempre me apoiou, confiou em mim e no caminho que eu escolhi traçar. Mesmo não concordando com todas as minhas escolhas, sempre me ajudou e permitiu que eu seguisse o meu caminho simplesmente por saber que era o que me fazia feliz! Ele sempre foi muito mais do que eu sempre precisei e tenho certeza que está sempre comigo!

A Deus e ao amor que rege a vida!

“Há pessoas que choram por saber que as
 rosas têm espinhos,
Há outras que sorriem por saber que os
 espinhos têm rosas!”
 (Machado de Assis)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Média e erro padrão dos números de folículos entre 25-29mm e folículos ≥ 30 mm no momento da indução, diâmetros máximos alcançados por F1, F2 e F3, número de ovulações por égua, número de embriões recuperados por égua, número de embriões recuperados por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamento no experimento 1.....	28
TABELA 2 - Média e erro padrão do crescimento diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) expresso em mm no experimento 1.....	29
TABELA 3 - Média e erro padrão dos números de folículos entre 25-29mm e folículos ≥ 30 mm no momento da indução, diâmetros máximos alcançados por F1, F2 e F3, número de ovulações por égua, número de embriões recuperados por égua, número de embriões recuperados por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamento no experimento 2.....	31
TABELA 4 - Média e erro padrão do crescimento diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) expresso em mm no experimento 2.....	32
TABELA 5 - Média e erro padrão dos números de folículos entre 25-29mm e folículos ≥ 30 mm no momento da indução, diâmetros máximos alcançados por F1, F2 e F3, número de ovulações por égua, número de embriões recuperados por égua, número de embriões recuperados por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamento no experimento 3.....	34
TABELA 6 - Média e erro padrão do crescimento diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) expresso em mm no experimento 3.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Esquema de tratamento com FSHp nos grupos submetidos a aspiração folicular (FSHp-F13 e FSHp-F20) no experimento 1.....	22
FIGURA 2 -	Esquema de tratamento controle com NaCl 0,9% no grupo submetido a aspiração folicular (Salina-F13) no experimento 1.....	22
FIGURA 3 -	Esquema de tratamento superovulatório com FSHp no grupo não submetido a aspiração folicular (FSHp-D6) no experimento 1.....	22
FIGURA 4 -	Esquema de tratamento com 50 mg de FSHp (Grupo FSHp-F13) e salina (Grupo controle) no experimento 2.....	24
FIGURA 5 -	Esquema de tratamentos com salina (Grupo controle), 25 mg de FSHp (Grupo 25FSHp-D6), EPE (Grupo EPE-D6) e 50 mg de FSHp (Grupo 50FSHp-D6) no experimento 3.....	25
FIGURA 6 -	Gráficos da média do desenvolvimento folicular diário dos F1, F2 e F3 de cada grupo do experimento 1, experimento 2 e experimento 3. A linha pontilhada indica o momento de aplicação do hCG ou D0. $P<0,05$ para efeito de momento nos gráficos A, B, C, D, E, F, G e H. $P<0,05$ para efeito de grupos no gráfico F.....	36

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Fisiologia do ciclo estral	5
2.2. Indução da emergência da onda folicular	8
2.2.1. Aspiração folicular	9
2.3. Superovulação	10
2.3.1. Hormônio	11
2.3.1.1. Extrato de pituitária equino (EPE)	12
2.3.1.2. FSH equino (FSHe)	13
2.3.1.3. FSH suíno (FSHp)	14
2.3.2. Início do tratamento	15
2.3.3. Dose e frequência de aplicações	16
2.3.4. Número de ovulações	16
2.3.4.1. Uso de baixa dose	17
2.4. Indução da Ovulação	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Experimento 1	19
3.2. Experimento 2	19
3.3. Experimento 3	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Experimento 1	20
4.1.1. Animais e grupos experimentais	20
4.1.2. Desenvolvimento folicular, inseminação artificial (IA) e colheita de embriões ..	21
4.1.3. Aspiração folicular	23
4.2. Experimento 2	23
4.3. Experimento 3	24
4.3.1. Preparação do EPE	25
4.4. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	26
5.1. Experimento 1	26
5.2. Experimento 2	30
5.3. Experimento 3	33
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS	43
9. TRABALHO CIENTÍFICO	55
ANEXO	81
ANEXO 1	82

IGNÁCIO, F.S. **Resposta ovariana e taxa de recuperação embrinária em éguas tratadas com FSH suíno.** Botucatu. 2009 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo verificar a resposta ovulatória e recuperação embrionária em éguas após o tratamento com FSHp (Follltropin-V[®]) em diferentes momentos, com diferentes doses e na raça BH. O crescimento folicular foi acompanhado diariamente e os tratamentos (i.m. a cada 12h) foram mantidos até que o maior(es) folículo(s) atingiu $\geq 32\text{mm}$, a indução da ovulação (2500 UI de hCG i.v.) foi realizada quando o maior(es) folículo(s) atingiu $\geq 35\text{mm}$ e a colheita de embriões no D8. No experimento 1, a dose de 25mg de FSHp foi testada em 28 éguas para determinação do melhor momento após aspiração folicular: $\geq 13\text{mm}$ (n=7, salina, controle), $\geq 13\text{mm}$ (n=7, FSHp-F13) e $\geq 20\text{mm}$ (n=7, FSHp-F20); ou em um dia determinado do ciclo: D6 (n=7, FSHp-D6). No experimento 2, a dose de 50mg de FSHp foi testada em 17 éguas quando o maior folículo atingiu $\geq 13\text{mm}$ (n=7, FSHp-13) e comparada ao grupo controle (n=10). No experimento 3, em 26 éguas BH iniciou-se os seguintes tratamentos no D6: salina (n=7, controle), 25mg de FSHp (n=7, 25FSHp-D6), 12,5mg de EPE (n=7, EPE-D6) e 50 mg de FSHp (n=5, 50FSHp-D6). Usou-se a análise de variância de perfil, seguida do método de Tukey e para os dados de embriões/ovulação foi realizado o teste exato de Fisher (5% de significância). Os tratamentos com 25mg ou 50mg não promoveram aumento significativo no número de ovulações e de embriões recuperados, mas promoveu aumento no diâmetro máximo atingido por F3. O início do tratamento quando o maior folículo da onda induzida atingiu $\geq 20\text{mm}$ reduziu o tempo de tratamento. Conclui-se que os tratamentos com FSHp não promoveram resposta satisfatória e que o início do tratamento próximo ao desvio permitiu redução no tempo de tratamento.

Palavras-chave: superovulação; éguas; aspiração folicular; embriões.

IGNÁCIO, F. S. **Ovarian response and embryo response rate of cycling mares treated with porcine FSH.** Botucatu. 2009 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study aims to verify the ovulatory response and embrionary recover in mares treated at different moments with pFSH (Folltropin-V[®]), with different doses and in BH breeding mares. The follicular growth was daily accompanied and treatments (i.m. BID) were kept until major follicles reached ≥ 32 mm, ovulation induction (2500 UI of hCH i.v.) was done when major follicles reached ≥ 35 mm and embryo collection at D8. In experiment 1, 25mg of pFSH was tested in 28 mares for determination of the best moment for start of treatment after follicle ablation: ≥ 13 mm (n=7, saline, control), ≥ 13 mm (n=7, FSHp-F13) e ≥ 20 mm (n=7, FSHp-F20); or in a previously determined cycle day: D6 (n=7, FSHp-D6). In experiment 2, 50mg of pFSH was tested in 17 mares when the largest follicle achieved ≥ 13 mm (n=7, FSHp-13) and compared to a control grupo (n=10). In experiment 3, in 26 BH mares was initiated the following treatments beginning at D6: saline (n=7, control), 25mg of pFSH (n=7, 25FSHp-D6), 12,5mg of EPE (n=7, EPE-D6) e 50 mg of pFSH (n=5, 50FSHp-D6). For statistical analysis, Profile analysis followed by Tuckey method and, for embryo/ovulation, Fisher test were used (significance at 5%). Treatments with 25mg or 50mg did not promote a significative increase on ovulations and embryo recover, but increased maximum diameter of F3. The start of treatment when the largest follicle of an induced follicular wave achieved ≥ 20 mm reduced time of treatment. It is concluded that pFSH treatment did not promote a satisfactory response and that beginning of treatment close to deviation allowed the reduction of treatment time.

Key-words: superovulation; mares; follicular ablation; embryos.

1. INTRODUÇÃO

Éguas com ovulações únicas apresentam taxa de recuperação embrionária de, aproximadamente, 50% por colheita de embrião e taxa de prenhez por embrião inovulado de cerca de 75%, ou seja, 35% de chance de obter uma prenhez/colheita. Um aumento no número de ovulações proveniente de tratamentos hormonais visando a superovulação, como já bem estabelecido para a espécie bovina, produziria um maior número de embriões recuperados por colheita na espécie equina e, conseqüentemente, melhoraria a utilização de material genético de alta qualidade, além de reduzir custos envolvidos nos programas de transferência de embriões (TE). No entanto, os protocolos de superovulação em éguas, até agora desenvolvidos, têm apresentado eficiência reduzida e resultados inconsistentes. As preparações mais utilizadas são o extrato de pituitária equina (EPE) e o FSH equino purificado (FSHe). Mas, o alto custo e a indisponibilidade comercial do EPE e do FSHe no Brasil são mais dois fatores que, junto aos baixos resultados, limitam o uso comercial de protocolos de superovulação em éguas. O FSH suíno (FSHp) é um produto mais acessível, amplamente utilizado em bovinos, porém com baixa eficiência, até então demonstrada em éguas (SQUIRES et al., 1986, FORTUNE & KMMINCH, 1983).

Na égua, a resposta ovulatória obtida a partir de um tratamento hormonal é em média de 3,0 a 5,0 ovulações/égua (ROSAS et al., 1998; SCOGGIN et al., 2002), enquanto que em vacas essa resposta pode atingir até 20,0 ovulações/vaca (BERGFELT et al., 1997), no entanto, apenas uma média de 5 embriões transferíveis são obtidos (HASLER, 1992). Desta forma, a utilização do termo superovulação talvez não seja a mais apropriada para a espécie equina e por isso a denominação indução de múltiplas ovulações seja mais aconselhável. No entanto, por convenção, o termo superovulação será utilizado.

Mesmo com o relativo baixo resultado de éguas à estimulação hormonal, grande é a importância de tratamentos hormonais que promovam múltiplas ovulações em éguas, pois estes aumentam a relação número de prenhez/número de TE e, com isso, apresentam grande relevância na indústria do cavalo. Além disso, a estimulação hormonal aumenta o número de folículos disponíveis para aspiração folicular em éguas visando a recuperação de oócitos *in vivo* para uso em técnicas laboratoriais, como a FIV (BLANCO et al., 2008).

Com o objetivo de melhorar os resultados, a determinação do melhor momento para o início do tratamento, dose e frequência de aplicações necessárias e a viabilidade de novos protocolos utilizando outros hormônios em éguas são alguns dos pontos chaves dos estudos na área.

Para fins experimentais, a aspiração folicular na espécie eqüina mostrou-se eficiente em promover uma nova onda de crescimento folicular levando a um aumento nas concentrações de FSH (BERGFELT & ADAMS, 2000). A obtenção de um status ovariano homogêneo quanto à população folicular a partir deste procedimento e o conseqüente aumento nas concentrações de gonadotrofinas pode favorecer a resposta ovariana ao tratamento superovulatório.

A emergência de uma nova onda folicular a partir do procedimento de aspiração folicular possibilita a manipulação hormonal de uma população de folículos sabidamente em desenvolvimento. Conhecendo a fisiologia, tratamentos hormonais a base de FSH iniciados após a emergência de uma nova onda folicular proveniente da aspiração parecem ser plausíveis quando começados: (1) no momento que o maior folículo atingir 13mm para evitar a influência da queda da concentração plasmática do FSH no crescimento folicular; (2) próximo ao momento do desvio para evitar a manutenção da supressão do FSH pelo folículo dominante e permitir que folículos menores, e ainda dependentes do FSH, continuem a crescer.

Além disso, é interessante comparar estes tratamentos com o protocolo convencional de superovulação que inicia o tratamento em um dia específico no início do diestro para verificar a possível diferença na resposta.

Desta maneira, após o trabalho recentemente publicado na literatura relatando bons resultados com o uso do FSHp (KREKELER et al., 2006) utilizando uma dose bem menor (10mg ou 25mg de FSHp, a cada 12h) às utilizadas previamente por outros autores e em éguas de hipismo, que apresentam uma alta taxa de ovulações duplas espontâneas, viu-se necessário o desenvolvimento de outros experimentos seguindo a mesma linha. Assim, a dose de 25mg de FSHp (experimento 1), 50mg de FSHp (experimento 2) ou os mesmos protocolos de tratamento em éguas não aspiradas e da raça Brasileiro de Hipismo (experimento 3) foram testados no presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia do ciclo estral

O conhecimento da fisiologia do ciclo estral é essencial para o desenvolvimento de protocolos de estimulação hormonal eficientes e para determinar os pontos críticos do processo.

Éguas apresentam uma (70% das éguas) ou duas ondas foliculares (30% das éguas) durante cada ciclo estral (média de 21 dias). As ondas foliculares emergem a partir de folículos de 6 mm de diâmetro durante o diestro (entre os dias 6 e 12, dia 0 = ovulação), denominada onda maior primária que termina em ovulação (ovulação associada ao estro). Nos casos das éguas com duas ondas foliculares, a onda secundária emerge durante o estro ou no início do diestro dando origem a um folículo dominante que regride ou, eventualmente, ovula (ovulação de diestro) (GINTHER, 1992).

As concentrações de gonadotrofinas, FSH e LH, durante o ciclo estral são reflexos de mudanças num equilíbrio entre sua fonte extra ovariana (hipófise) e o efeito realizado pelos ovários (GASTAL et al., 1999b; DONADEU & GINTHER, 2003; GINTHER et al., 2005).

O crescimento folicular é dividido em quatro fases: emergência da onda folicular, fase de crescimento folicular comum, desvio ou divergência e dominância. O aumento na concentração plasmática de FSH coincide com a emergência da onda folicular indicando uma associação entre os dois fatos (BERGFELT & GINTHER, 1993; GASTAL et al., 1997; DONADEU & GINTHER et al., 2001; GINTHER et al., 2003).

A partir deste momento, então, inicia-se a fase de crescimento folicular comum em que todos os folículos, independente do tamanho, apresentam a mesma taxa de crescimento diário (3 mm/dia). A concentração do FSH aumenta até o maior folículo atingir 13mm de diâmetro quando, devido a produção de inibina pelos folículos, hormônio supressor da liberação do FSH pela hipófise, há redução da concentração sérica do FSH (GASTAL et al., 1999a,b; BERGFELT et al., 2001; DONADEU & GINTHER et al., 2001; GINTHER et al., 2005). Junto a inibina, o aumento gradativo nas concentrações de estradiol, também produzido pelos folículos, parece estar envolvido na supressão do FSH e, conseqüentemente, com o desvio (GASTAL et al., 1999a,b; BERGFELT et al., 2001).

A diferença no diâmetro entre os dois maiores folículos ao final da fase de crescimento comum (início do desvio) permite o desenvolvimento de vários fatores responsáveis pelo estabelecimento da dominância do maior folículo antes que o segundo maior possa atingir tamanho

similar. Desta maneira, a diferença média no diâmetro entre os dois maiores folículos promove um aparente indicativo do tempo médio requerido para o estabelecimento da divergência (GINTHER et al., 2001). Quando o folículo de maior diâmetro atinge 22,5mm (GASTAL et al., 1997) este passa a apresentar maior taxa de crescimento diário que os demais, caracterizando o desvio ou seleção do folículo dominante.

No entanto, durante a fase de crescimento folicular comum qualquer folículo em crescimento é capaz de se tornar dominante desde que a inibição do crescimento dos demais folículos pelo maior folículo seja removida, como devido a aspiração deste (GASTAL et al., 1999a).

A diferença na produção de fatores presentes no fluido folicular entre os dois maiores folículos é associada com o estabelecimento da dominância do maior folículo. Uma das diferenças é a maior responsividade que o futuro folículo dominante apresenta ao LH e FSH. A concentração de estradiol no fluido folicular começa a aumentar no futuro folículo dominante numa proporção maior que nos futuros subordinados. O fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) livre aumenta somente no futuro folículo dominante aproximadamente no mesmo momento que o início do aumento do estradiol (GINTHER et al., 2001).

O sistema IGF consiste do IGF-1 e IGF-2, receptores de IGF e a família das proteínas de ligação (IGFBPs, ligam-se ao IGF reduzindo sua biodisponibilidade) e IGFBP protease (degradam as IGFBPs). A atividade autócrina-parácrina do IGF-1 e 2 inclui aumento do crescimento celular, aumento da produção de estradiol e aumento da sensibilidade das células da granulosa ao FSH em vacas e mulheres. IGFBP-2 encontra-se em maiores concentrações no segundo maior folículo que no primeiro, enquanto que as IGFBP proteases são encontradas em maiores concentrações no primeiro maior folículo, demonstrado que estas também estão envolvidas no processo de divergência celular (GINTHER et al., 2001).

Em éguas, Ginther et al (2004b) demonstraram que o IGF-1 estimula a produção de progesterona (intermediária na produção de androstenediona e estradiol), de estradiol, activina-A e inibina-A nos folículos. No entanto, o aumento no estradiol não foi atingido nas primeiras 24h após sua injeção intra-folicular, como detectado em vacas.

Em outro trabalho realizado no mesmo ano, Ginther et al. (2004c) demonstraram que o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um fator angiogênico que parece estar envolvido no aumento de vasos sanguíneos na parede folicular, também aumentou no folículo após injeção intrafolicular de IGF-1 e está normalmente em maiores concentrações um dia após o dia esperado do

início do desvio folicular. De acordo com esses achados, Acosta et al. (2004), após avaliação por color-Doppler, encontraram que ocorre um maior aumento no fluxo sanguíneo no futuro folículo dominante quando comparado ao segundo maior folículo um dia antes do início da divergência, aumentando o suporte vascular e sendo mais um fator determinante da seleção folicular.

A partir da divergência, o folículo de maior diâmetro torna-se dominante e, provavelmente, o maior responsável pela redução nos níveis de FSH, consequentemente, os folículos subordinados entram em atresia por ainda serem dependentes desse hormônio para crescer. O hormônio responsável pelo crescimento do folículo dominante passa a ser, principalmente, o LH (GASTAL et al., 1999a; GASTAL et al., 2000; GINTHER et al., 2003). Adequados níveis de LH circulantes são necessários para o crescimento do folículo dominante após o desvio (BERGFELT et al., 2001). Bergfelt et al. (2001) demonstraram também que o LH está positivamente correlacionado com os níveis de estradiol e inibina produzidos pelo folículo durante o desvio, no entanto, não está diretamente relacionado com o desencadeamento do desvio e sim com a ovulação, achados compatíveis com os encontrados por Gastal et al. (2000).

O aumento do LH desencadeia a ovulação, no entanto, a maior concentração sanguínea deste hormônio é detectada dois dias após a ovulação. Segundo Gastal et al. (2006), alterações nos folículos são detectadas antes da ocorrência da ovulação. Ocorrem aumentos na ecogenicidade e na espessura na granulosa (ultrassonografia por modo B) e aumento dos sinais captados por color-Doppler durante o período pré-ovulatório em 95% do folículo, caracterizando a banda anecóica. Estas características foram maiores na base do que no ápice do folículo, neste local, onde corre a ruptura para liberação do oócito durante a ovulação, não foram detectados sinais de color-Doppler. Além disso, estes sinais reduzem no folículo 4h antes da ovulação.

O processo ovulatório é caracterizado por uma reação inflamatória incluindo hiperemia, congestão, permeabilidade vascular aumentada e edema (KERBAN et al., 1999). A ovulação ocorre numa região específica do ovário denominada fossa de ovulação, única região do ovário da égua recoberto por epitélio germinativo. Esta é uma das características mais distintas da égua já que em outras espécies a ovulação ocorre em qualquer área da superfície do ovário (McKINNON & VOSS, 1993).

A secreção sérica de progesterona pelas células lúteas ocorre mais marcavelmente a partir da ovulação antes do início da redução pós ovulatória do LH. Com o fim do diestro, a progesterona começa a reduzir cerca de dois dias antes do aumento no LH. Efeito negativo dos efeitos dos hormônios ovarianos sobre as gonadotrofinas foram demonstrados (GINTHER et al., 2005;

GINTHER et al., 2007), assim como o uso de progesterona exógena reduziu a liberação de LH (BERGFELT et al., 2001; GASTAL et al., 2000) e a indução da luteólise permitiu o aumento na concentração do LH (GASTAL et al., 2000).

A luteólise ocorre 13 a 16 dias após a ovulação pela liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio induzida pela oxitocina (McKINNON & VOSS, 1993). Assim, devido a relação existente entre os hormônios ovarianos e hipofisários e o perfil ovariano no momento da luteólise (GASTAL et al., 2000), é a luteólise que determina o comprimento do ciclo estral.

2.2. Indução da emergência da onda folicular

O controle da emergência da onda folicular precedendo o tratamento superovulatório permite o início do tratamento em um momento favorável, quando um número máximo de folículos encontra-se responsivo às gonadotrofinas exógenas. A resposta ovariana ao tratamento superovulatório é otimizada quando este se inicia concomitantemente ao aumento nas concentrações endógenas de FSH antes ou durante a emergência de uma onda folicular, precedendo a seleção do folículo dominante (BO et al., 1995).

Nas fêmeas bovinas o uso de tratamentos hormonais para a indução da emergência folicular é muito utilizado. Vários são os trabalhos que estudam os efeitos do benzoato de estradiol (EVANS et al., 2003), da progesterona (KIM et al., 2007) e do GnRH (DUFOUR et al., 1999; SATO et al., 2005; SEGWAGWE et al., 2006) com a finalidade de induzir a emergência de uma nova onda folicular e sincronizar a ovulação dos animais. No entanto, trabalhos em equinos demonstram que os resultados destes tratamentos não são satisfatórios quando empregados nesta espécie (DIPPERT et al., 1992; LOGAN et al., 2007). Os implantes intravaginais de progesterona testados em éguas provocam grande variação no intervalo entre a remoção do implante intravaginal e a ovulação em éguas cíclicas (HANDLER et al., 2006; HANDLER et al., 2007), dificultando seu uso na prática.

Desta maneira, outros métodos, como, por exemplo, a aspiração folicular, foram testados em éguas visando alcançar os mesmos objetivos. No entanto, a indução da emergência folicular não é realizada rotineiramente a campo devido às poucas alternativas práticas. Na rotina, o acompanhamento da população e do crescimento foliculares têm sido suficientes para a determinação do início do tratamento.

2.2.1. Aspiração folicular

A supressão dos efeitos do folículo dominante através de métodos físicos (aspiração folicular guiada por ultra-sonografia) ou por métodos hormonais (uso do GNRH ou estradiol e progestágenos) (BERGFELT et al., 1997; BARACALDO et al., 2000; BURATINI et al., 2000) tem sido empregada no controle do desenvolvimento da onda folicular precedendo os tratamentos superovulatórios em bovinos com resultados satisfatórios (HILL & KUEHNER, 1996; DE RUIGH et al., 2000; MERTON et al., 2003).

Vários trabalhos utilizaram a aspiração folicular na espécie equina com o objetivo de estudar o desenvolvimento folicular, induzir a emergência de uma nova onda folicular e/ou à elevação dos níveis de FSH promovidas pela retirada da fonte de inibina e estradiol, ou seja, os folículos (HINRICHS et al., 1991; GASTAL et al., 1997; GASTAL et al., 1999a,b; BERGFELT et al., 2001; DONADEU & GINTHER, 2001; DONADEU & GINTHER, 2003; GINTHER et al., 2005).

A aspiração folicular na espécie equina tem possibilitado o estudo das diferentes fases do desenvolvimento folicular (recrutamento, seleção, desvio e dominância) (GINTHER et al., 2004a) e os efeitos da aspiração de um ou mais folículos sobre as concentrações hormonais foram demonstrados por diversos autores (HINRICHS et al., 1991; DUCHAMP et al., 1995; GASTAL et al., 1997, 1999a,b).

Para avaliar as conseqüências de aspirações sucessivas em éguas, estudos foram realizados com o objetivo de analisar os efeitos provocados por este procedimento. Estes estudos demonstraram que aspirações foliculares realizadas em múltiplas sessões, apesar de induzirem fibrose reparativa, não alteram a função ovariana e nem interferem negativamente com a foliculogênese (BOHG et al., 2003). Além disso, foi demonstrada também a não interferência negativa do procedimento na fertilidade de éguas demonstrada pela manutenção da capacidade destes animais em prenham mesmo após a realização das aspirações (MARI et al., 2005).

Quando empregada em momentos aleatórios do ciclo, a aspiração de todos os folículos leva a um aumento nas concentrações de FSH, com um desenvolvimento uniforme dos folículos durante a nova onda induzida e uma alta sincronização das ovulações após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e hCG (BERGFELT & ADAMS, 2000). Neste estudo, 94% (15/16) das éguas submetidas à ablação (D0) seguida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D4 e pela indução da ovulação com o hCG na presença de um folículo ≥ 30 mm ovularam dentro de 48 horas após a indução. Em um segundo experimento, 86% (6/7) das éguas ovularam entre 24 e 48 horas, quando a ovulação foi induzida dentro de um período pré-

determinado de seis dias após a utilização da prostaglandina precedida por aspiração folicular. Bergfelt & Adams (2000) investigaram os efeitos da aspiração folicular nas concentrações de FSH e na emergência e desenvolvimento de uma nova onda folicular. Observaram a presença de folículos ≥ 10 mm dentro de $1,9 \pm 0,4$ dia após a aspiração, ocorrendo de maneira sincronizada em 90% das éguas. Assim, a aspiração folicular tem demonstrado ser um eficiente método de indução da emergência folicular tanto em éguas como em outras espécies (BERGFELT et al., 1994).

2.3. Superovulação

A indução de múltiplas ovulações em eqüinos tem sido realizada com o objetivo de aumentar o número de embriões obtidos por coleta e conseqüentemente minimizar os custos da TE, bem como aumentar a oferta de oócitos para estudos "*in vitro*". Os tratamentos superovulatórios na égua e em outras espécies de ovulação única procuram selecionar o maior número de folículos possíveis dentro de uma única onda folicular, estimulando-os a continuarem seu desenvolvimento até a ovulação (ORLANDI, 2008).

No entanto, os protocolos de superovulação em éguas, até agora desenvolvidos, têm apresentado eficiência reduzida e resultados inconsistentes.

Visando melhorar os resultados aos tratamentos superovulatórios estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar fatores que podem influenciar na resposta superovulatória. Dentre estes fatores já foram citados na literatura: (1) hormônio a ser utilizado, (2) a dose e a freqüência das injeções (SCOGGIN et al., 2002; BRIANT et al., 2004; SQUIRES & McCUE, 2007; WELCH & BRUEMMER, 2006), (3) o dia de início do tratamento e o diâmetro do maior folículo no momento do início do tratamento (DIPPERT et al., 1992; ORLANDI, 2008).

Além da superovulação, o EPE e o FSHe também foram utilizados para induzir o desenvolvimento transicional e em éguas acíclicas problemáticas, como nos casos de éguas que entram em anestro no pós-parto, com sucesso (McCUE et al., 2007). Um trabalho recente realizado por Raz et al. (2009) utilizaram o FSHe em éguas em transição de primavera e obtiveram uma taxa de 78% (14/18) de éguas que ovularam após o tratamento e, ainda, aumento no número de ovulações (3,4) e embriões recuperados (2,6) por égua, resultados estes semelhantes aos previamente obtidos por Peres (2004) que também alcançou aumento no número de ovulações (5,6) e de embriões recuperados (2,0) por égua quando comparados ao grupo controle.

2.3.1. Hormônio

Vários tratamentos com gonadotrofina coriônica equina (eCG) (DAY et al., 1940), GnRH (GINTHER & BERGFELT, 1990), hormônio do crescimento (HOFFERER et al., 1991), a imuneutralização da inibina (McKINNON et al., 1992; McCUE et al., 1992), o FSHp (SQUIRES et al., 1986) e o FSH humano recombinante (FSHrh; THARASANIT et al., 2006) não obtiveram resultados satisfatórios em éguas ou apresentaram reações adversas que dificultam o uso dos tratamentos. Mais recentemente, resultados interessantes foram obtidos com o uso da gonadotrofina menopáusica humana (hMG; LOSINO et al., 2007) obtendo 57,1% de duplas ovulações no grupo tratado enquanto que nenhuma dupla ovulação foi detectada no grupo controle (não tratado), no entanto, mais trabalhos são necessários. O FSH equino recombinante (FSHre; DE LUCA et al., 2008; JENNINGS et al., 2009) demonstrou também resultados promissores, promovendo aumento na taxa de ovulação e de recuperação embrionária por égua, 3,34 e 2,69, respectivamente, quando utilizada a dose de 0,65mg i.m. duas vezes ao dia (DE LUCA et al., 2008) e aumento no número de folículos entre 20-29mm, 30-34mm e ≥ 35 mm, tanto utilizando a dose de 0,5mg quanto de 0,85mg (JENNINGS et al., 2009). No entanto, por ser um produto novo, as preparações hormonais mais utilizadas nos protocolos de superovulação em éguas ainda são o EPE e o FSHe. Estes, aumentam a média de ovulações e de embriões recuperados como consequência das alterações que promovem no perfil hormonal de animais tratados (MACHADO, 2008).

O FSHp, amplamente utilizado na superovulação de fêmeas bovinas, apesar de não ter demonstrado bons resultados em éguas, de acordo com as literaturas mais antigas (SQUIRES et al., 1986; FORTUNE & KMMINCH, 1983), chamou atenção dos pesquisadores quando um trabalho recente publicado por Krekeler et al. (2006) obteve uma média de 2,28 ovulações por ciclo.

2.3.1.1. Extrato de pituitária equina (EPE)

O EPE é preparado a partir da obtenção de glândulas pituitárias em abatedouros equinos que são acondicionadas a -20°C até o processamento. Depois de descongeladas, as pituitárias são banhadas em água destilada / deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com uma solução de 40% de etanol e 6% de acetato de amônia. A utilização da solução de etanol e acetato de amônia tem por objetivo extrair as gonadotrofinas. A partir daí a fração ativada é precipitada e a concentração de etanol aumentada para 80%, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20°C (GUILOU & COMBARNOUS, 1983). O EPE contém cerca de 4,8% de FSH por radioimunoensaio (RIA) (BRIANT et al., 2004), sendo esta proporção variável de acordo com a época do ano e estado das éguas.

Os tratamentos superovulatórios com EPE aumentam o número de ovulações por égua e o número de embriões recuperados por lavado uterino (SQUIRES et al., 1986; DIPPert et al., 1992; DIPPert et al., 1994; ROSAS et al., 1998; ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002) além de aumentar o número de folículos disponíveis para a recuperação de oócitos pela aspiração folicular (BLANCO et al., 2008). No entanto, a grande variação de resultados encontrados na literatura além da indisponibilidade comercial, limitam sua utilização no campo.

Dippert et al. (1994) compararam a taxa de fertilização entre éguas superovuladas com EPE e éguas com ovulações espontâneas e encontraram números de ovulações maiores para as éguas tratadas (3,6) que para éguas não tratadas (1,1). Além disso, mais embriões também foram recuperados das éguas tratadas (2,0).

Outros estudos foram realizados com a finalidade de comparar os efeitos do EPE com o de outras preparações hormonais. Quando comparado ao FSHe, a resposta ovulatória das éguas não diferenciou (HOFFERER et al., 1993; PALMER et al., 1993; ROSAS et al., 1998). Como demonstrado por Rosas et al. (1998), as duas preparações hormonais demonstram ter a mesma eficiência: a) no tempo requerido para a obtenção de pelo menos dois folículos pré-ovulatórios, b) no número de ovulações por égua (EPE 3,6 e FSHe 4,6) e c) no número de embriões recuperados por égua (EPE 2,0 e FSHe 2,0). Desta maneira, a alta quantidade de LH no EPE provavelmente não afetou a resposta ovulatória das éguas submetidas a superovulação.

2.3.1.2. FSH equino (FSHe)

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, Canada Inc.), mas o alto custo dificultava seu uso no Brasil. 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 controles. Além disso, a taxa de recuperação embrionária por ovulação por éguas tratadas não foi diferente da encontrada em éguas controle. Isto sugere que a maturação folicular, a competência folicular e o potencial fertilizante das éguas superovuladas são similares aos de éguas com ovulação espontânea. Resultados deste estudo indicam que a superovulação pode aumentar a probabilidade de recuperar um ou mais embriões por lavado.

Por ter apresentado melhores resultados em vários trabalhos (NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007; 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 3,3-5,2 ovulações por égua, taxa de recuperação embrionária variando de 1,6-2,6 e média de 4,9-5,7 dias de tratamento até o folículo alcançar o diâmetro de 35mm.

Assim, o protocolo de superovulação padronizado por Niswender et al. (2003) consiste em uma dose de 12,5 mg de FSHe aplicada duas vezes ao dia iniciando o tratamento no início do diestro (entre os dias 5 e 7 após a ovulação) e aplicação de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) no dia seguinte ao início do tratamento. Um agente indutor da ovulação é administrado quando os folículos atingem diâmetro de ≥ 35 mm.

2.3.1.3. FSH suíno (FSHp)

O tratamento com FSHp para superovulação na espécie bovina é amplamente utilizada e apresenta bons resultados. No entanto, são poucos os trabalhos que demonstram e estudam os efeitos desse hormônio na espécie eqüina (SQUIRES et al., 1986; FORTUNE & KMMINCH, 1983, KREKELER et al., 2006).

IRVINE (1981) utilizou o FSHp em éguas e obteve uma taxa de ovulação de $1,7 \pm 0,6$ por égua e, resultados semelhantes foram obtidos por Fortune & Kmminch (1983), quando várias doses foram testadas (8, 16 e 32mg duas vezes) obtendo 1,5 a 1,8 ovulações / égua. Squires et al. (1986) realizaram um trabalho de comparação entre os tratamentos com EPE e FSHp, utilizando dose muito maior ao trabalho citado anteriormente (150 mg duas vezes ao dia) e consequente maior custo. O tratamento foi iniciado quando dois ou mais folículos de diâmetro ≥ 20 mm foram detectados e mantido até que todos os folículos de diâmetro ≥ 30 mm tinham ovulado ou regredido. O número de ovulações e de folículos pré-ovulatórios foi maior para as éguas tratadas com EPE (2,2) comparado às tratadas com FSHp (1,6) e as não tratadas (1,0). Mesmo assim, ambos os tratamentos superovulatórios aumentaram o número de folículos ≥ 30 mm quando comparados às éguas não tratadas. Fortune & Kmminch (1983) e Bruck et al. (1997) encontraram também um aumento no número de folículos após o tratamento com este hormônio, porém ainda não satisfatório. Assim, o tratamento superovulatório com FSHp para éguas não têm sido recomendado devido o alto custo do medicamento e os baixos resultados até então encontrados.

No entanto, um estudo recentemente realizado por Krekeler et al. (2006) apresentou resultados promissores. Neste estudo foram utilizados dois protocolos de superovulação com FSHp nas doses de 10 e 25 mg i.m., aplicadas duas vezes ao dia, iniciando no dia 6 pós-ovulação e mantidas até os folículos atingirem o diâmetro de 35 mm. 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 menos embriões por ciclo foram recuperados das éguas tratadas com 10 mg de FSHp (0,7) quando comparadas as tratadas com 25 mg (1,32). Estes resultados chamaram a atenção dos pesquisadores e Castro Chaves et al. (2008) publicaram um resumo no qual testaram o FSHp nas doses de 15mg i.m. duas vezes ao dia em éguas da raça Mangalarga Paulista e Quarto de Milha e obteve 14,3% (2/10) de duplas ovulações e média de 1,1 ovulações por égua, o que não diferiu do grupo controle.

2.3.2. Início do tratamento

O dia do início do tratamento superovulatório também influencia na resposta ovariana e recuperação embrionária. Dippert et al. (1992) demonstraram que o início do tratamento superovulatório com EPE no dia cinco do ciclo permitiu maior taxa de recuperação embrionária que no dia 12 pós-ovulação. A melhor resposta ao EPE no início do diestro (dia cinco) provavelmente ocorreu por ainda não ter havido a seleção do folículo dominante. As éguas tratadas com EPE no dia 12 apresentaram uma resposta ovariana parecida a de éguas não submetidas ao tratamento superovulatório (grupo controle), indicando que já havia ocorrido a seleção folicular. Uma comparação entre perfis ovarianos indicou que melhor resposta foi alcançada quando não havia folículos grandes (≥ 20 mm) no momento do início do tratamento. Desta maneira, estudos mais recentes também preconizaram o início do tratamento entre os dias cinco e sete após a ovulação (NISWENDER et al., 2003; SCOGGIN et al., 2002). Já Orlandi (2008) demonstrou que a melhor resposta ovulatória ocorre iniciando o tratamento quando o maior folículo atinge aproximadamente 20 a 23mm, ou seja, antes ou durante o momento esperado do desvio folicular, evitando, desta maneira, a influência negativa da dominância folicular ao mesmo tempo que permite a redução no período de tratamento. Segundo Rosas et al. (1998), começar o tratamento no início do diestro necessariamente provoca um longo tempo de tratamento. Este fato afeta na mão de obra, que será exigida por um tempo maior, e no custo do tratamento, já que um maior volume da preparação hormonal será necessário.

2.3.3. Dose e frequência de aplicações

Num estudo recente, Briant et al. (2004) encontraram resultados que indicam o efeito da dose e da frequência de injeções na resposta ovariana. Segundo estes autores, aplicações de baixas doses de FSH podem ser responsáveis pela baixa resposta ovariana de éguas superovuladas (apenas um folículo pré-ovulatório) por serem insuficientes na elevação dos níveis de FSH circulantes, da mesma forma que a administração de altas doses de LH induz elevados níveis plasmáticos deste hormônio provocando a formação de folículos anovulatórios ou luteinizados e baixa fertilidade. Já o aumento do número de aplicações hormonais ao longo do dia aumenta a biodisponibilidade do hormônio e, conseqüentemente, a resposta ovariana. Este fato pode permitir uma redução da dose de hormônio fornecida por injeção sem alterar a dose diária. Provavelmente, isso pode ocorrer devido a super estimulação ovariana secundária a administração de altas doses de gonadotrofinas com conseqüente indução do aumento na concentração plasmática de LH. Outros resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002) quando uma única dose de 50 mg de EPE produziu um maior número de folículos anovulatórios e luteinizados que duas doses diárias de 25mg do hormônio.

2.3.4. Número de ovulações

Apesar do baixo número de ovulações apresentado pela espécie eqüina após um tratamento de superovulação, este não é o único fator que limita a baixa taxa de recuperação embrionária. Mesmo quando os resultados encontrados quanto à resposta ovariana demonstram-se satisfatórios, ou seja, número de ovulações elevado, a recuperação embrionária por ovulação pode apresentar-se abaixo das expectativas (DIPPERT et al., 1994; ALVARENGA et al., 2001). Diferentes trabalhos demonstram que o número de embriões recuperados por ovulação diminui com o aumento da resposta ovariana das éguas submetidas à superovulação (DIPPERT et al., 1994; ROSAS et al., 1998; ALVARENGA et al., 2001; LOGAN et al., 2007). Outro fato importante seria a taxa de recuperação embrionária maior para éguas com ovulações bilaterais que para éguas com ovulações unilaterais (WELCH et al., 2006).

Como verificado recentemente por Carmo et al. (2006), a redução na taxa de recuperação embrionária de éguas com grande número de ovulações pode ser conseqüência de uma interferência na captação e no transporte de oócitos pelo oviduto após a ocorrência da ovulação. Neste estudo, as

éguas divididas em dois grupos, tratado (25mg de EPE a cada 12h, i.m.) e não tratado, as ovulações foram induzidas com 2500 UI de hCG e abatidas de 12 a 24h após a detecção da primeira ovulação sendo então o oviduto lavado visando a recuperação de oócitos. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre número de oócitos degenerados recuperados por grupo, no entanto, menor foi o número de oócitos recuperados para o grupo tratado. Ou seja, quanto maior o número de ovulações menor foi a taxa de recuperação de oócitos do oviduto. Isso indica uma falha no transporte de oócitos pelo oviduto e pode representar uma possível explicação para a baixa taxa de recuperação embrionária por ovulação encontrada em éguas superovuladas. Mais um indício de que isso realmente possa ocorrer foi a grande quantidade de coágulos de sangue encontrados na fossa ovulatória das éguas superovuladas durante este estudo.

2.3.4.1. Uso de baixa dose

Visando garantir a recuperação de pelo menos um embrião por colheita evitando os problemas encontrados na recuperação de embriões quando há uma super estimulação ovariana, tratamentos com baixas doses hormonais foram testados com bom resultado. Farinasso et al. (2005) testaram as doses de 4mg duas vezes ao dia, 6mg uma vez ao dia e 8 mg uma vez ao dia e obtiveram 54% (33/61), 60% (31/51) e 63% (14/22) éguas que apresentaram múltiplas ovulações e 0,94, 1,0 e 1,0 embrião recuperado por égua, respectivamente, garantindo a recuperação de pelo menos um embrião por colheita. Araújo et al. (2008) demonstraram que a 5mg i.m. uma vez ao dia FSHe foi suficiente para permitir a recuperação de uma média de um embrião por lavado em 50% das éguas tratadas a partir do oitavo dias pós-ovulação. Estes achados tornam viável e interessante a aplicação comercial dos mesmos, principalmente quando levada em conta a seleção dos animais com base na população folicular pré-tratamento. O uso de baixa dose pode produzir aumento na incidência de ovulações duplas ou triplas em éguas e melhorar a relação custo / benefício dos programas comerciais de transferência de embriões eqüinos.

2.4. Indução da ovulação

A indução da ovulação é de suma importância principalmente dentro de um protocolo de superovulação em éguas, pois visa induzir os folículos pré-ovulatórios a ovularem no mesmo momento ou em intervalos menores. Vários agentes indutores foram testados: hCG (KILICARSLAN et al., 1996, NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007); GnRH, por exemplo a busorelina (BARRIER-BATTUT et al., 2001) ou a deslorelina (LOGAN et al., 2007); EPE (FARINASSO et al., 2005).

Em éguas, os agentes mais utilizados são o hCG e a deslorelina, já que a buserolina demonstrou baixa eficácia quando apenas uma aplicação foi realizada (BARRIER-BATTUT et al., 2003). Estudos desenvolvidos visaram determinar a eficiência dos indutores em promover a ovulação num momento específico, assim, autores compararam os efeitos da deslorrelina e do hCG e encontraram que o hCG apresenta maior eficiência na indução da ovulação já que um maior número de folículos pré-ovulatórios ovularam em resposta a esse agente (NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007).

No entanto, segundo alguns autores (SULLIVAN et al., 1973; WILSON et al., 1990), cuidado deve ser tomado quando o hCG é utilizado várias vezes para a indução da ovulação durante uma única estação de monta, pois alguns estudos demonstraram que sua eficiência é reduzida nessa situação.

O próprio EPE pode ser utilizado com o intuito de induzir as ovulações devido a alta concentração de LH presente nele. Farinasso et al. (2005) demonstraram sua eficácia quando utilizado na dose de 6mg aplicadas por via i.v. quando havia a presença de folículos com 32mm e edema uterino. Das 34 éguas utilizadas no experimento, 31 (91%) ovularam até as 48h após a indução e, de 11 ciclos com a presença de dois folículos pré-ovulatórios em cada, além de todas as ovulações terem ocorrido dentro das 48h, 68% (15) delas ocorreram até as 36h.

Como uma alternativa, uma nova cadeia singular do LH recombinante equino (LHre) foi geneticamente desenvolvida e Yoon et al. (2007) relataram, pela primeira vez, sua eficácia na indução da ovulação em éguas. O tratamento com 0,75 e 0,9mg i.v. de LHre no momento que o maior folículo atingiu 35mm resultaram em uma taxa de ovulação de 80-90% dentro de 48h pós indução, o qual foi similar as taxas obtidas com hCG. Não houve nenhuma alteração em períodos inter-ovulatórios ou perfis hormônios endógenos exceto pelo aumento na concentração plasmática

de LH 6 a 12 horas após aplicação do LHre injetado, uma vez que RIA reconhece o LHre assim como o LH endógeno.

3. OBJETIVOS

3.1. Experimento 1

O objetivo deste trabalho foi verificar a resposta ovariana e a taxa de recuperação embrionária de éguas não predispostas a apresentar múltiplas ovulações espontâneas (raças árabe e mestiças de mangalarga) e submetidas à aspiração folicular tratadas com 25mg de FSHp em diferentes momentos da onda folicular induzida.

Comparar os achados às respostas de éguas tratadas segundo um protocolo convencional de superovulação.

Determinar o momento ideal para início do tratamento visando aumentar a eficiência da resposta ovariana, reduzir tempo e custo de tratamento.

3.2. Experimento 2

Verificar a resposta ovariana e a taxa de recuperação embrionária de éguas não predispostas a apresentar múltiplas ovulações espontâneas (raças árabe e mestiças de mangalarga) e submetidas à aspiração folicular tratadas com 50mg de FSHp.

3.3. Experimento 3

Verificar a resposta ovariana e a taxa de recuperação embrionária de éguas predispostas a apresentar múltiplas ovulações espontâneas (raça Brasileiro de Hipismo) tratadas com 25 ou 50mg de FSHp.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento 1

4.1.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas 28 éguas das raças árabe e mestiças de mangalarga, em bom estado corporal, com idade entre quatro e 15 anos e ciclando regularmente. As éguas foram mantidas no Posto de Monta da Fazenda do Lageado UNESP-Botucatu, São Paulo, Brasil (Latitude -22° 53' 09" e Longitude 48° 26' 42") durante o período do experimento. Os animais foram alimentados com feno de cost-cross (*Cynodon dactylon*), ração concentrada, suplemento mineral e acesso livre à água.

As éguas foram previamente avaliadas por meio de palpação retal e exames ultra-sonográficos para determinação do dia da ovulação (D0) e início do período experimental. Elas foram, então, divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais, cada um contendo sete animais, dos quais três grupos foram submetidos à aspiração folicular no 10º dia pós-ovulação (D10).

O tratamento com FSHp (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá) foi iniciado no sexto dia pós-ovulação (D6) no grupo não submetido a aspiração folicular (Grupo FSHp-D6) e a partir do momento que o maior folículo da nova onda atingiu ≥ 13 mm (Grupo FSHp-F13) ou ≥ 20 mm (Grupo FSHp-F20) nos grupos submetidos a aspiração folicular. No outro grupo submetido à aspiração folicular foi realizada a administração de salina (0,9% NaCl, i.m.) em intervalos de 12h iniciando no dia que o folículo de maior diâmetro atingir diâmetro ≥ 13 mm (Grupo salina-F13).

Nos grupos tratados (Grupo FSHp-D6, Grupo FSHp-F13 e Grupo FSHp-F20), a dose de FSHp utilizada foi de 25 mg aplicados por via intramuscular em intervalos de 12 horas, o que dá um volume aplicado de 1,25 mL. No grupo não tratado (Grupo salina-F13), foi administrado um volume equivalente de salina.

Os tratamentos, tanto de salina quanto de FSHp, foram interrompidos quando o folículo de maior diâmetro atingiu ≥ 32 mm e a indução da ovulação, com uma única aplicação de hCG (2500 UI, i.v.; Chorulon®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Kirkland, Canadá), foi realizada quando o maior folículo atingiu ≥ 35 mm de diâmetro.

A luteólise foi induzida por uma única dose de PGF_{2α} (7,5 mg, i.m.; Lutalyse®, Pfizer, Nova Iorque, EUA) 12 h após o início dos tratamentos, tanto de salina quanto de FSHp.

4.1.2. Desenvolvimento folicular, inseminação artificial (IA) e colheita de embriões

A partir do procedimento de aspiração folicular ou do início do tratamento no D6, as éguas foram examinadas diariamente por ultrassonografia transretal via a utilização de um transdutor linear de 5 MHz para mensuração do diâmetro dos folículos (média dos valores referentes à largura e altura dos folículos em imagens congeladas). A cada sessão, nos grupos de éguas submetidas à aspiração, os exames foram realizados para determinação do momento da emergência da onda folicular (Donadeu & Ginther, 2003) e para o acompanhamento do desenvolvimento folicular até a detecção das ovulações durante os tratamentos.

A partir do acompanhamento ultrassonográfico foram coletados dados quanto aos números de folículos entre 25-29mm e ≥ 30 mm no momento da indução da ovulação, diâmetros máximos de F1, F2 e F3, ovulações por égua, embrião por égua, embrião por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamentos.

Após a indução das ovulações, as éguas foram inseminadas utilizando sêmen fresco diluído com extensor a base de leite desnatado (Botusemen[®], Biotech, Botucatu, Brasil) e avaliado por microscopia óptica (aumento de 20x). O sêmen utilizado foi obtido de um garanhão de fertilidade conhecida e a dose inseminante foi de 1×10^9 espermatozóides móveis. Duas inseminações foram realizadas, a primeira no mesmo dia da indução da ovulação, 12 horas após a indução da ovulação (folículo ≥ 35 mm) e a segunda após 24 horas da primeira. A inseminação realizada 12 horas após a indução teve a finalidade de evitar perdas de possíveis ovulações precoces. No caso de éguas que não responderam a indução, as inseminações foram realizadas até, no máximo, um dia após a primeira ovulação.

As éguas foram submetidas à colheita de embriões oito dias após a detecção da primeira ovulação (D8), recebendo em seguida 7,5 mg de Dinoprost-trometamina (PGF_{2 α}) por via intramuscular.

A metodologia descrita acima está representada esquematicamente pelas Figuras 1, 2 e 3.

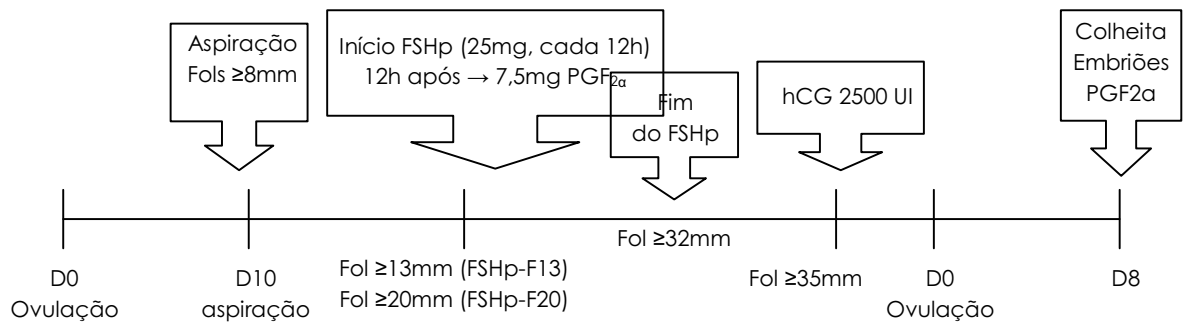


FIGURA 1 – Esquema de tratamento com FSHp nos grupos submetidos a aspiração folicular (FSHp-F13 e FSHp-F20).

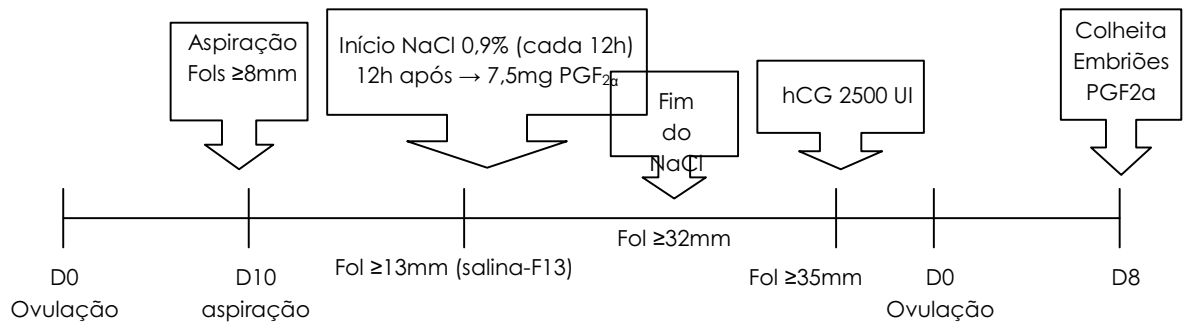


FIGURA 2 – Esquema de tratamento controle com NaCl 0,9% no grupo submetido a aspiração folicular (Salina-F13).

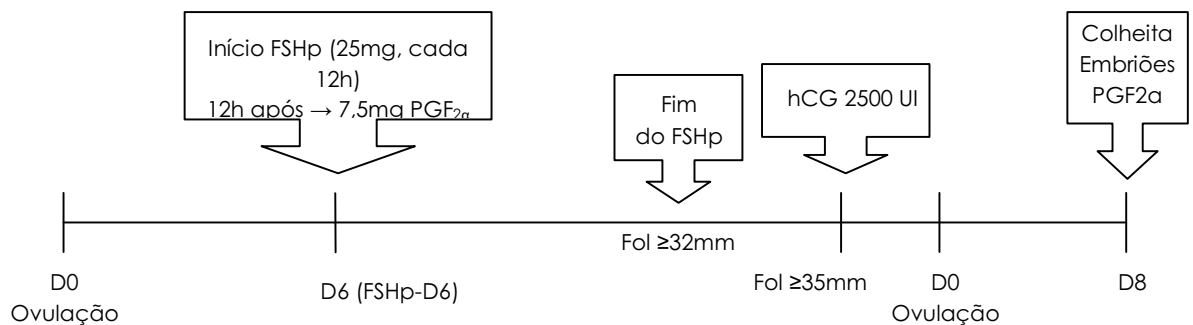


FIGURA 3 – Esquema de tratamento superovulatório com FSHp no grupo não submetido a aspiração folicular (FSHp-D6).

4.1.3. Aspiração folicular

As éguas foram sedadas com Xilazina a 10% (Sedazine[®], Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil) na dose de 0,5 mg/kg, i.v. e Acepromazina (Acepran[®], Vetnil, Louveira, Brasil) na dose de 0,03 mg/kg, i.v.. Hyoscina N-butyl bromide (Butylscopolamina, Sigma, St. Louis, EUA) na dose de 0,2 mg/kg, i.v. foi utilizada para que haja relaxamento retal ideal para realização do procedimento. Todos os folículos de diâmetro ≥ 8 mm foram aspirados utilizando um transdutor convexo de 5 MHz com guia trans-vaginal contendo agulha de 18G (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil), a qual foi conectada a um sistema de vácuo (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil). A aspiração folicular foi realizada a partir do momento da observação da ponta da agulha no antro folicular, por meio da pressão negativa de 180-200mmHG exercida pela bomba a vácuo. As éguas receberam duas doses de 1 mg/kg, i.v. flunixin meglumine (Banamine[®], Intervet/Schering-Plough Animal Health, Kirkland, Canadá), sendo a primeira administrada imediatamente antes do procedimento de aspiração e a segunda, 24 horas após o mesmo visando analgesia e ação anti-inflamatória.

4.2. Experimento 2

As mesmas éguas do experimento 1 foram utilizadas no experimento 2 (n=17), mantidas e alimentadas seguindo os mesmos critérios e localização do experimento 1.

As éguas foram submetidas à aspiração folicular para indução de uma nova onda folicular no D10 (ovulação = D0) seguindo o mesmo protocolo do experimento 1 e distribuídas aleatoriamente em dois grupos: um grupo aspirado e tratado com salina (controle, n=10) e outro grupo aspirado e tratado com 50 mg de FSHp (Grupo FSHp-F13, n=7), ambos iniciados quando o maior folículo atingiu ≥ 13 mm.

A dose utilizada e início dos tratamentos estão especificados na Figura 4. Em ambos os grupos as aplicações de FSHp ou salina foram realizadas com intervalos regulares de 12 horas, continuando-se até o maior folículo atingir diâmetro ≥ 32 mm, sendo então interrompidos. Quando o maior folículo atingiu diâmetro ≥ 35 mm, as ovulações foram induzidas com aplicação única de 2.500 UI i.v de hCG (Chorulon[®]).

A mensuração folicular, bem como a indução das ovulações, IA e colheita dos embriões foram realizadas da mesma forma como descrito no experimento 1.

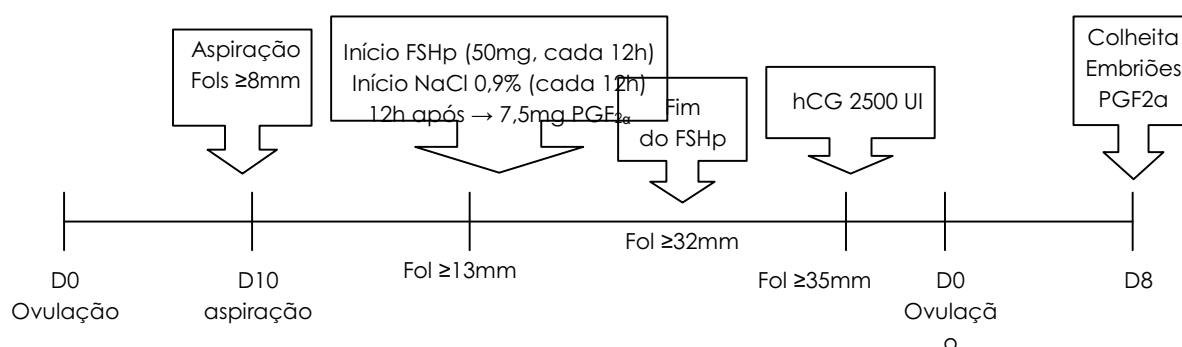


FIGURA 4 – Esquema de tratamento com 50 mg de FSHp (Grupo FSHp-F13) e salina (Grupo controle).

4.3. Experimento 3

Foram utilizadas 26 éguas da raça brasileiro de hipismo (BH), em bom estado corporal, com idade entre quatro e 10 anos e ciclando regularmente. As éguas pertencentes a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Colina, São Paulo, Brasil (Latitude -20° 42' 48" e Longitude 48° 32' 27") foram mantidas em piquetes e alimentadas com feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*), concentrado, suplemento mineral e acesso livre à água.

As éguas foram distribuídas aleatoriamente entre quatro grupos não aspirados e acompanhados/tratados a partir do D6: salina (controle, n=7), tratado com 25mg de FSHp (Grupo 25FSHp-D6, n=7), tratado com 12,5mg de EPE (Grupo EPE-D6, n=7) e tratado com 50mg de FSHp (Grupos 50FSHp-D6, n=5). Em todos os grupos as aplicações foram realizadas com intervalos regulares de 12 horas, continuando-se até o maior folículo atingir diâmetro ≥ 32 mm, sendo então interrompidos. Quando o maior folículo atingiu diâmetro ≥ 35 mm, as ovulações foram induzidas com aplicação única de 2.500 UI i.v de hCG (Chorulon®).

A luteólise foi induzida por uma única dose de PGF_{2α} (Lutalyse®, 7,5 mg, i.m.) 12 h após o início dos tratamentos nas éguas de todos os grupos.

A mensuração folicular, bem como a indução das ovulações, IA e colheita dos embriões foram realizadas da mesma forma como descrito no experimento 1.

A metodologia descrita acima está representada esquematicamente pela Figura 5.

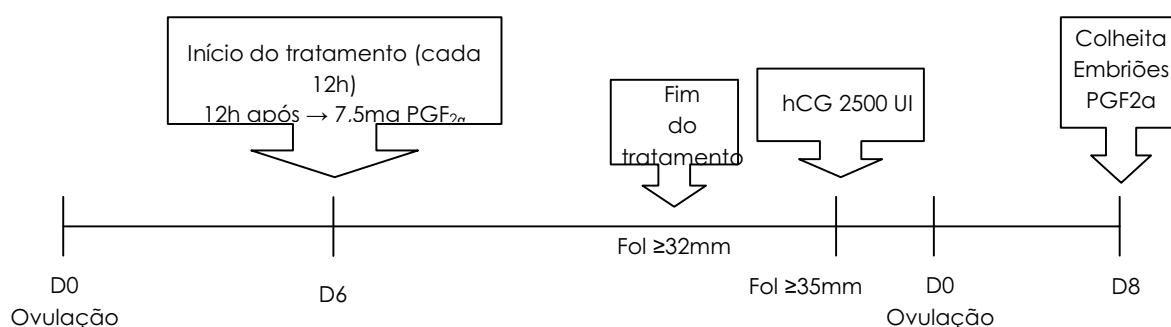


FIGURA 5 – Esquema de tratamentos com salina (Grupo controle), 25 mg de FSHp (Grupo 25FSHp-D6), EPE (Grupo EPE-D6) e 50 mg de FSHp (Grupo 50FSHp-D6).

4.3.1. Preparação do EPE

Para a preparação do EPE, glândulas pituitárias foram obtidas em abatedouro equino e acondicionadas a -20°C até que fossem processadas no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu segundo a técnica descrita por Guilou & Combarous (1983). Para o presente estudo, o conteúdo liofilizado de todas as partidas foi pesado em balança analítica, misturado e diluído com solução fisiológica 0,9% para atingir uma concentração de 6,25mg/mL. Tal procedimento visou obtenção de uma partida única e homogênea para todo o experimento.

A concentração de gonadotrofinas contida do EPE foi determinada por meio de RIA no laboratório de endocrinologia da Universidade de Wisconsin, EUA. As concentrações de gonadotrofinas foram: 3,6% de FSH (225ng/mL) e 1,0% de LH (62,5ng/mL).

4.4. Análise estatística

Para o número de folículos entre 25-29mm e ≥ 30 mm no momento da indução da ovulação, diâmetros máximos de F1, F2 e F3, ovulações por égua, embriões recuperados por égua, intervalo entre início do tratamento e ovulação, dias de tratamento, número de folículos ≥ 25 mm ao início dos tratamentos no experimento 3 e análise do diâmetro folicular para cada grupo nos diferentes momentos foi utilizada a análise de variância de perfil, seguida do método de Tukey para comparação das médias do programa SAS, versão 9.1. Os resultados foram apresentados através de médias e erros-padrão e o nível de significância utilizado foi de 5%.

Para análise do acompanhamento do desenvolvimento folicular diário os dados foram normalizados para o dia da indução da ovulação quando o folículo atingiu ≥ 35 mm e tabulados retroativamente permitindo que a análise de cada folículo fosse em uma fase de desenvolvimento correspondente entre eles.

Para os dados de embriões recuperados por ovulação foi realizado o teste exato de Fisher a 5% de significância para comparação dos grupos dentro do mesmo experimento.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1

Os tratamentos com 25mg de FSHp não foram capazes de aumentar significativamente o número médio de folículos entre 25-29mm e ≥ 30 mm até o momento da indução da ovulação com hCG (Tabela 1).

Das éguas utilizadas neste experimento, 29% (2/7), 71% (5/7), 29% (2/7) e 29% (2/7) apresentaram folículos entre 25-29mm no momento da indução da ovulação nos grupos Controle, FSHp-F13, FSHp-F20 e FSHp-D6, respectivamente. Em duas éguas do grupo Controle e duas do FSHp-D6 foram observados dois folículos ≥ 30 mm em cada uma delas, sendo detectado dupla ovulação em apenas uma destas éguas em cada grupo.

Os diâmetros médios máximos alcançados pelos F1, F2 e F3 não diferiram estatisticamente entre grupos ($P > 0,05$). Porém, o F1 foi maior ($P < 0,05$) que o F2, mas F1 e F2 não diferiram do F3 dentro de cada grupo, exceto para o grupo FSHp-F20 (Tabela 1).

O número médio de ovulações, embriões recuperados por égua e embriões recuperados por ovulação foram similares entre os grupos (Tabela 1).

A média do intervalo entre o início de tratamento e a ovulação do grupo controle foi semelhante ao grupo FSHp-F13 e FSHp-D6, enquanto que o grupo FSHp-F20 foi semelhante ao FSHp-F13 mas diferiu dos demais (Tabela 1).

No entanto, o tempo de tratamento (dias) foi menor ($P<0.05$) para o grupo FSHp-F20 que apresentou uma variação de dois a cinco dias de tratamento (Tabela 1). Para os grupos controle, FSHp-F13 e FSHp-D6, o número de éguas que necessitaram de 6 ou mais dias de tratamento não variou. Ainda, uma égua que apresentava folículo de 28mm ao início do tratamento no grupo FSHp-D6 necessitou de apenas dois dias de tratamento para alcançar o diâmetro de ≥ 32 mm e apresentou apenas uma ovulação.

A análise do desenvolvimento folicular diária só demonstrou efeito de momentos ($P<0,05$) durante o crescimento de cada folículo (F1, F2 e F3) de cada grupo (Tabela 2), mas não houve diferença ($P>0,05$) da taxa de crescimento diário entre os grupos. A curva de crescimento folicular está demonstrada na Figura 6.

TABELA 1 – Média e erro padrão dos números de folículos entre 25-29mm e folículos ≥ 30 mm no momento da indução, diâmetros máximos alcançados por F1, F2 e F3, número de ovulações por égua, número de embriões recuperados por égua, número de embriões recuperados por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamento no experimento 1.

Experimento 1				
	Controle	FSHp-F13	FSHp-F20	FSHp-D6
	Salina	25mg	25mg	25mg
	n=7	n=7	n=7	n=7
Fol 25-29 (mm)	0,3 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,3
Fol ≥ 30 (mm)	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2
D.M. F1 (mm)	37,4 $\pm$ 0,7 ^A	38,9 $\pm$ 1,5 ^A	38,6 $\pm$ 0,9 ^A	37,4 $\pm$ 0,9 ^A
D.M. F2 (mm)	23,0 $\pm$ 3,1 ^B	27,3 $\pm$ 3,0 ^B	24,9 $\pm$ 1,9 ^B	25,4 $\pm$ 3,1 ^B
D.M. F3 (mm)	15,8 $\pm$ 1,8 ^B	20,9 $\pm$ 2,4 ^B	18,9 $\pm$ 0,9 ^C	18,1 $\pm$ 2,1 ^B
Ov./égua	1,14 $\pm$ 0,1	1,57 $\pm$ 0,2	1,14 $\pm$ 0,1	1,14 $\pm$ 0,1
Emb./égua	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1
Emb./ov. (%)	(4/8) 50,0	(4/11) 36,4	(5/8) 62,5	(6/8) 75,0
Trat.-ov. (dias)	8,3 $\pm$ 0,5 ^a	8,9 $\pm$ 0,6 ^{ab}	6,4 $\pm$ 0,2 ^b	9,1 $\pm$ 2,9 ^a
Dias Trat. (dias)	5,9 $\pm$ 0,3a	6,3 $\pm$ 0,5a	3,9 $\pm$ 0,4b	6,7 $\pm$ 0,9a
	(5-7)	(5-8)	(2-5)	(2-9)

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha.

Sem indicação de letras = semelhança estatística

D.M. = Diâmetro máximo

Ov. = ovulação

Emb. = Embrião

Trat. = Tratamento

TABELA 2 – Média e erro padrão do crescimento diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) expresso em mm no experimento 1.

Experimento 1										
Dias										
		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
1	Controle	12±0, 8	13±1, 1	16±1	19±1	22±1, 3	27±1, 1	29±1, 3	32±0, 6	36±0, 4
	FSHp-F13	12±1, 3	14±1, 3	17±1, 4	20±1, 4	24±1, 2	27±0, 9	29±0, 7	33±0, 2	36±0, 3
	FSHp-F20	10±1	11±0, 7	15±0, 9	18±0, 8	22±0, 6	26±0, 7	28±0, 8	32±0, 5	37±0, 7
	FSHp-D6	14±1, 2	16±1	18±0, 9	19±1, 1	22±1, 4	25±1, 4	29±0, 9	32±0, 6	36±0, 6
	Média Dias	12±1, 6j	13±1, 6i	16±1, 4h	19±1, 4g	22±1, 5f	26±1, 3e	29±1, 2d	32±0, 7c	36±0, 6b
2	Controle	10±0, 7	11±0, 9	13±1, 1	15±1, 4	17±1, 7	19±1, 9	23±1, 3	22±2, 3	23±2, 8
	FSHp-F13	9±1,5	11±1, 4	13±1, 6	15±1, 8	20±1, 6	22±1, 9	24±2	25±2, 4	26±2, 8
	FSHp-F20	8±1	9±0,9	13±0, 8	15±1, 2	19±1, 3	21±1, 5	22±1, 4	24±1, 6	23±2, 2
	FSHp-D6	11±0, 8	14±1, 1	15±1, 4	16±1, 9	18±2, 5	20±2, 4	23±2, 9	24±2, 9	23±2, 9
	Média Dias	10±1, 4e	11±1, 6de	13±1, 6cd	15±1, 9c	18±2, 3b	21±2, 5ab	23±2, 5a	24±2, 9a	24±3, 4 a
3	Controle	8±0,6	9±0,8	11±1	12±1, 3	14±1, 4	16±1, 6	18±1	16±0, 6	15±1, 4
	FSHp-F13	7±1,3	10±1, 6	12±1, 5	13±2, 2	16±2, 5	20±2, 1	19±1, 9	20±1, 8	19±1, 8
	FSHp-F20	7±1,1	9±0,9	12±0, 8	12±1, 3	14±1, 4	15±1, 2	17±1, 1	16±0, 9	16±1, 2
	FSHp-D6	11±0, 8	12±0, 9	13±1, 6	14±1, 7	15±2	16±2	17±2, 3	16±2, 4	16±2, 3
	Média Dias	8±1,4 e	10±1, 5de	12±1, 6cd	13±2, 1c	15±2, 4b	17±2, 3a	18±2, 2a	17±2, 2a	16±2, 3a

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P<0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha.

Sem indicação de letras = semelhança estatística

D0 = Dia de aplicação do hCG

5.2. Experimento 2

Os tratamentos com 50 mg de FSHp não foram capazes de aumentar significativamente o número médio de folículos entre 25-29mm e ≥ 30 mm até o momento da indução da ovulação com hCG (Tabela 3).

Neste experimento, 30% (3/10) e 30% (3/10) das éguas do grupo Controle e 57% (4/7) e 29% (2/7) do grupo FSHp-F13 apresentaram folículos entre 25-29mm e ≥ 30 mm além do F1, respectivamente, no momento da aplicação do hCG. Das cinco éguas com folículos ≥ 30 mm em ambos os grupos, em apenas uma do grupo Controle foi detectado ovulação única, as demais tiveram dupla ovulação.

Os diâmetros médios máximos alcançados pelos F1 e F2 não diferiram estatisticamente entre grupos. No entanto, o diâmetro máximo alcançado por F3 foi maior ($P < 0.05$) no grupo FSHp-F13 que no grupo controle (Tabela 3). No grupo controle, o F1 foi maior que F2 e este que F3 ($P < 0.05$), enquanto que, no grupo FSHp-F13, o F1 foi maior que F2 ($P < 0.05$) mas este semelhante a F3 ($P > 0.05$).

O número médio de ovulações, embriões recuperados por égua e embriões recuperados por ovulação foi similar ($P > 0.05$) entre os grupos (Tabela 3).

As médias dos Intervalos entre o início do tratamento, a ovulação e tempo de tratamento não apresentaram diferença estatística ($P > 0.05$) entre os grupos (Tabela 3).

A análise do desenvolvimento folicular diária só demonstrou efeito de momentos ($P < 0.05$) durante o crescimento de cada folículo (F1, F2 e F3) de cada grupo e efeito de grupo ($P < 0.05$) para o F3 sendo este significativamente maior no grupo pFSH-F13 (Tabela 4). Não foi detectada diferença ($P > 0.05$) na taxa de crescimento folicular diário entre os grupos. A curva de crescimento folicular está demonstrada na Figura 6.

TABELA 3 - Média e erro padrão dos números de folículos entre 25-29mm e folículos ≥ 30 mm no momento da indução, diâmetros máximos alcançados por F1, F2 e F3, número de ovulações por égua, número de embriões recuperados por égua, número de embriões recuperados por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamento no experimento 2.

Experimento 2		
	Controle	FSHp-F13
	Salina	50mg
	n=10	n=7
Fol 25-29 (mm)	0,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
Fol ≥ 30 (mm)	1,3 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2
D.M. F1 (mm)	37,8 $\pm$ 0,6 ^A	37,5 $\pm$ 0,9 ^A
D.M. F2 (mm)	24,9 $\pm$ 2,6 ^B	27,2 $\pm$ 1,8 ^B
D.M. F3 (mm)	15,7 $\pm$ 1,6 ^{Cb}	23,0 $\pm$ 1,2 ^{Ba}
Ov./égua	1,20 $\pm$ 0,1	1,29 $\pm$ 0,2
Emb./égua	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
Emb./ov.(%)	(5/12) 41,7	(3/9) 33,3
Trat.-ov. (dias)	8,6 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,5
Dias Trat. (dias)	5,8 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,4
	(5-7)	(4-7)

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha.

Sem indicação de letras = semelhança estatística

D.M. = Diâmetro máximo

Ov. = ovulação

Emb. = Embrião

Trat. = Tratamento

TABELA 4 - Média e erro padrão do crescimento diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) expresso em mm no experimento 2.

Experimento 2									
Dias									
	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
Controle	12±0,5	14±0,8	16±0,8	19±0,8	23±1,2	27±1	29±0,5	32±0,3	36±0,4
F2 FSHp-F13	11±0,8	14±1	17±0,7	20±1,1	24±1,2	27±0,9	30±0,4	34±0,3	37±0,4
Média Dias	11±1,3 i	14±1,8 h	16±1,5 g	20±1,8 f	23±2,5 e	27±1,84 d	30±1,8 c	33±1 b	36±0,7 a
Controle	10±0,6	11±0,7	13±0,8	16±1	18±1,4	20±1,4	24±1,1	24±1,8	25±2,3
F2 FSHp-F13	9±0,6	12±0,8	16±0,8	18±0,9	21±0,8	24±0,8	25±1,4	27±1,6	26±2,1
Média Dias	9±1,2 e	12±1,6 e	14±1,9 d	17±2,2 c	19±1,9 b	22±2,8 b	25±2,5 a	25±3,7 a	25±4,5 a
Controle B	8±0,5	9±0,7	11±0,8	12±0,9	14±1,1	17±1,2	18±1,1	16±0,6	16±1,1
F3 FSHp-F13 A	8±0,7	11±1,2	14±1	17±0,9	19±0,9	22±0,6	21±1	20±1,3	20±1,6
Média Dias	8±1,1 e	10±1,9 e	12±2,1 d	14±2,4 c	16±2,7 b	19±2,7 a	19±2,1 a	18±2,3 a	18±3,3 a

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha.

Sem indicação de letras = semelhança estatística

D0 = Dia de aplicação do hCG

5.3. Experimento 3

Uma égua do grupo controle foi retirada da análise estatística por apresentar número de dias de tratamento (24 dias) mais que 2 desvios padrão (7,13 dias) acima da média do grupo (8,14 dias).

Os tratamentos não foram eficazes para aumentar significativamente ($P>0.05$) o número de folículos de 25-29mm e ≥ 30 mm no momento da indução da ovulação com hCG, , no entanto, foi observada uma tendência ($P=0,078$) do grupo EPE-D6 em aumentar o número de folículos ≥ 30 mm (Tabela 5).

Os diâmetros médios máximos alcançados pelos F1 não diferiram estatisticamente entre grupos. No entanto, os máximos diâmetros alcançados por F2 e F3 apresentaram uma tendência a serem maiores ($P=0.07$ e $P=0.06$, respectivamente) no grupo EPE-D6 que nos demais grupos. No grupo controle, o F1 foi maior que o F2 e este maior que o F3 ($P<0.05$). Tanto no grupo 25FSHp-D6 quanto no grupo 50FSHp-D6, o F1 foi maior que o F2 e este semelhante ao F3, enquanto que, no grupo EPE-D6, F1 foi semelhante a F2 ($P>0.05$) e este maior que F3 ($P<0.05$).

O número de ovulações por égua foi significativamente maior ($P<0.05$) para o grupo tratado com EPE, em relação ao que recebeu 25 ou 50 mg de FSH, porém similar ao controle ($P>0.05$), no qual detectou-se 66,7% de ovulações únicas e 33,3% de duplas. Não houve variação no número médio de embriões recuperados por égua, no número médio de embriões recuperados por ovulação e nem no tempo de tratamento ($P>0.05$) entre os grupos.

Quanto ao número médio de folículos ≥ 25 mm no momento do início do tratamento no dia 6 pós ovulação, não foi detectada diferença estatística entre os grupos. No entanto, nas éguas que apresentaram folículos maiores que 25mm, detectou-se apenas uma ovulação.

As médias dos Intervalos entre o início do tratamento e a ovulação não apresentaram diferença estatística ($P>0.05$) entre os grupos (Tabela 5).

A análise do desenvolvimento folicular diária só demonstrou efeito de momentos ($P<0,05$) durante o crescimento de cada folículo F1 e F2 de cada grupo, no entanto, não demonstrou efeito ($P>0,05$) algum para F3 (Tabela 6). Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de crescimento diário entre os grupos. A curva de crescimento folicular está demonstrada na Figura 6.

TABELA 5 - Média e erro padrão dos números de folículos entre 25-29mm e folículos ≥ 30 mm no momento da indução, diâmetros máximos alcançados por F1, F2 e F3, número de ovulações por égua, número de embriões recuperados por égua, número de embriões recuperados por ovulação, intervalo entre início do tratamento e ovulação e dias de tratamento no experimento 3.

Experimento 3				
	Controle Salina n=6	25FSHp- D6 25mg FSHp n=7	EPE-D6 12,5mg EPE n=7	50FSHp- D6 50mg FSHp n=5
Fol 25-29 (mm)	0,3 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,2
Fol ≥ 30 (mm)	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,4*	1,0 $\pm$ 0,0
D.M. F1 (mm)	37,7 $\pm$ 0,7 ^A	38,6 $\pm$ 0,7 ^A	37,7 $\pm$ 0,5 ^{A*}	37,0 $\pm$ 0,5 ^A
D.M. F2 (mm)	28,7 $\pm$ 2,0 ^B	24,6 $\pm$ 2,3 ^B	31,2 $\pm$ 2,2 ^{A*}	22,9 $\pm$ 2,9 ^B
D.M. F3 (mm)	21,3 $\pm$ 0,5 ^C	20,3 $\pm$ 0,6 ^B	24,5 $\pm$ 0,9 ^B	16,0 $\pm$ 0,8 ^B
Ov./égua	1,33 $\pm$ 0,2 ^{ab}	1,00 $\pm$ 0,0 ^b	2,14 $\pm$ 0,4 ^a	1,00 $\pm$ 0,0 ^b
Emb./égua	1,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,5	-
Emb./ov.(%)	(6/8) 75,0	(7/7) 100,0	(11/15) 73,3	-
Trat.-ov. (dias)	8,2 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 0,9	7,4 $\pm$ 0,8
Dias Trat. (dias)	5,5 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 1,1
	(4-8)	(3-6)	(1-9)	(3-7)

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha.

Sem indicação de letras = semelhança estatística

D.M. = Diâmetro máximo

Ov. = ovulação

Emb. = Embrião

Trat. = Tratamento

* indica tendência a significância

TABELA 6 - Média e erro padrão do crescimento diário dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) expresso em mm no experimento 3.

Experimento 3								
		Dias						
		-5	-4	-3	-2	-1	0	1
F1	Controle	22±1,3	24±0,8	27±1	31±0,6	33±0,4	37±0,6	37±0,7
	25FSHp-D6	22±1,1	25±1,5	27±1,4	30±1,6	33±0,8	38±0,9	37±0,6
	EPE-D6	21±1,8	24±1,5	28±1,7	32±1,4	36±0,7	37±0,6	37±0,6
	50FSHp-D6	24±2,9	24±1,9	26±1,6	27±1,2	31±0,9	37±0,3	37±0,6
	Médias Dias	22±2,0 f	24±1,7 e	27±1,8 d	30±1,7 c	33±1,2 b	37±0,8 a	37±0,7 a
F2	Controle	19±1,0	22±0,7	25±0,8	26±1,3	28±2,1	27±2,1	25±2,1
	25FSHp-D6	20±1,2	21±0,9	22±1,4	24±1,9	23±2,5	23±2,7	20±1,9
	EPE-D6	18±1,6	22±2,1	23±2,2	26±2,5	28±2,9	31±2,6	30±2,3
	50FSHp-D6	18±0,9	20±1,8	19±2,5	20±2,8	21±2,8	21±3,6	18±3,8
	Médias Dias	19±1,6 e	21±1,7 cd	22±2,3 c	24±2,7 b	25±3,4 a	25±3,9 a	24±3,5 Ab
F3	Controle	17±1	18±1,1	20±0,9	19±0,6	19±1	17±1,2	16±1,1
	25FSHp-D6	19±1,2	19±1,1	18±1,5	17±1,3	17±1,7	16±2	16±2
	EPE-D6	16±1,2	18±1,6	18±2,5	20±2,9	21±3,4	21±4	19±4,1
	50FSHp-D6	13±1,4	13±1	14±1,6	14±2	14±2,2	14±2,2	14±2,1
	Médias Dias	16±1,6	18±1,9	18±2,3	18±2,5	18±3	17±3,5	17±3,4

Letras diferentes determinam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam dados dentro de uma mesma coluna e letras minúsculas comparam dados dentro da mesma linha.

Sem indicação de letras = semelhança estatística

D0 = Dia de aplicação do hCG

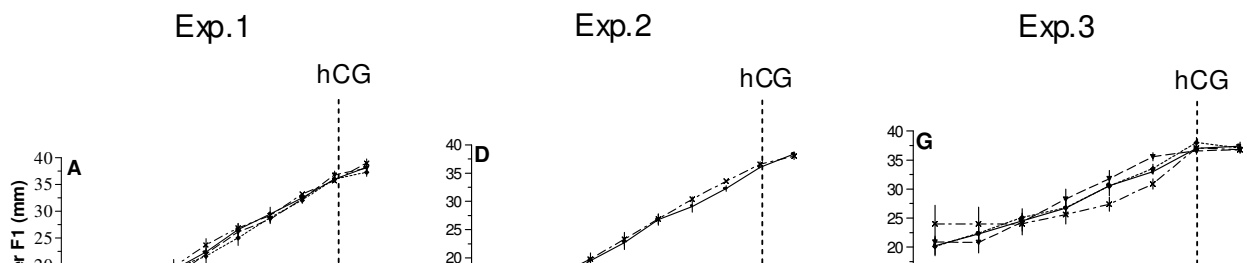


FIGURA 6 – Gráficos da média do desenvolvimento folicular diário dos F1, F2 e F3 de cada grupo do experimento 1, experimento 2 e experimento 3. A linha pontilhada indica o momento de aplicação do hCG ou D0. $P < 0,05$ para efeito de momento nos gráficos A, B, C, D, E, F, G e H. $P < 0,05$ para efeito de grupos no gráfico F.

6. DISCUSSÃO

Nenhum dos tratamentos foi capaz de aumentar o número médio de folículos entre 25-29 mm e ≥ 30 mm, além do F1, no momento da indução, no entanto, o tratamento com EPE em éguas BH demonstrou uma tendência a apresentar mais folículos ≥ 30 mm. Ainda, os 71% (5/7) das éguas do grupo FSHp-F13 do exp. 1 e 57% (4/7) das éguas do grupo FSHp-F13 do exp. 2 que apresentaram folículos entre 25-29mm no momento da indução demonstraram que houve uma certa resposta ao tratamento. Resultados semelhantes foram citados por Squires et al. (1986) que obtiveram maior número de folículos ≥ 30 mm e maior diâmetro do segundo maior folículo ao utilizarem 150 mg de FSHp e por Bruck et al. (1997), que cita ter encontrado um aparente aumento no número de folículos disponíveis para aspiração folicular com o intuito de obtenção de oócitos ao utilizarem 100 mg de FSHp em éguas.

O diâmetro do F1 não diferiu entre os grupos, o que já era esperado, pois o maior folículo se torna dominante independente do tratamento aplicado. O diâmetro do F2 também não alterou significativamente entre os grupos de cada experimento, mas apresentou uma tendência a ser maior no grupo tratado com EPE no experimento 3 devido ao maior número de éguas que apresentaram múltiplas ovulações neste grupo. Fato este também demonstrado pela semelhança entre as médias dos diâmetros máximos alcançados por F1 e F2 no grupo EPE-D6.

A média do diâmetro máximo de F3 foi aumentada pelo tratamento de 50mg de FSHp, quando comparada ao grupo controle (exp. 2). No entanto, os 25mg de FSHp no exp. 1 e os 50mg de FSHp no exp. 3 não foram suficientes para promoverem o mesmo resultado o que pode ser uma evidência de uma possível refratariedade ao tratamento do grupo de éguas utilizada neste trabalho.

No experimento 3, o diâmetro do F2, assim como do F3, apresentaram tendência a ser maior no grupo EPE-D6 que nos demais, fato atribuído ao maior número de animais com múltiplas ovulações ($2,14 \pm 0,4$). Três ovulações em uma égua e quatro em outra foram detectadas neste grupo. Squires et al. (1986) ao comparar o EPE e FSHp em tratamentos superovulatórios observaram um aumento do diâmetro do F2 em ambos os grupos tratados, fato este atribuído à presença de animais com ovulações duplas ao final dos tratamentos.

Nos grupos FSHp-13 e FSHp-D6 do experimento 1 cujos tratamentos foram iniciados quando o maior folículo da onda induzida atingiu 13mm e no D6, respectivamente, promoveram o crescimento de F3 até um diâmetro máximo semelhante ao referente F2. O mesmo não foi observado quando o tratamento foi iniciado no momento que o maior folículo da onda induzida atingiu 20mm. Isto indica que uma melhor resposta do F3 foi obtida ao iniciar o tratamento com FSHp quando o maior folículo da onda induzida atingiu ≥ 13 mm, ou seja, no momento de início da

redução nas concentrações séricas de FSH por consequência da liberação de inibina pelos folículos, conforme descrito na literatura (GASTAL et al., 1999a,b; BERGFELT et al., 2001; DONADEU & GINTHER, 2001; GINTHER et al., 2005).

No grupo controle do exp.1, o diâmetro máximo atingido pelo F3 foi similar ao F2, provavelmente devido a grande variação em diâmetro observada nos F2 (10 a 37.5 mm) bem como nos F3 (8 a 20 mm). No grupo não aspirado, cujo o tratamento iniciou-se no D6, obteve-se resultados similares, ou seja, no início do diestro quando a maioria das éguas apresentam folículos com diâmetros pequenos. Resultados semelhantes foram observados no exp. 3, já que o F3 teve crescimento semelhante ao F2 dentro dos grupos tratados com 25 ou 50mg de FSHp. O F3 do grupo EPE-D6 foi menor do que o F2 fato atribuído ao maior número de duplas ovulações que aumentou o diâmetro do F2 tornando-o semelhante ao de F1.

No presente trabalho, nos grupos onde não houve indução de uma nova onda folicular (grupo FSHp-D6 do exp. 1 e em todos do exp. 3), o número de éguas que apresentaram folículos ≥ 25 mm de diâmetro no início do tratamento não diferiram estatisticamente, no entanto, aquelas que apresentaram esta categoria de folículo sofreram interferência na resposta ovulatória apresentando apenas uma ovulação por ciclo. Nestes grupos, o tratamento superovulatório foi iniciado em um dia específico do ciclo estral (D6) independente da população e diâmetro folicular detectados neste momento. Dippert et al. (1992), ao realizar uma comparação entre perfis ovarianos e demonstraram que melhor resposta ovariana foi alcançada quando não havia folículos ≥ 20 mm no momento do início do tratamento. Desta maneira, estudos preconizaram o início do tratamento entre os dias cinco e sete após a ovulação (NISWENDER et al., 2003; SCOGGIN et al., 2002) para evitar que o início do tratamento ocorra na presença de folículos dominantes.

Nos casos de éguas com duas ondas foliculares, a emergência de uma onda pode ocorrer no final do estro ou início do diestro de forma que folículos dominantes podem estar presentes no início do diestro, fato observado em algumas éguas deste trabalho. Assim, Orlandi (2008) preconizou o diâmetro do maior folículo em crescimento para determinar o melhor momento para iniciar um tratamento superovulatório e demonstraram que a melhor resposta ovulatória ocorreu quando iniciou-se o tratamento no momento que o maior folículo em crescimento atingiu 20 a 23 mm. Ou seja, imediatamente antes ou durante o momento esperado do desvio folicular evitando, desta maneira, a influência negativa do folículo dominante sobre os demais ao mesmo tempo que permitiu a redução no período de tratamento. Achados na literatura reforçam estes fatos pois demonstram que o folículo pode ser capaz de se tornar dominante a partir da fase de crescimento

folicular comum até a divergência nos casos da eliminação mecânica do efeito inibitório do maior folículo sobre os subordinados, mas incapaz de retornar ao crescimento uma vez destinados a atresia folicular (GASTAL et al., 1999a).

Os resultados encontrados para o número de folículos entre 25-29mm, ≥ 30 mm e diâmetros máximos alcançados pelos três maiores folículos influenciaram e justificaram os resultados encontrados tanto para número de ovulações quanto para embriões recuperados, já que apenas os folículos que alcançaram diâmetros maiores que 25mm ovularam.

O número de ovulações ($2,14 \pm 0,4$) no grupo EPE-D6 foi inferior aos valores relatados por Scoggin et al. [2002 ($3,4 \pm 0,8$)]. Entretanto, semelhantes aos de Orlandi (2008) que obtiveram $1,99 \pm 0,21$ em éguas tratadas com 12,5mg de EPE. O número médio de ovulações após o tratamento com EPE foi estatisticamente superior aos grupos tratados com 25mg ou 50mg de FSHp confirmando achados anteriormente descritos por Squires et al. (1986).

No experimento 3, o número médio de ovulações do grupo controle ($1,33 \pm 0,2$) foi similar a todos os grupos e verificou-se que nos grupos tratados com FSHp foi detectado apenas uma ovulação por égua. Já no grupo controle ovulações duplas foram observadas ressaltando os altos índices de ovulações duplas espontâneas nas raças de hipismo, como descritos na literatura (GINTHER et al., 1982; SQUIRES et al., 1987; DAVIES & SULLIVAN, 2001; PERKINS & GRIMMETT, 2001; NEWCOMBE & ENGLAND, 2002). O número de ovulações refletiu no número médio de embriões recuperados, que também foi similar entre os grupos controle e EPE-D6.

Os tratamentos com FSHp não foram capazes de promover um aumento significativo nos números de ovulações e de embriões recuperados em nenhum dos três experimentos desenvolvidos independente da raça utilizada. A literatura demonstra que estudos com FSHp utilizando doses entre 8 e 100mg (CASTRO-CHAVES et al., 2008; BRUCK et al., 1997; FORTUNE & KMMINCH, 1983) alcançaram um aumento insatisfatório de ovulações nos animais tratados. Entretanto, Krekeler et al. (2006), ao tratar éguas de hipismo com 25mg de FSHp duas vezes ao dia obtiveram 2,28 ovulações por ciclo, demonstrando uma eficiência do FSHp em promover ovulações duplas, fato não observado no presente estudo e nas demais literaturas citadas. Salienta-se que a razão para boa resposta obtida por Krekeler et al. (2006) não foi justificada em seu trabalho, sendo contraditório à maioria da literatura e, inclusive, ao presente trabalho.

O número médio de embriões recuperados por égua do grupo EPE-D6 ($1,6 \pm 0,5$) foi superior ao relatado por Dippert et al. (1994) que obtiveram 1,2 embriões por égua ao utilizarem tratamentos com 25mg de EPE duas vezes ao dia. Orlandi (2008) também obtiveram taxa de recuperação

embrionária inferior ao estudo em questão ao utilizar a mesma dose de EPE e iniciando o tratamento quando o maior folículo apresentava diâmetro ≥ 13 e ≥ 26 mm, sendo sua maior média de recuperação embrionária no tratamento iniciado no momento que o maior folículo atingiu ≥ 20 mm de diâmetro (1,41). Scoggin et al. (2002) e Rosas et al. (1998) relataram a recuperação de 2,6 e 2,0 embriões por lavado, respectivamente, utilizando mesma dose e protocolo de tratamento com EPE utilizados no presente experimento.

No grupo 25FSHp-D6 do exp. 3 foi obtida uma taxa de recuperação embrionária por ovulação de 100%, resultado superior ao obtido nos outros exp. 1 e 2 que não atingiram mais que 75% de embriões recuperados por ovulação e por Krekeler et al. (2006), no qual obtiveram uma média de 1,32 embriões de 2,28 ovulações. Dessa forma, no presente estudo o FSHp não estimulou o aumento da resposta ovulatória em éguas BH e devido a indiscutível fertilidade dos animais utilizados, a recuperação embrionária pode ser considerada superior aos valores descritos na literatura.

No experimento 1 foi encontrada diferença estatística quanto ao tempo de tratamento, demonstrando que o grupo FSHp-F20 necessitou de um menor número médio de dias para que o maior, ou maiores, folículo(s) atingisse(m) 32mm, momento que a estimulação foi encerrada. No entanto, a resposta ovariana não foi satisfatória com o uso do FSHp, possivelmente pelo fato das éguas não responderem consistentemente ao hormônio utilizado e não necessariamente pelo momento do início do tratamento, já que outros autores (Orlandi, 2008, Dippert et al., 1992) citam resultados promissores ao iniciar-se o tratamento quando há presença de folículos entre 20 – 23 mm.

Em relação aos dias de tratamento foi observada uma grande variação individual, principalmente nos grupos onde a emergência folicular não foi induzida. Em uma égua no grupo EPE-D6 (experimento 3) e outra no grupo FSHp-D6 (experimento 1), apresentaram um e dois dias de tratamento, respectivamente, fato este explicado pela presença de um folículo dominante proveniente de uma onda folicular secundária.

A redução no tempo necessário para realização de um tratamento superovulatório é de grande valor prático devido ao menor tempo de mão de obra e redução no custo de tratamento, por permitir a utilização de uma menor dose total. Por este motivo, estudos vem sendo realizados com o intuito de determinar o melhor momento para iniciar a estimulação culminando em curto tempo de tratamento e resposta ovariana satisfatória (DIPPERT et al., 1992, ORLANDI, 2008).

O desenvolvimento dos três maiores folículos acompanhados diariamente por ultrassonografia no exp. 1 e 2 e dois maiores folículos do exp. 3 apresentaram efeito de momento. Este achado é esperado independente da aplicação ou não de um tratamento superovulatório já que os folículos

acompanhados estavam conhecidamente em crescimento e, conseqüentemente, seus diâmetros aumentam ao longo dos dias. No entanto, a taxa de crescimento folicular diário foi similar entre os grupos ($P>0,05$). Apenas o desenvolvimento do F3 relativo ao grupo FSHp-F13 do exp. 2 apresentou efeito de grupo por ter demonstrado um perfil diferente em relação ao controle. O diâmetro máximo do F3 do grupo FSHp-F13 foi maior que o F3 do grupo controle e semelhante ao F2 do mesmo grupo como consequência deste efeito. Este fato demonstra uma melhor resposta do F3 de éguas tratadas com 50mg de FSHp, o mesmo não foi observado no exp. 3. Entre os F3 dos grupos do exp. 3 não foram detectados nenhum tipo de efeito porque poucos foram os folículos que se desenvolveram durante as avaliações ultrassonográficas e apenas duas éguas apresentaram mais que duas ovulações.

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 equino tenham interferido na resposta. O FSH é um hormônio pertencente à família de hormônios glicoproteicos compostos por uma subunidade α comum e uma subunidade hormônio específica β não covalentemente associada (PIERSE & 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).

Os resultados obtidos por Krekeler et al. (2006) que utilizaram as doses de 10 e 25 mg de FSHp em éguas de raças de hipismo não foram possíveis de serem repetidos no presente estudo onde observou-se resultados semelhantes aos previamente publicados utilizando o FSHp (SQUIRES et al., 1986, FORTUNE & KMMINCH, 1983).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento com FSHp nas doses utilizadas, 25 e 50mg, iniciada em um dia determinado do ciclo estral ou em momentos específicos do desenvolvimento folicular não melhoraram a resposta ovulatória em éguas. A utilização do EPE promoveu melhor resposta ovariana em éguas quando comparado ao FSHp. A realização de novas pesquisas quanto a identificação da presença de receptores para FSH suíno na égua e, mais importante ainda, suas respostas biológicas são de grande importância para justificar os baixos resultados.

8. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.502-507, 2004.

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

ARAUJO, G.H.M.; ROCHA FILHO, A.N.; LOPES, E.P.; MOYA, C.F.; ALVARENGA, M.A. Use of low dose of equine purified FSH to induce ovulations in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.380-383, 2008.

BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1239-1250, 2000.

BARRIER-BATTUT, L.E.; POUTRE, N.; TROCHERIE, E.; HECJT, S.; GRANDCHAMP DES RAUX, A.; NICAISE, J.L. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. **Theriogenology**, v.55, p.1679-1695, 2001.

BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.39, p.781-796, 1993.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovulation Synchrony after follicle ablation in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, Suppl., p.257-269, 2000.

BERGFELT, D.R.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.1-12, 1997.

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

BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895-907, 1994.

BLANCO, I.D.P.; DEVITO, L.G.; FERREIRA, H.N.; ARAÚJO, G.H.M.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIN-ALVARENGA, F.C. Aspiration of equine oocytes from immature follicles after treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. **Animal Reproduction Science**, 2008. In press.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31-40, 1995.

BOHG, I.B.; BRINK, P.; JENSEN, H.E.; LEHN-JENSEN, H.; GREVE, T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.575-579, 2003.

BRIANT, C.; TOUTAIN, P.L.; OTTOGALLI, M.; MAGALLON, T.; GUILLAUME, D. Kinetic studies and production rate of equine (e) FSH in ovariectomized pony mares. Application to the determination of a dosage regimen for eFSH in a superovulation treatment. **Journal of Endocrinology**, v.182, p.43-54, 2004.

BRÜCK, I.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. **Theriogenology**, v.47, p.1157-1167, 1997.

BURATINI, J.J.R.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BO, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant Bovine Somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, p.421-431, 2000.

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

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.

DAVIES MOREL, M.C.G.; O'SULLIVAN, J.A.M. Ovulation rate and distribution in the thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.59-70, 2002.

DAY, F.T. Clinical and experimental observations on reproduction in the mare. **Journal of Agriculture Science Cambridge**, v.30, p.244-261, 1940.

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

DE RUIGH, L.; MULLAART, E.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield. **Theriogenology**, v.53, p.349, 2000.

DIPPERT, 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.695-710, 1992.

DIPPERT, K.D.; JASKO, D.J.; SEIDEL, G.E.; SQUIRES, E.L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41, p.1411-1423, 1994.

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

DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Suppression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.60, p.1423-1434, 2003.

DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; PALMER, E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biology of Reproduction Monography Series**, v.1, p.233-241, 1995.

DUFOUR, J.J.; MERMILLOD, P.; MARIANA, J.C.; ROMAIN, R.F. The effect of a GnRH agonist on follicular dynamics and response to FSH stimulation in prepubertal calves. **Reproduction Nutrition Development**, v.39, p.133-144, 1999.

EVANS, A.C.; O'KEEFFE, P.; MIHM, M.; ROCHE, J.F.; MACMILLAN, K.L. Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronization, the LH surge and ovulation in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.13-23, 2003.

FARINASSO, A.; BRANQUINHO, J.A.; RUMPF, R.; ALVARENGA, M.A. Use of low doses of equine pituitary extract to induce multiple ovulations in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl. 1, p.135-137, 2005.

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

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

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

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.53, p.925-940, 2000.

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

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

GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare. Cross Plaines: Equiservices Publishing, 1992, 692p.

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

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

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1374-1379, 2004b.

GINTHER, O.J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., CHECURA, C.M., BEG, M.A. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1063-1069, 2004c.

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

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

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

HANDLER, J.; SHONLIED, S.; HOPPEN, H.O.; AURICH, C. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDTM) in mares. **Theriogenology**, v.65, p.1145-1158, 2006.

HANDLER, J.; SCHONLIEB, S.; HOPPEN, H.O.; AURICH, C. Influence of reproductive stage at PRIDTM insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.382-393, 2007.

HASLER, J. F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2857-2879, 1992.

HILL, B.R.; KUEHNER, L.F. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. **Theriogenology**, v.54, p.324, 1996. Abstract.

HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. **Biology of Reproduction**, v.44, p.292-298, 1991.

HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, Suppl., p.341-349, 1991.

HOFFERER, S.; LECOMPTE, F.; MAGALLON, T.; PALMER, E.; COMBARNOUS, Y. Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.597-602, 1993.

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

JENNINGS, M.W.; BOIME, I.; 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 recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. **Animal Reproduction Science**, 2009. In press.

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

KILICARSLAN, M.R.; HOROZ, H.; SENUNVER, A.; KONUK, S.C.; TEK, CL.; CARIOGLU, B. Effect of GnRH and hCG on ovulation and pregnancy in mares. **Veterinary Record**, v.139, p.119-120, 1996.

KIM, U.H.; SUH, G.H.; HUR, T.Y.; KANG, S.J.; KANG, H.G.; PARK, S.B.; KIM, H.S.; KIM, I.H. The effects of administering estradiol benzoate plus progesterone during the growth or static phases of the dominant follicle in CIDR-treated lactating dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p.591-596, 2007.

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.663-664, 2006.

LOGAN, N.L.; McCUE, P.M.; ALONSO, M.A.; SQUIRES, E.L. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.48-55, 2007.

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

MACHADO, M. S. **Avaliação do perfil endócrino de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária e FSH equino purificado**. 2008. 130f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, I.; STEFANO, B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.299-308, 2005.

McCUE, P.M.; CARNEY, N.C.; HUGHES, J.P.; RIVIER, J.; VALE, W.; LASLEY, B.L. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, v.38, p.823-831, 1992.

McCUE, P.M.; LeBLANC, M.M.; SQUIRES, E.L. eFSH in clinical equine practice. **Theriogenology**, v.68, p.429-433, 2007.

McKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASHEN, R.L.; GREENWOOD, P.E.; VASEY, J.R. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin (-subunit). **Equine Veterinary Journal**, v.24, p.144-146, 1992.

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

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-674, 2003.

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.

NEWCOMB, J.R.; ENGLAND, G.C.W. Embryonic development in quadruplet equine pregnancies. **The Veterinary Record**, v.151, p.214-215, 2002.

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

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

PALMER, E.; HAJMELI, G.; DUCHAMP, G. Gonadotrophin treatments increase ovulation rate but not embryo production from mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.99-102, 1993.

PERES, K. R. **Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante equino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera.** 2004. 131f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

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

RAZ, T.; CARLEY, S.; CARDA, 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.

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

SATO, T.; NAKADA, K.; UCHIYAMA, Y.; KIMURA, Y.; FUJIWARA, N.; SATO, Y.; UMEDA, M.; FURUKAWA, T. The effect of pretreatment with different doses of GnRH to synchronize follicular wave on superstimulation of follicular growth in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, p.573-578, 2005.

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

SEGWAGWE, B.V.; MACMILLAN, K.L.; MANSELL, P.D. The effect of GnRH or estradiol injected at pro-estrous on luteal function and follicular dynamics of the subsequent oestrous cycle in

non-lactating cycling Holstein cows. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.73, p.61-70, 2006.

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

SQUIRES, E.L.; McCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; McKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, v.28, p.609-613, 1987.

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

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

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; BEVER, M.M.; STOUT, T.A.E. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. **Theriogenology**, v.65, p.1071-1081, 2006.

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.

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.

WILSON, C.G.; DOWNIE, C.R.; HUGHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, p.262-270, 1990.

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

9. TRABALHO CIENTÍFICO

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

Ovarian response and embryo recovery rate in cycling mares treated with porcine FSH and
Equine Pituitary Extract

F.S. Ignácio¹, D.R. Bergfelt², D. Mendes¹, C. Orlandi¹, G.H.M. Araújo¹, J.V. Oliveira^{1,4}, L.R.
Carvalho³, D.F. Montechiesi¹, C. Meira¹

¹Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary
Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP 18610-970, Brazil

² Repro Endo-To, Ashburn, VA, USA

³Departament of Bioeststatistics, Biociences Institute, UNESP, Botucatu, SP 18610-970, Brazil

⁴APTA, Alta Mogiana Farm, Colina, SP 14770-000, Brazil.

1. Introduction

Superovulatory treatments in mares, as it is in cows, aim to hire a large number of follicles of the same follicular wave, stimulating them to develop and end on multiple ovulations. Therefore, superovulation (SOV) increase the oocyte offers for *in vitro* fecundation (IVF) or oocyte transfer (OT) and amplify embryo recovery rates at embryo transfer (ET) programs and/or cryopreservation.

However, the SOV protocols in mares developed so far have demonstrated low efficiency and inconsistent results.

Hormonal preparations that have shown better results in equine SOV are the Equine Pituitary Extract (EPE) [1,2], the purified equine FSH (eFSH) [3,4] and, recently, the recombinant equine FSH (reFSH) was used showing promising results [5]. However, its commercial unavailability limits their use in ET programs.

The porcine FSH (pFSH) is an available product extremely used in bovine SOV. However, it had demonstrated low efficacy in mares [6,7]. After administration of 150mg of pFSH every 12 hours beginning on day 12 of the estrous cycle and continued until the detection of follicles $\geq 35\text{mm}$, Squires *et al* (1986) obtained a mean of 1.6 ovulation per mare, result significantly lower than the obtained from the EPE use. Similar results were found by other authors that tested the pFSH in mares [8,9], with ovulation rates lower than two per mare. However, a recent study done by Krekeler *et al* (2006) and using 10 or 25mg of pFSH administered twice a day in warm blooded mares, which means, much inferior doses compared to the ones tested so far, achieved better results. They found 2.2 and 2.28 ovulations, for each of the two doses tested respectively, and 1.32 embryos were recovered per mare treated with 25mg, such results makes the treatment worth it as it is consider that only 30% of the mares demonstrate spontaneous multiple ovulation. These findings and by relating to a hormonal preparation of easy commercial access and low cost encouraged the execution of new researches using the pFSH in mares.

Also, considering the particularities found in the warm blood mares as the high incidence of spontaneous multiple ovulations [11, 12,13, 14, 15], a hypothesis is that these characteristics may contribute to a better ovarian response to the pFSH use.

The aims of this work were to evaluate the ovarian response and embryo recovery rate of mares treated with pFSH and to reduce treatment time, by expecting that the pFSH stimulates an biologic response in mares and that the beginning of treatment at the moment the larger follicle of an

induced follicular wave achieves $\geq 20\text{mm}$ reduces treatment time without altering the ovarian response to treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Experiment 1

Twenty eight cycling mares (half blooded Mangalarga and Arabian mares) in good body condition and age between four and 15 years old from the Unesp medicine veterinary school (Botucatu, Sao Paulo, Brazil, Latitude $-22^{\circ} 53' 09''$ and Longitude $48^{\circ} 26' 42''$) were used. They were maintained enclosed and fed with cost-cross hay (*Cynodon dactylon*), concentrate, mineral supplement and free access to water.

The mares were evaluated by daily trans-rectal ultra-sound examination for ovulation detection (D0). At this moment, mares were randomly assigned into the four experimental groups ($n=7/\text{group}$), three of them were submitted to ablation of all follicles $\geq 8\text{mm}$ on the 10th day post-ovulation (D10, D0=day of ovulation) and one group treated non-ablated.

Distribution of mares into experimental groups, used dosage of hormones and beginning of treatments are related in Table 1. In every group the pFSH or saline injections were done with regular 12 hours intervals, kept until the largest follicle achieved a $\geq 32\text{mm}$ diameter, when they were interrupted. When the largest follicle achieved $\geq 35\text{mm}$, ovulations were induced by a single hCG application of 2500UI i.v. (Chorulon[®]).

Luteolysis was induced by one application of PGF_{2 α} (Lutalyse[®], 7.5mg, i.m.) 12 hours after the beginning of treatments with pFSH or saline.

2.1.1. Follicular ablation

Each mare was led into a restraining chute and mildly sedated with Xilazine 10% (0.5mg/Kg, i.v.; Sedazine[®], Fort Dodge) and Acepromazine (0.03mg/Kg, i.v.; Acepran[®], Vetnil). Hyoscine n-butyl bromide (butylscopolamine, 0.2mg/Kg, i.v.; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was given to relax the rectum, the tail was wrapped and tied on the side, and the perineum was washed and dried. An 16-gauge needle approximately 7cm long (Follicular ablation needle: Watanabe tecnologia aplicada) and attached via flexible tubing to a vacuum pump (Watanabe tecnologia aplicada) with a negative pressure of approximately 300mm Hg was used to puncture and aspirate all follicles ≥ 8 mm via ultrasound guidance using an convex transducer of 5MHz (Pie Medical model 240; Maastricht, The Netherlands) with trans-vaginal guide. Ablation was defined by the collapse of a targeted follicle after evacuation of its contents as visualized on the ultrasound monitor. Mares received two doses of flunixin meglumine (1mg/Kg, i.v.; Banamine[®], Shering-Plough Animal Health), being the first administration immediately before the ablation procedure and the second, 24 hours after, looking for analgesia and anti-inflammatory action.

2.1.2. Follicular development, artificial insemination (AI) and embryo collections

From the follicular ablation procedure or the beginning of treatment on D6, the three largest follicles of a new wave were measured [height and length (mm) from frozen images] every 24 hours by trans-rectal ultrasound (Aloka SSD500 with linear transducer of 5MHz), continuing until the detection of ovulations.

From ultrasonographic accompaniment data of number of follicles between 25-29mm at induction of ovulation moment, follicles ≥ 30 mm at induction of ovulation moment, maximum diameter of F1, F2 and F3, ovulations per mare, recovered embryos per mare, recovered embryos per ovulation, interval between beginning of treatment and ovulation and days of treatment.

Mares were inseminated 12 and 36 hours after the induction of ovulations (follicles ≥ 35 mm), using fresh semen diluted in a dried milk base extender (1×10^9 mobile sperm per insemination) from a tested fertile stallion. In cases that a mare did not ovulated until the 48 hours after induction, AI was repeated after 60 hours from induction.

Mares were submitted to embryo collection eight days after detection of the first ovulation (D8), followed by an injection of Dinoprost-trometamine ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 7.5mg, i.m., lutalyse[®], Pfizer Animal Health).

2.2. Experiment 2

Seventeen cycling mares (half blooded Mangalarga and Arabian mares) in good body condition and age between four and 15 years old from the Unesp medicine veterinary school (Botucatu, Sao Paulo, Brazil, Latitude -22° 53' 09" and Longitude 48° 26' 42") were used. The mares were maintained and fed as described in experiment 1.

The mares were submitted to follicular ablation for the induction of a new follicular wave on D10 following the same protocol described in experiment 1 and randomly distributed into two groups: a non-treated ablation group (Control, n=10) and a ablation group treated with 50mg of pFSH twice a day beginning when the larger follicle reached ≥ 13 mm (pFSH-F13, n=7).

Treatments with pFSH or saline, as well as the accompaniment of the follicular development, induction of ovulations, AI and embryo collections were done following the procedures described for pFSH-F13 and saline-F13 groups in experiment 1.

2.3. Experiment 3

Twenty six warm-blooded cycling (Brazilian jumping mares breed) mares in good body condition and age between four and 10 years old were used. The mares from the Zootecnia Institute (Colina, SP, Brazil, Latitude -20° 42' 48" and Longitude 48° 32' 27") were maintained enclosed and fed with cost-cross hay (*Cynodon dactylon*), concentrate, mineral supplement and free access to water.

After ovulation (D0), the mares were randomly assigned in four non-ablation groups: a not treated group (Control, n=7), two pFSH treated groups, one of them with 25mg (FSHp-D6, n=7) and the other with 50mg (50FSHp-D6, n=5) and, finally, the fourth treated group (EPE-D6, n=7) in which the mares received 12.5mg of EPE.

In all groups the pFSH and EPE applications were done from the D6 regularly every 12 hours, continuing until the largest follicle reached $\geq 32\text{mm}$, when it is interrupted. When the majority of the larger follicles reached $\geq 35\text{mm}$, the ovulations were induced with one application of hCG (Chorulon[®], 2500UI).

For the EPE preparation, pituitary glands were obtained from equine abattoirs and maintained at a temperature of -20°C until they were processed following description of Guilou & Combarous (1983). For the present study, the lyophilized content to all departures were weighted in analytical scale, mixed and diluted into saline solution 0.9% to achieve a concentration of 6.25mg/mL. This procedure was viewing the obtaining of a homogenous departure for the whole experiment.

After ovulation (D0), the mares were randomly assigned in four non-ablation groups: a not treated group (Control, n=7), two pFSH treated groups, one of them with 25mg (FSHp-D6, n=7) and the other with 50mg (50FSHp-D6, n=5) and, finally, the third treated group (EPE-D6, n=7) in which the mares received 12.5mg of EPE.

Gonadotrophins concentration in the EPE solution was determined by RIA at the endocrinology laboratory of Professor O. J. Ginther in Wisconsin University, EUA. FSH and LH concentration were: 3.6% (225ng/mL) and 1.0% (62.5ng/mL); being represented by the proportion of 3:1 of FSH and LH, respectively.

Luteolysis was induced by one application of PGF_{2α} (Lutalyse[®], 7.5mg, i.m.) 12 hours after the beginning of treatments with pFSH or EPE, at the same moment the mares of the control group also received the same dose of PGF_{2α} by the same via.

Follicular development, AI and embryo collections were done following procedures described for experiment 1.

2.4. Statistical Analysis

For number of follicles between 25-29mm and follicles ≥ 30 mm at the induction of ovulation moment, maximum diameter of F1, F2 and F3, ovulations per mare, recovered embryos per mare, interval between beginning of treatment and ovulation, days of treatment, number of follicles ≥ 25 mm at beginning of treatment in exp. 3 and analysis of follicular diameter for each group at different moments where used the profile analysis, followed by Tukey method for comparing means of SAS program, version 9.1. Results were shown by means and standard errors and level of significance of 5%.

For daily follicular development analysis, data was normalized back from the day of induction of ovulation (D0) and truncated accordingly to a minimal number of three mares in at least one group for statistical analysis.

For the recovered embryo per ovulation data the Fisher exact test with a significance of 5% was used for comparing groups into an experiment.

3. Results

3.1. Experiment 1

Treatments with 25mg of pFSH were not efficient on significantly increasing the number of follicles between 25-29mm and ≥ 30 mm until the moment of ovulation induction with hCG (Table 2).

From the mares used in this experiment, 29% (2/7), 71% (5/7), 29% (2/7) and 29% (2/7) showed follicles between 25-29mm at the moment of ovulation induction in the Control, pFSH-F13, pFSH-F20 and pFSH-D6 groups, respectively. In two mares of the control group and two of the pFSH-D6 were observed two follicles ≥ 30 mm in each of them, being detected double ovulation in only one mare of each group.

Mean maximum diameter achieved by F1, F2 and F3 did not statistically differed between groups ($P > 0.05$). However, for control, pFSH-F13 and pFSH-D6 groups, mean maximum diameter of F1 were larger than F2 ($P < 0.05$), but they did not differed of F3 ($P > 0.05$) into each group. For pFSH-F20 group, maximum mean diameter of F1 was larger than F2 ($P < 0.05$) and this larger than F3 ($P < 0.05$) (Table 2).

Mean number of ovulations, recovered embryos per mare and recovered embryos per ovulation were similar between groups ($P>0.05$) (Table 2).

Means of intervals between beginning of treatment and ovulation showed a statistical difference ($P<0.05$) between groups. Control group was similar to pFSH-F13 group and pFSH-D6, while pFSH-F20 group was similar to pFSH-F13 but differed to other groups (Table 2).

However, time of treatment (days) was shorter ($P<0.05$) for group pFSH-F20 (Table 2) which showed three mares with three days of treatment, two with five days, one with two days and one with one day. Control, pFSH-F13 and pFSH-D6 groups had similar frequencies for six or more days of treatment. Also, one mare which had a 28mm follicle at beginning of treatment in group pFSH-D6 only needed one day of treatment to achieve ≥ 32 mm diameter.

Daily follicular development analysis demonstrated only moment effects between F1 of each group, F2 of each group and F3 of each group (Figure 1).

3.2. Experiment 2

Treatments with 50mg of pFSH were not efficient on significantly increasing the number of follicles between 25-29mm and ≥ 30 mm until the moment of ovulation induction with hCG (Table 2).

From the mares used in this experiment, 30% (3/10) e 30% (3/10) from control group and 57% (4/7) and 29% (2/7) from pFSH-F13 group showed follicles between 25-29mm, respectively, at the moment of ovulation induction. From the five mares with follicles ≥ 30 mm in both groups, only one mare in the control had single ovulation, the others had double ovulations.

Mean maximum diameter achieved by F1 and F2 did not statistically differed between groups ($P>0.05$). However, mean maximum diameter achieved by F3 ($P<0.05$) in pFSH-F13 group than in

control. In the control group, F1 was larger than F2 and this was larger than F3 ($P<0.05$), while in group pFSH-F13, F1 was larger than F2 ($P<0.05$) but this was similar to F3 ($P>0.05$) (Table 2).

Mean number of ovulations, recovered embryos per mare and recovered embryos per ovulation were similar between groups ($P>0.05$) (Table 2).

Means of intervals between beginning of treatment and ovulation, as well as treatment days, were similar ($P>0.05$) between groups (Table 2).

Daily follicular development analysis demonstrated moment effects between F1 of each group, F2 of each group and F3 of each group ($P<0.05$) and group effect ($P<0.05$) for F3 being this significantly higher than pFSH-F13 group (Figure 1).

3.3. Experiment 3

One mare from the control group was excluded from the experiment for demonstrating a number of days of treatment (24 days) two times the standard deviation value (7.13) higher than the mean of the group (8.14).

Treatments were not efficient on significantly increasing the number of follicles between 25-29mm and ≥ 30 mm at induction of ovulation moment, however, it is detected a tendency ($P=0.078$) of EPE-D6 to increase the number of follicles ≥ 30 mm (Table 2).

Maximum mean diameter achieved by F1 did not differ statistically between groups. However, maximum mean diameter achieved by F2 and F3 demonstrated a tendency to be larger ($P=0.07$ and $P=0.06$, respectively) in group EPE-D6 than other groups. In Control group, F1 was larger than F2 and this was larger than F3 ($P<0.05$). As in group pFSH-D6 as in group 50pFSH-D6, F1 was larger

than F2 ($P < 0.05$) and similar to F3 ($P > 0.05$), while in group EPE-D6, F1 was similar to F2 ($P > 0.05$) and larger than F3 ($P < 0.05$) (Table 2).

Mean number of ovulations per mare was significantly larger ($P < 0.05$) for group treated with EPE comparing to the groups which received 25 and 50mg of pFSH, however, it was similar to control ($P > 0.05$), which of what 66.7% single ovulations and 33.3% of double ovulations were detected (Table 2).

Recovered embryos per mare and recovered embryos per ovulation were similar between groups ($P > 0.05$) (Table 2).

Mean number of follicles ≥ 25 mm at beginning of treatment on day 6 post-ovulation did not statistically differ between groups. However, mares that showed follicles larger than 25mm only had single ovulations.

Mean intervals between beginning of treatment and ovulation did not statistically differ ($P > 0.05$) between groups (Table 2).

Daily Follicular development showed moment effects between F1 of each group and F2 of each group, however, did not showed any effect between F3 of each group (Figure 1).

4. Discussion

None of the treatments were capable of increasing the number of follicles between 25-29mm and two follicles ≥ 30 mm at induction moment, however, treatment with EPE in warmblood mares showed a tendency to demonstrate more follicles ≥ 30 mm. Still, 71% (5/7) of the mares from group pFSH-F13 of exp. 1 and 57% (4/7) of the mares from group pFSH-F13 of exp. 2 that showed follicles between 25-29mm at induction moment demonstrated a response to treatment. Similar results were reported by Squires et al. (1986) which had obtained a higher number of follicles

≥ 30 mm and larger diameter of F2 when using 150mg of pFSH and by Bruck et al. (1997) which reported to have found an apparent increase in number of available follicles for follicular aspiration for oocyte recovery when using 100mg of pFSH in mares.

F1 maximum diameter did not differ between groups, which was already expected, as the larger follicle becomes dominant independent of the treatment. F2 maximum diameter also did not significantly differ between groups of each experiment, but demonstrated a tendency to be larger in the EPE group of exp. 3 because of the larger number of mares which showed multiple ovulations in this group. This fact has been also demonstrated by the similarity between maximum diameter means achieved by F1 and F2 in EPE-D6 group.

Mean maximum diameter of F3 was increased by treatment with 50mg of pFSH, when compared to control group (exp. 2). However, 25mg of pFSH in exp. 1 and 50mg of pFSH in exp. 3 were not sufficient to promote the same result, which can be an evidence of a possible refractivity to treatment of the mares used in these experiments.

In exp. 3, F2 diameter, as with F3, showed tendency to be larger in group EPE-D6 than the others, fact attributed to higher number of animals with multiple ovulations (2.14 ± 0.4). Three ovulations in one mare and four in another were detected in this group. Squires et al. (1986) when compared EPE to pFSH in superovulatory treatments found an increase in F2 diameter in both treated groups, fact attributed to the presence of animals with double ovulation at the end of treatments.

In the pFSH-F13 and pFSH-D6 groups in exp. 1 which treatments were begun when the larger follicle of the induced follicular wave achieved 13mm and at D6, respectively, promoted the growth of F3 until a maximum diameter similar to the referred F2. The same was not observed when treatment started at the moment the larger follicle of the induced follicular wave reached 20mm. This indicated that a better F3 response was obtained starting pFSH treatment when the larger

follicle of the induced wave achieved $\geq 13\text{mm}$, in other words, at the beginning of reduction in FSH blood concentrations by the liberation of inhibin by follicles, as has been described [17, 18, 19, 20, 21].

In the control group of exp. 1, maximum diameter achieved by F3 was similar to F2, probably because of a high variety in diameter observed in F2s (10 to 37.5mm) as in F3s (8 to 20mm). In the non-ablation group, which the treatment was began at D6, similar results were obtained, in other words, at the beginning of diestrous when the majority of mares showed follicles with small diameter. Similar results were seen in exp. 3, as F3 had similar growth to F2 within the 25 or 50mg pFSH treated groups. F3 of EPE-D6 group was smaller than F2, fact attributed to a higher number of double ovulations which increased the F2 diameter making it similar to F1.

In the present study, in the non-ablation groups (pFSH-D6 from exp. 1 and all groups from exp. 3), the number of mares which had follicles $\geq 25\text{mm}$ at beginning of treatment did not differed statistically, however, the ones of which showed this category of follicles demonstrated an interference in ovulatory response as all of them did not have more than one ovulation per cycle. In these groups, superovulatory treatments was started at a specific day of the cycle (D6) independent of follicular population or diameter detected at this moment. Dippert et al. (1994), when making a comparison between ovarian status at the beginning of treatment and the response indicated that better response was achieved when larger follicles ($\geq 20\text{mm}$) were not present at the onset of treatment. By this way, studies commended the beginning of treatment between days five and seven post-ovulation [23, 2] to avoid the presence of dominant follicles.

However, in cases mares show primary and secondary follicular waves, emergence of a wave might happen at the end of previous estrous allowing dominant follicles to be present at the beginning of diestrous, this fact was seen in some of the mares in this study. So, Orlandi et al. (2006) commended the diameter of the larger growing follicle to determine the best moment to start

a superovulatory treatment and demonstrated that the best ovulatory response occurred when starting treatment at the moment the larger follicle achieved 20-23mm. In other words, immediately before or during the expected moment of follicular deviation avoiding, by this way, the negative influence of the dominant follicle over the smaller follicles at the same time that allowed reduction in treatment time. Findings in the literature reinforce these facts as demonstrating that the follicle is capable to become dominant from the common follicular growth phase until deviation in cases of mechanical elimination of the inhibitory effect of the major follicles over the subordinates, but incapable to return to growth once irreversibly destined to become subordinate [17].

Results found for number of follicles between 25-29mm, ≥ 30 mm e maximum diameter achieved by the three largest follicles justified the results encountered for number of ovulations and recovered embryos, as only the follicles which achieved diameter higher than 25mm ovulated.

Number of ovulations (2.14 ± 0.4) in EPE-D6 group was inferior to reported values by Scoggin et al. [2002 (3.4 ± 0.8)]. However, similar to Orlandi et al. (2006) which obtained 1.99 ± 0.21 in mares treated with 12.5mg of EPE. Mean number of ovulations after treatment with EPE was statistically superior to treated groups with 25 and 50mg of pFSH agreeing with previous findings described by Squires et al. (1986).

In exp. 3, mean number of ovulations of control groups (1.33 ± 0.2) was similar to all groups and it was verified that in treated groups with pFSH only one ovulation was detected per mare. In control groups, double ovulations was observed detailing that high indices of spontaneous double ovulations in warmblood mares, as described in the literature [11, 12, 13, 14, 15]. The number of ovulations was reflected in the number of recovered embryos, which was also similar between control and EPE-D6 groups.

Treatments with pFSH was not capable of fomenting an significant increase in ovulation number and recovered embryos in none of the three experiments developed independent of the

chosen breed. The literature demonstrate that studies using pFSH doses from 8 to 100mg [7, 9] achieved an unsatisfactory increase in ovulations in treated animals. However, Krekeler et al. (2006), when treating warmblood mares with 25mg of pFSH twice daily obtained 2.28 ovulations per cycle, showing an efficiency of pFSH on promoting double ovulations, which was not observed in the present study and other cited literatures. Also, the good response obtained by Krekeler et al. (2006) was not justified in its study, been contradictory to this and other studies findings.

Mean number of recovered embryos per mare in EPE-D6 group (1.6 ± 0.5) was higher than the reported by Dippert et al. (1994) which obtained 1.2 embryos per mare when using treatments with 25mg of EPE twice daily. Orlandi et al. (2006) also obtained an embryonary recovery lower than EPE-D6 group in the present study when using the same dose of EPE and starting treatment when the largest follicle achieved ≥ 13 and ≥ 26 mm, being its higher mean of embryonary recover when treatment was started at the moment the largest follicle achieved ≥ 20 mm (1.41). Scoggin et al. (2002) and Rosas et al. (1998) reported an embryo recover of 2.6 and 2.0 per mare, respectively, using the same dose and treatment protocol with EPE as used in the present study. Statistical difference was detected for treatment time in exp. 1, demonstrating that pFSH-F20 group needed a lower number of days to the largest follicle(s) to achieve 32mm, moment when the stimulation was stopped. However, ovarian response was not satisfactory with the use of pFSH, possibly because the mares did not show a consistent answer to the used hormonal preparation used and not necessarily because of the moment of the treatment was started, as other authors [24, 25] have reported promising results beginning treatment when follicles between 20 and 23mm are detected.

In relation to treatment days, it was observed an individual big variation, especially in the groups when follicular emergence was not induced. In one mare in the EPE-D6 group (exp. 3) and other from pFSH-D6 group (exp. 1), showed one or two days of treatment, respectively, which is explained by the presence of a dominant follicle from a secondary follicular wave.

Reduction in necessary time for superovulatory treatment realization is of big practical value to shorter necessary treatment time of labouring service and reduction of treatment cost, for providing an lower total dose used. For this reason, studies have been done with the intent of determining the best moment for starting the stimulation culminating on a short treatment time and satisfactory ovarian response [22, 24].

Development of three larger follicles daily ultrasonographically followed in exp. 1 and 2 and two major follicles of exp. 3 showed a moment effect. This finding is expected independent of the application or not of a superovulatory treatment as the followed follicles were known to be growing and, consequently, their diameters daily increase. However, daily follicular growth rate was similar between groups. Only the related F3 development in pFSH-F13 in exp. 2 showed a group effect for have demonstrated a different profile in comparison to control. Maximum diameter of F3 in group pFSH-F13 was larger than F3 of control group and similar to F2 of the same group as a consequence of this effect. This fact shows a better response of F3 of mares treated with 50mg of pFSH, the same was not observed in exp. 3. Between F3s of groups in exp. 3 were not detected any type of effect because few follicles developed during the ultrasonographic evaluations and only two mares showed more than two ovulations.

Low response of mares to pFSH, independent of used dose or horse breed, probably is related to hormonal specificity and maybe a reduced affinity of this hormone with the equine follicular receptors have interfered on the response. FSH belongs to the glycoprotein family composed noncovalently associated α and β subunits [27]. It is the β -subunit that determines the receptor bindings specificity [28, 29] and, consequently, the biological response.

Results obtained by Krekeler et al. (2006) which used doses of 10 and 25mg of pFSH in warmblood mares were not possible to be repeated in the present study where it was observed similar results to the results that had been previously published [6,7].

In conclusion, the pFSH treatment in the used doses, 25 and 50mg, started at a specific day of the cycle or at specific moments of the follicular development were not satisfactory and consistent to justify the use of this product for increasing ovulatory response in mares. However, the beginning of treatment when the largest follicle achieved $\geq 20\text{mm}$ allowed a reduction in necessary time of treatment. And, finally, the use of EPE demonstrated a better ovulatory response in mares when compared to pFSH.

Acknowledgements

The authors wish to thanks for Bioniche Animal Healthy for providing Folltropin-V[®], FAPESP for affording the project and APTA for providing part of the mares used in this study.

References

- [1] Alvarenga, MA, McCue, PM, Squires, EL, Neves Neto JR. Improvement of ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. *Theriogenology* 2001; 56: 879-887.
- [2] Scoggin CF, Meira C, McCue PM, Carnavale EM, Nett TM, Squires EL. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology* 2002; 58: 1: 151-164.
- [3] Welch SA, Denniston DJ, Hudson JJ, Bruemmer JE, McCue PM, Squires EL. Exogenous eFSH, Follicle Coasting, and hCG as a novel superovulation regimen in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 2006; June: 262-270.
- [4] Logan NL, McCue PM, Alonso MA, Squires EL. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. *Animal Reproduction Science* 2007; 102: 48-55.
- [5] Jennings MW, Boine I, Daphna-Iken D, Jablonka-Shariff A, Conley AJ, Colgin M, Bidstrup, Meyers-Brown, Famula TR, Roser JF. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (eFSH) to promote follicular growth in mares using follicular suppression model. *Animal Reproduction Science* 2009; “in press”.

[6] Squires EL, Garcia MC, Ginther OJ, Voss JL, Seidel GE Jr. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulation hormone for superovulating mares. *Theriogenology* 1986; 26: 661-670.

[7] Fortune JE, Kmminch TL. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. *Equine Veterinary Journal* 1983; Suppl: 95-98.

[8] Irvine CHG. Endocrinology of the estrous cycle of the mare: applications to embryo transfer. *Theriogenology* 1981; 15: 85-104.

[9] Brück I, Synnestvedt B, Greve T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 1997; 47: 1157-1167.

[10] Krekeler N, Hollinshead FK, Fortier LA, Volkmann DH. Improved ovulation and embryo recovery rates in mares treated with porcine FSH. *Theriogenology* 2006; 66: 663-664.

[11] Ginther OJ, Douglas RH, Lawrence JR. Twinning in mares: A survey of veterinarians and analyses of theriogenology records. *Theriogenology* 1982; 18(3): 333-347.

[12] Squires EL, McClain MG, Ginther OJ, McKinnon AO. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. *Theriogenology* 1987; 28: 609-613.

[13] Davies Morel MCG, O'Sullivan JAM. Ovulation rate and distribution in the thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age. *Animal Reproduction Science* 2002; 66: 59-70.

[14] Perkins NR, Grimmett JB. Pregnancy and twinning rates in Thoroughbred mares following the administration of human chorionic gonadotropin (hCG). *New Zealand Veterinary Journal* 2001; 49(3): 94-100.

[15] Newcomb JR, England GCW. Embryonic development in quadruplet equine pregnancies. *The Veterinary Record* 2002; August: 214-215.

[16] Guilou F, Combarous Y. Purification of equine gonadotrophins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1983; 755: 229-236.

[17] Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biology of Reproduction* 1999; 64: 724-630.

[18] Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 31-39.

[19] Bergfelt DR, Gastal EL, Ginther OJ. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced hormone during follicle deviation in mares. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 426-432.

[20] Donadeu FX, Ginther OJ. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. *Reproduction* 2001; 121: 897-903.

[21] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction* 2005; 73: 315-323.

[22] Dippert KD, Hofferer S, Palmer E, Jasko DJ, Squires EL. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. *Theriogenology* 1992; 38: 695-710.

[23] Niswender KD, Alvarenga MA, McCue, P.M., Hardy, Q.P., Squires, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *Journal of Equine Veterinary Science* 2003; 23: 497-500.

[24] Orlandi C, Bergfelt DR, Wechsler FS, Nogueira GP, Puoli Filho JNP, Meira C. Resposta ovariana durante a superovulação precedida pela emergência da onda folicular induzida por aspiração dos folículos em éguas cíclicas. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34 (suppl. 1): 278.

[25] Dippert, K.D., Jasko, D.J., Seidel, G.E., Squires, E.L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. *Theriogenology* 1994; 41: 1411-1423.

[26] Rosas, C.A., Alberio, R.H., Baraño, J.L., Agüero, A., Chavesm M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Theriogenology* 1998; 49: 1257-1264.

[27] Pierse JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50: 465-495.

[28] Combarrous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews* 1992; 13: 670-691.

[29] Moyle WR, Campbell RK, Myers RV, Bernard MP, Han Y, Wang X. Co-evolution of ligand-receptor pairs. *Nature* 1994; 368: 251-255.

Table 1 – Distribution of the animals through groups, used doses and beginning of treatment moment of experiments 1, 2 and 3.

Experiment 1					Experiment 2				Experiment 3					
Groups	n	Dose	Start		Groups	n	Dose	Start		Groups	n	Dose	Start	
			Day	Fol.				Fol.	Day					
													(D0=ov.)	size
Control	7	Saline	-	≥13mm	Control	10	Saline	≥13mm		Control	7	Saline	6	
pFSH-F13	7	25mg	-	≥13mm	pFSH-F13	7	50mg	≥13mm		pFSH-D6	7	25mg	6	
pFSH-F20	7	25mg	-	≥20mm						EPE-D6	7	12.5mg	6	
pFSH-D6	7	25mg	6	-						50pFSH-D6	5	50mg	6	

Table 2 - Mean $\pm$ SE of follicles between 25-29mm and follicles ≥ 30 mm at ovulation induction moment, maximum diameter achieved by F1, F2 and F3 (mm), ovulations per mare, embryos per mare, embryos per ovulation, days between the beginning of treatment to the day of ovulation detection and days of treatment of experiments (variation below) 1, 2 and 3.

	Experiment 1				Experiment 2			
	Control	pFSH-F13	pFSH-F20	pFSH-D6	Control	pFSH-F13	Control	pFSH-D6
Fol 25-29	0.3 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0
Fol ≥ 30	1.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1
M.D. F1	37.4 $\pm$ 0.7 ^A	38.9 $\pm$ 1.5 ^A	38.6 $\pm$ 0.9 ^A	37.4 $\pm$ 0.9 ^A	37.8 $\pm$ 0.6 ^A	37.5 $\pm$ 0.9 ^A	37.7 $\pm$ 0.7 ^A	38.6 $\pm$ 0.7 ^A
M.D. F2	23.0 $\pm$ 3.1 ^B	27.3 $\pm$ 3.0 ^B	24.9 $\pm$ 1.9 ^B	25.4 $\pm$ 3.1 ^B	24.9 $\pm$ 2.6 ^B	27.2 $\pm$ 1.8 ^B	28.7 $\pm$ 2.0 ^B	24.6 $\pm$ 2.3 ^B
M.D. F3	15.8 $\pm$ 1.8 ^B	20.9 $\pm$ 2.4 ^B	18.9 $\pm$ 0.9 ^C	18.1 $\pm$ 2.1 ^B	15.7 $\pm$ 1.6 ^{Cb}	23.0 $\pm$ 1.2 ^{Ba}	21.3 $\pm$ 0.5 ^C	20.3 $\pm$ 0.6 ^B
Ov./égua	1.14 $\pm$ 0.1	1.57 $\pm$ 0.2	1.14 $\pm$ 0.1	1.14 $\pm$ 0.1	1.20 $\pm$ 0.1	1.29 $\pm$ 0.2	1.33 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.0 ^b
Emb./égua	0.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0
Emb./ov.(%)	50.0	36.4	62.5	75.0	41.7	33.3	75.0	100.0
Treat.-ov.	8.3 $\pm$ 0.5 ^a	8.9 $\pm$ 0.6 ^{ab}	6.4 $\pm$ 0.2 ^b	9.1 $\pm$ 2.9 ^a	8.6 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 0.6
Treat. days	5.9 $\pm$ 0.3 ^a (5-7)	6.3 $\pm$ 0.5 ^a (5-8)	3.9 $\pm$ 0.4 ^b (2-5)	6.7 $\pm$ 0.9 ^a (2-9)	5.8 $\pm$ 0.2 (5-7)	5.6 $\pm$ 0.4 (4-7)	5.5 $\pm$ 0.6 (4-8)	4.7 $\pm$ 0.4 (3-6)

Capital letters compare data within the same column

Small letters compare data within the same row

Absence of letters indicate similarity

* Tendency

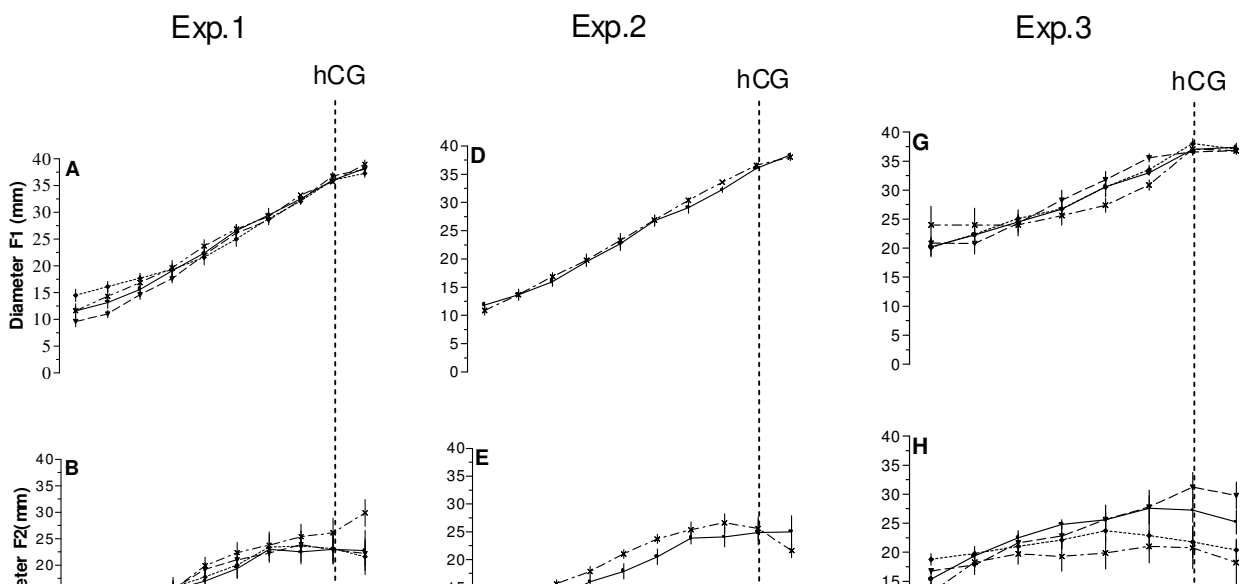


Figure 1 – Mean daily follicular development of F1, F2 and F3 of each group in experiments 1, 2 and 3. The line indicates the moment of hCG application or D0. $P < 0.05$ for moment effect on graphs A, B, C, D, E, F, G and H. $P < 0.05$ for group effect on graph F.

Anexo

Anexo 1

Normas de Publicação da revista

Theriogenology

ISSN: 0093-691X

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts that do not meet acceptable standards will be returned to the authors. Prior to submission, manuscripts should be reviewed by someone with in-depth knowledge of scientific style and English grammar, syntax, semantics and spelling (contact the Editors for a list of persons providing this service). Manuscripts should be written in clear, concise and grammatically correct English and formatted according to the instructions listed below (also consult additional notes regarding style at the end of this document).).
2. Pages must be numbered at the bottom right corner and each line must be numbered on the left side.
3. Every page of the manuscript (including abstracts, footnotes and references) must be doubled-spaced, all margins <2.5 cm, and text left justified.

4. Starting with the Introduction, sections are to be numbered (1. Introduction); subordinate numbering is allowed (e.g. 1.1.), to a maximum of about four levels (1.1.1.1.).

5. Titles and subtitles should be typed on a separate line, without indentation. Capitalize only the first letter of the first word of the title and all subtitles. Leave one blank line before the first paragraph and after the last paragraph of a section, and indent each paragraph.

6. Manuscripts must be organized as follows (may be modified for Review Articles or Technical Notes, after consultation with the Editor):

Title Page (to include):

- Title, which should be clear, descriptive, not too long, with minimal abbreviations or commercial names (capitalize only the first letter of the first word)
 - Initials, surnames and professional affiliations of all author(s)
 - Current and complete postal addresses of all authors and affiliate institutions
- Corresponding Author with complete contact information including mailing address, complete telephone and fax numbers, and e-mail address

Abstract: on a separate page, not to exceed 250 words. The abstract should include the objective, main findings (including means and probability values, as appropriate), and primary conclusion(s) of the paper.

Five keywords (indexing terms): capitalize the first letter of each word or term and separate successive items with a semicolon. Authors are encouraged to consult a standard list of reference terms (e.g., <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Introduction: should provide a brief context for the research. There should be three parts: a clear, brief description of the nature and extent of the problem; a brief review of the essential literature; and a statement of how the present study challenges, expands or improves existing knowledge. The final paragraph should include the hypothesis or objective(s), but should not include a summary of the findings of the current study.

Materials and Methods: : must contain enough information to allow a competent worker to duplicate the study. Materials and equipment should be named specifically, including the manufacturer/supplier, city, state/province (if applicable) and country. Descriptions of animals should include species, breed, sex, and age as well as (if appropriate) husbandry methods, climate, photoperiod, and geographic location. Experimental methods (including the experimental design) should be comprehensive and logical. The method of statistical evaluation must be clearly described (cite the software used). Indicate treatment and response variables, main effects and interactions, define experimental units and how they were allocated into groups.

Results: : should fully describe the outcome, including all information described as collected in Materials and Methods. The use of tables and figures is encouraged, especially for data that cannot be easily described in the text. Emphasize important points in the text, but do not excessively repeat

data in tables and figures. Avoid discussion and interpretation of the data in the Results section.

Discussion: includes principles, relationships, and general truths. First refer to the outcome of the present study, indicate how it is similar or different to that previously reported, and discuss your interpretation of the state of knowledge in the area. Theoretical or practical implications of the work should be discussed, and suggestions made regarding future studies. Major conclusions and implications should be stated in a brief, final paragraph.

Acknowledgements: cite sources of funds, materials and assistance.

References: follow style noted below.

Tables: follow guidelines noted below.

Figure Legends: should not be excessively long and detailed but should provide sufficient context that the figure can be interpreted in the absence of the rest of the paper.

Tables

1. All tables should be referred to by consecutive Arabic numerals (e.g., Table 1) in the order in which they are first cited.
2. Avoid excessively large tables and those without no or few significant differences.
3. Each table should be on a separate page (at the end of the manuscript).
4. Each table should have a brief, self-explanatory title.
5. Column headings should be brief, self-explanatory and have minimal repetition. Standard abbreviations of units of measurement should be enclosed within parentheses. For column and row headings, capitalize only the first letter of the first word.
6. Vertical lines should not be used to separate columns (leave extra space between columns).
7. Information essential to interpreting the table should appear as a footnote below the table.

Illustrations

1. All illustrations should be referred to by consecutive Arabic numerals (e.g., Fig. 1).
2. Units should be indicated in the figures.
3. Each illustration should be identified by its number. An indication of the top of the illustrations is required in all cases where it is not immediately apparent.
4. Illustrations should be consistent with the layout and size of the journal page (illustrations can be placed in a single column or across the entire page). Illustrations should be large enough to allow a reduction of 50%.

5. Ensure that the lettering is big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal. Capitalize only the first letter of the first word of all axis labels.
6. Use bar scales on all illustrations (instead of numerical scales that must be changed with reduction).
7. Each illustration should have a caption (typed on a separate sheet).
8. Explanations should be given in the legend. Text in the illustrations should be kept to a minimum.
9. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.
10. If you submit usable color figures, Elsevier will ensure that they appear free-of-charge in color in the electronic version of your paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. Color illustrations can only be included in print if the author agrees to pay for their publication. Technical complications may arise during conversion of color figures to `grey scale' (for the printed version); therefore, submit appropriate black and white prints corresponding to all color illustrations.
11. Information regarding preparation of illustrations is available online on Elsevier's Authors' Home: ( <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>).

References

1. All references cited in the text should be listed in a References section (after Acknowledgements). Ensure there is complete agreement between references cited in the text and those listed in the References section and that all information in the References section is accurate and complete.
2. References in the text should be indicated by Arabic numerals in brackets (with multiple citations separated by a comma and no space between the comma and the next citation); three or more consecutive citations should be separated by a hyphen, i.e. [1,2] [1-3] [1-3,5].
3. In the Reference section, references must be listed in numerical (NOT alphabetical) order, with reference number enclosed in brackets. References should use the following style:

a. For periodicals

Connor EE, Ashwell MS, Dahl GE. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22:189-200.

b. For books

Betteridge KJ. Embryo Transfer. In: *Reproduction in Domesticated Animals*, King GJ (Ed.), World Animal Science B9, Elsevier B.V., 1993, pp. 413-418.

c. For multi-author books

Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. *Principles of Laboratory Animal Science*, Revised Edition. Elsevier B.V., 2001.

4. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources (published annually by BIOSIS). The correct abbreviation for this journal is: *Theriogenology*.

5. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
6. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". 1.
7. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.