

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS VISANDO
INDUZIR E SINCRONIZAR A OVULAÇÃO EM ÉGUAS**

GABRIEL MAKSOU D GRECO

Botucatu – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS VISANDO
INDUZIR E SINCRONIZAR A OVULAÇÃO EM ÉGUAS**

GABRIEL MAKSOUND GRECO

Monografia apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu para obtenção do título de
Mestre em Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. Marco Antônio Alvarenga

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

Greco, Gabriel Maksoud.

Avaliação de novos protocolos visando induzir e sincronizar a ovulação em éguas / Gabriel Maksoud Greco. - Botucatu, 2010

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

Orientador: Marco Antônio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Égua. 2. Reprodução animal. 3. Ovulação.

Palavras-chave: Deslorelina; ECP; Égua; hCG; Ovulação.

Nome do autor: Gabriel Maksoud Greco

Título: AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS VISANDO INDUZIR E
SINCRONIZAR A OVULAÇÃO EM ÉGUAS

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva
Membro
Departamento de Zootecnia
FZEA – USP – Pirassununga

Data da Defesa: 30 de Agosto de 2010.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por todo apoio.

Agradeço a Deus e a todos que auxiliaram direta ou indiretamente em minha recuperação, a qual, Deus me perdoe, acreditei em alguns momentos ser impossível.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, pela confiança e orientação e ao Dr. José Dell'aqua Júnior, pela ajuda durante a reta final do experimento. A todos aqueles, membros ou não de nosso Departamento, que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste Mestrado, meus agradecimentos.

Aos laboratórios Hertape Calier e Pfizer pelo auxílio à pesquisa através dos medicamentos doados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado, sem a qual, dificilmente teria realizado este experimento.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Porcentagem (%) de éguas que ovularam entre 24 e 48 horas após a indução de ovulação dentro dos grupos estudados 25
- Tabela 2 – Média e desvio padrão do grau de edema endometrial visualizado ultra-sonograficamente no momento da indução (Hora 0) e no dia seguinte (Hora 24) dentro dos grupos estudados 27
- Tabela 3 – Média e desvio padrão do grau de edema endometrial visualizado ultra-sonograficamente no momento da indução (Hora 0), um dia antes da ovulação (D-1) e no dia da ovulação (D0) dentro dos grupos estudados 28
- Tabela 4 – Média e desvio padrão do diâmetro folicular no momento da indução (Hora 0) e no dia seguinte (Hora 24) dentro dos grupos estudados 29
- Tabela 5 – Média e desvio padrão do diâmetro folicular no momento da indução (Hora 0) e um dia antes da ovulação (D-1) dentro dos grupos estudados 30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem (%) de éguas em que a ovulação foi detectada 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a indução de ovulação dentro dos grupos estudados	26
---	----

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Ciclo estral eqüino.....	7
2.2 Recrutamento, seleção folicular e ovulação.....	7
2.3 Características ultra-sonográficas que indicam proximidade da ovulação	10
2.4 Agentes indutores de ovulação.....	12
2.4.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG).....	13
2.4.2 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos....	16
2.4.3 Associações de hCG e análogos de GnRH.....	17
2.4.4 Estrógenos.....	18
2.4.5 Outros indutores de ovulação.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	22
4.1 Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultra-sonográficos....	22
4.2 Grupos e análise estatística.....	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Taxa de ovulação entre 24 e 48 horas após a indução.....	25
5.2 Edema endometrial.....	26
5.3 Taxa de desenvolvimento folicular.....	28
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	39
8. BIBLIOGRAFIA.....	40
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	53

GRECO, G.M. **Avaliação de novos protocolos visando induzir e sincronizar a ovulação em éguas**. Botucatu, 2010. 76p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

Os agentes indutores de ovulação são rotineiramente utilizados na reprodução equina, em especial quando da aplicação de biotecnologias. A fim de reduzir custos e otimizar seus resultados, esta dissertação teve como objetivos avaliar o efeito de novos protocolos sobre a indução e sincronização de ovulação, grau de edema endometrial, bem como taxa de desenvolvimento e diâmetro folicular. Foram utilizadas 145 éguas da raça Campolina, entre três e 14 anos, em dois Haras de Conselheiro Lafaiete – MG, Brasil. Na presença de um folículo $\geq 30\text{mm}$ e de edema endometrial, no mínimo, grau 2 (0-5), as éguas foram randomicamente separadas em grupos e tratadas no dia seguinte (Hora 0) com: 1,0mg de deslorelina (I.M.) (G1; n=20); 0,5mg de deslorelina (I.M.) (G2; n=20); 2.000UI de hCG (I.V.) (G3; n=20); 750UI de hCG (I.V.) (G4; n=20); 1,0mg de deslorelina (I.M.) e 2.000UI de hCG (I.V.) (G5; n=15); 0,5mg de deslorelina (I.M.) e 750UI de hCG (I.V.) (G6; n=10); 10,0mg de ECP (I.M.) (G7; n=10) e, por fim, 1,0mg de deslorelina (I.M.), após pré-tratamento com 10,0mg de ECP (I.M.) no dia anterior (G8; n=10). Vinte éguas não foram tratadas, utilizadas como controle (GC; n=20). As avaliações ultra-sonográficas diárias foram conduzidas até a ovulação (D0) ou Hora 120, o que ocorresse primeiro. A análise estatística valeu-se do Statistical Analysis System (SAS). A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas da indução nos grupos G1 ao G6 foi similar estatisticamente, maior ou igual a 75%. No G7, esta foi de 20%, inferior ($P < 0,01$) à obtida no G1 ao G6. Verificou-se taxa de 40% no G8, menor ($P < 0,01$) que a do G5 e G6 (de 100%) e similar aos demais. O ECP não foi capaz de induzir ou sincronizar as ovulações. Não houve benefício do pré-tratamento com ECP em éguas induzidas com deslorelina. O edema endometrial foi maior na Hora 0 em comparação ao momento em que a ovulação foi detectada, quando o G1 ao G6 apresentaram maior grau de edema endometrial ($P < 0,01$) em relação ao GC. Nenhum protocolo interferiu no

desenvolvimento folicular nas primeiras 24 horas, sendo estas taxas estatisticamente semelhantes. Nos grupos tratados, o diâmetro folicular pré-ovulatório foi menor, com exceção do G7. Observou-se no GC um aumento ($P < 0,05$) no diâmetro folicular somente até dois dias antes da ovulação.

Palavras-chave: Égua; Ovulação; hCG; Deslorelina; ECP.

GRECO, G.M. **Evaluation of new protocols to induce and synchronize ovulations in mares.** Botucatu, 2010. 76p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Ovulation inductors are routinely used in the equine species, especially when modern reproductive technologies are applied. In order to reduce costs and optimize their results, the present study aimed to evaluate the effect of new treatment protocols on ovulation induction and synchronization, endometrial edema as well as follicular diameter and development rate. One hundred and forty-five Campolina breed mares, aging three to 14 years, from two Studs in Conselheiro Lafaiete – MG, Brazil, were used. Prostaglandin-induced estrous mares showing one follicle ≥ 30 mm and at least grade 2 (0-5) endometrial edema were randomly assigned to different groups and treated, at the following day (Hour 0), with either: 1.0mg of deslorelin (I.M.) (G1; n=20); 0.5mg of deslorelin (I.M.) (G2; n=20); 2.000UI of hCG (I.V.) (G3; n=20); 750UI of hCG (I.V.) (G4; n=20); 1.0mg of deslorelin (I.M.) and 2.000UI of hCG (I.V.) (G5; n=15); 0.5mg of deslorelin (I.M.) and 750UI of hCG (I.V.) (G6; n=10); 10.0mg of ECP (I.M.) (G7; n=10) and 1.0mg of deslorelin (I.M.), 24 hours post-injection with 10.0mg of ECP (I.M.) (G8; n=10). Twenty mares served as control (GC; n=20). Ultra-sonography was daily performed until ovulation (D0) or Hour 120, whichever occurred first. Data was evaluated through the Statistical Analysis System (SAS). Ovulation rate between 24 and 48 hours post-induction in groups G1 to G6 was $\geq 75\%$ and statistically similar ($P > 0.05$). Ovulation rate in G7 was 20%, lower ($P < 0.01$) than in G1 to G6. G8 showed a 40% rate, which was lower ($P < 0.01$) than G5 and G6 and similar to the remaining groups. ECP treatment was unable to induce or synchronize ovulations. Deslorelin-induced mares did not benefit from pre-treatment with ECP. Higher endometrial edema scores were identified at Hour 0 compared to the moment an ovulation was detected, when G1 to G6 showed higher ($P < 0.01$) edema scores than control. Used protocols did not prevent follicular development during the first 24 hours post-induction. This finding was similar among groups. Induced mares ovulated

from smaller follicles, except for G7. Follicle diameter only increased ($P<0.05$) in control until two days before ovulation.

Key-words: Mare; Ovulation; hCG; Deslorelin; ECP.

1. INTRODUÇÃO

A eqüideocultura representa uma parcela significativa da economia brasileira. Neste âmbito, algumas biotecnologias tornaram-se freqüentes em grande parte dos criatórios de cavalos. Estima-se que cerca de 3.650 embriões eqüinos foram transferidos com sucesso no ano de 2003 no Brasil (THIBIER, 2004) e que este número tenha atingido a marca de 10.000 em 2008 (PESSOA et al., 2009).

A duração do estro e o intervalo entre o seu início e a ovulação variam muito na espécie eqüina (GINTHER et al., 1972). Estimar com precisão o momento ovulatório em eqüinos é uma tarefa complicada, porém necessária, já que maiores taxas de concepção são obtidas quando o sêmen é depositado no trato reprodutivo da égua próximo à ovulação (WOODS et al., 1990). Para reduzir o número de coberturas ou inseminações artificiais por ciclo estral, existem relatos do uso de agentes indutores de ovulação há mais de quatro décadas (LOY e HUGHES, 1966).

Conforme McCue (2003), a indução da ovulação é um procedimento rotineiro em casos onde o sêmen que se pretende utilizar é limitado, por exemplo, de um garanhão muito requisitado ou em éguas apresentando endometrite pós-cobertura, onde se deseja uma única inseminação por cio. Este autor destaca a importância de se induzir a ovulação em éguas inseminadas com sêmen transportado sob refrigeração ou congelado. Para que resultados satisfatórios sejam obtidos com sêmen eqüino submetido à congelação, cujos espermatozóides possuem menor longevidade, recomenda-se realizar a inseminação dentro de 12 horas antes da ovulação ou em até seis horas após sua ocorrência (LOOMIS e SQUIRES, 2005). Quanto à atuação do Médico Veterinário, induzir e sincronizar as ovulações permite que se planeje e agende avaliações reprodutivas, reduzindo a mão-de-obra despendida. Para isto, cada agente indutor, dose, ou associação de hormônios deve estimular uma porcentagem considerável de éguas a ovularem dentro de um período previsto.

Especialmente interessante na transferência de embriões (TE) é a forma como os agentes indutores facilitam a sincronização das ovulações (McCUE,

2003), já que maiores taxas de gestação são obtidas quando as éguas receptoras ovulam um dia antes ou até três dias após as doadoras (McKINNON et al., 1988). Medicamentos objetivando induzir e sincronizar as ovulações são usualmente utilizados em éguas que se prestam à doação de embriões (ALLEN, 2005) - em especial quando estes serão criopreservados (CARNEVALE et al., 2004) - ou de oócitos (MACLELLAN et al., 2002). Estes hormônios estão presentes, também, nos protocolos de superovulação em éguas (ALVARENGA et al., 2001; NISWENDER et al., 2003). Não obstante, o uso de indutores de ovulação está associado a uma maior incidência de duplas ovulações (VERONESI et al., 2003), favorecendo a recuperação embrionária em programas de TE.

Em resumo, os protocolos de indução atualmente utilizados na espécie eqüina possuem como limitações o seu custo, bem como, em algumas situações, resultados insatisfatórios quanto à indução e sincronização das ovulações. O presente estudo tem como objetivos investigar a eficácia de novos protocolos de indução de ovulação, sendo proposto o uso de cipionato de estradiol e da associação de deslorelina e hCG nas doses convencionais ou em sub-doses.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral eqüino

As éguas são animais poliéstricos sazonais cujos ciclos duram em média 22 dias. O ciclo estral eqüino pode ser dividido em duas fases distintas: o estro e o diestro (HUGHES et al., 1972; SHARP, 1980). Durante o estro, a égua apresenta-se receptiva ao garanhão devido ao predomínio do estrogênio (CLAYTON et al., 1981), secretado pelas células da granulosa folicular. Esta fase termina com a ovulação e apresenta duração muito variável; compreende em média sete dias, podendo durar de dois a 14 dias (McCUE, 2003). Após o fim do estro, a égua ainda pode demonstrar sinais de receptividade sexual passadas 12 a 84 horas da ovulação (McCUE, 2003).

Já a fase seguinte, denominada de fase luteal ou diestro, possui um período mais definido de 15 dias em média. Caracteriza-se pela presença de um corpo lúteo, que se forma de uma ovulação (BACK et al., 1974). Desta é liberado o oócito, o qual é captado pela tuba uterina. No diestro ocorre a produção de progesterona. Mesmo na presença de folículos em desenvolvimento secretando estrogênio, há predomínio desse progestágeno, o qual imprime suas características sobre o trato reprodutivo feminino e no comportamento da égua de rejeição ao garanhão (SAMPER, 2008). Em suma, a duração média do estro, diestro e do ciclo estral é de respectivamente sete, 15 e 22 dias nas éguas e oito, 16 e 24 dias em pôneis (GINTHER, 1992).

A fase luteal termina com a regressão do corpo lúteo, ou luteólise. Esta é desencadeada pela liberação de prostaglandina pelo endométrio eqüino, a qual é carregada até o ovário mediante a circulação sistêmica (GINTHER e FIRST, 1971). O prolongamento da fase luteal ou bloqueio da luteólise ocorre pela presença de um concepto, através de sua migração pelo útero eqüino (ALLEN, 2005).

2.2 Recrutamento, seleção folicular e ovulação

Para que um folículo antral inicial continue seu crescimento, deve ocorrer uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH (FORTUNE, 1994). O

FSH estimula o crescimento em sincronia dos folículos recrutados, originando ondas foliculares que caracterizam a fase final de seu desenvolvimento. Flutuações nas concentrações plasmáticas de FSH são detectadas junto à emergência destas ondas (ADAMS et al., 1992; BERGFELT e GINTHER, 1992).

Os níveis elevados de FSH circulante levam a um aumento da proteína-A plasmática associada à prenhez (PAPP-A), protease folicular que cliva as proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) (SPICER et al., 2001). Desta forma, maiores concentrações livres do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) podem ser encontradas no interior do folículo, especialmente no que se tornará dominante (GINTHER et al., 2004). Quando livre, este fator estimula o crescimento da granulosa folicular e a produção de estrógeno em sinergismo com o FSH (HANDLER e AURICH, 2005).

A secreção de estradiol e de inibina pelos folículos em emergência acarreta no estabelecimento da dominância folicular. Através de “feedback” negativo, há redução nos níveis circulantes de FSH, insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (BERGFELT e GINTHER, 1986; TURZILLO e FORTUNE, 1990; DONADEU e GINTHER, 2001). Durante o recrutamento, o futuro folículo dominante é aquele cujo estágio de desenvolvimento está melhor sincronizado com o estímulo gonadotrófico, sendo refratário aos níveis decrescentes de FSH (FORTUNE, 1994), devido a um aumento na expressão de receptores para este hormônio (WEBB et al., 1999). Por sua vez, o LH é essencial ao participar da fase final do desenvolvimento e da seleção folicular, o que é evidenciado pela numerosa presença de receptores para este hormônio na granulosa de folículos dominantes antes da divergência (BODENSTEINER et al., 1996; GINTHER et al., 1996).

O LH é o hormônio responsável pela ovulação na espécie eqüina, ao reduzir o diâmetro dos vasos da teca e agir sobre a região do estigma do folículo dominante, induzindo a ativação de enzimas responsáveis pelo seu adelgaçamento (KÖNIG e PROBST, 2005). Suas concentrações plasmáticas são baixas passados seis a 15 dias da ovulação, em virtude do “feedback” negativo exercido no hipotálamo pela progesterona de origem lútea, que

suprime a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas, o GnRH (GINTHER, 1992).

A curva de LH é prolongada na espécie eqüina, recebendo a denominação de “plateau”. Ocorre no início do estro, seis a sete dias antes da ovulação e alcança o pico um a dois dias após sua ocorrência (WHITMORE et al., 1973). Estudos anteriores concluíram que o “plateau” ocorre pelo “feedback” positivo do estradiol (BURNS e DOUGLAS, 1981; THOMPSON et al., 1991), enquanto que outros afirmam que este hormônio esteróide interfere negativamente no LH, por seu incremento no momento em que a quantidade de estrógeno circulante começa a declinar (GINTHER et al., 2005; 2006b).

A ovulação é o fenômeno de liberação do oócito através do rompimento de um folículo ovariano, permitindo sua captação pela tuba uterina e subsequente fertilização (GINTHER, 1992). Os eqüinos são animais mono-ovulatórios; contudo, múltiplas ovulações podem ocorrer. Estas são comuns em determinadas raças, como o Campolina (GRECO et al., 2005) e o Brasileiro de Hipismo (CARMO et al., 2004), havendo predomínio das duplas ovulações. As ovulações múltiplas são desejáveis quando a égua em questão é uma doadora de embriões, pois o útero dos eqüídeos não comporta mais de um concepto simultaneamente (GINTHER e GRIFFIN, 1994).

Éguas com mais do que uma ovulação apresentam folículos pré-ovulatórios menores (GINTHER, 1992; GINTHER et al., 2008), bem como mudanças em seu perfil endócrino. Durante o estro, tanto o aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol (GINTHER et al., 2008, MACHADO et al., 2008, RAZ et al., 2009) e inibina (MACHADO et al., 2008), quanto reduções nas concentrações de FSH (GINTHER et al., 2008, MACHADO et al., 2008) foram detectadas em éguas apresentando ovulações duplas. Em éguas superovuladas com FSH eqüino purificado, Machado et al. (2008) verificaram drástica redução no LH durante o estro, enquanto Raz et al. (2009) observaram aumento nas concentrações de progesterona na fase lútea.

Falhas na ovulação podem ocorrer devido à hemorragia excessiva no interior de folículos dominantes pré-ovulatórios, com a formação de folículos hemorrágicos anovulatórios (GINTHER et al., 2007b), que impedem a liberação oocitária, e conseqüentemente, a fertilização. Apesar de sua pequena incidência, não se consegue distinguir, sem o uso de ultra-som Doppler, os

folículos que estarão fadados a se tornarem hemorrágicos anovulatórios (ACOSTA et al., 2004). Isto se deve ao fato de ambos apresentarem alterações ultra-sonográficas semelhantes na parede folicular e no padrão de edema endometrial até três dias antes da ovulação ou hemorragia excessiva (GINTHER et al., 2007b; CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2009).

Sabe-se que os folículos anovulatórios apresentam concentrações intra-foliculares inferiores de fatores de crescimento do tipo IGF (ACOSTA et al., 2004; WATSON et al., 2004), estradiol e inibina (WATSON et al., 2002; ACOSTA et al., 2004). Contudo, tanto em ondas foliculares em que não ocorre a formação de um folículo dominante, quanto naquelas onde se observam ovulações ou o desenvolvimento de folículos anovulatórios, as concentrações plasmáticas de FSH são semelhantes (DONADEU e GINTHER, 2002; 2003; 2004). Em contraste, Acosta et al. (2004) verificaram um aumento na concentração circulante de FSH durante o desenvolvimento de folículos hemorrágicos anovulatórios. Conforme estes autores, isto é consequência de um “feedback” negativo ineficiente, devido à menor produção de fatores foliculares inibitórios.

As concentrações plasmáticas de LH durante o desenvolvimento folicular inicial parecem influenciar a incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios. Contudo, tanto concentrações inferiores (ACOSTA et al., 2004) quanto superiores (GINTHER et al., 2008) de LH foram incriminadas como responsáveis pelo seu aparecimento.

2.3 Características ultra-sonográficas que indicam proximidade da ovulação

Um dos principais critérios a fim de determinar o momento da ovulação eqüina é o diâmetro do folículo dominante (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008), o qual é aferido considerando-se a média da máxima área transversal da altura e da largura folicular de uma simples imagem “congelada” no monitor do aparelho de ultra-som.

Conforme citado anteriormente, a maioria das éguas ovula horas antes do término dos sinais comportamentais de estro, quando o folículo dominante mede em torno de, no mínimo, 40 milímetros (mm) de diâmetro (PYCOCK,

2003). Algumas podem ovular com folículos de apenas 35mm, enquanto que outras só irão fazê-lo com estruturas ≥ 50 mm (SAMPER, 1997). Certas raças, como as de tração, ovulam normalmente com diâmetros superiores a 50mm (PYCOCK, 2003). De acordo com Pierson e Ginther (1985), a partir do momento em que um folículo de 30mm é identificado no ovário de uma determinada égua, esta pode ovular momentos ou até sete dias depois. O folículo pré-ovulatório cresce, em média, três milímetros por dia até dois dias antes da ovulação. A partir daí, permanece constante, sofrendo redução de dois a três milímetros em seu diâmetro nas últimas 12 horas (KOSKINEN et al., 1989).

No início da estação de monta, tanto a duração do estro quanto o diâmetro folicular à ovulação são maiores, possivelmente devido à menor quantidade de estímulo luminoso. Cuervo-Arango e Newcombe (2008) verificaram que o diâmetro do folículo pré-ovulatório eqüino tende a ser semelhante durante dois ciclos estrais espontâneos e consecutivos.

O edema endometrial é dependente dos níveis circulantes de estrógenos ovarianos (CHAVATTE e PALMER, 1998), podendo-se supor, desta maneira, a capacidade de um determinado folículo dominante em produzir estrogênio. Contudo, este edema somente é identificado quando as concentrações plasmáticas de progesterona estão baixas (SAMPER, 2008).

A avaliação do edema endometrial, visualizado através de exame ultrassonográfico do útero, é rotineiramente conduzida a fim de auxiliar na determinação do momento ideal para se inseminar uma égua (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008), pois sua intensidade diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (HAYES et al., 1985). Esta queda parece ocorrer por estímulo estrogênico aos receptores endometriais de progesterona (PELEHACH et al., 2000), os quais se ligam, durante o período pré-ovulatório, à progesterona de fonte intra-folicular decorrente de luteinização precoce (BELIN et al., 2000). Contudo, a diminuição gradativa do edema endometrial não é observada em todas as éguas, já que algumas podem ovular ainda que o apresentando, enquanto que em outras este não é visualizado durante o período pré-ovulatório (SAMPER, 1997). Da mesma forma que o diâmetro do folículo pré-ovulatório, as éguas tendem a demonstrar padrões similares de

edema endometrial durante dois ciclos estrais espontâneos e consecutivos (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

Outros parâmetros têm sido utilizados a fim de se estimar o momento ovulatório na espécie eqüina. Dentre eles, destacam-se a forma e a flutuação folicular, a ecogenicidade, espessura e a presença de edema na parede folicular, bem como a existência de partículas ecogênicas no fluído folicular (GASTAL et al., 1998; PYCOCK, 2003).

2.4 Agentes indutores de ovulação

Éguas dotadas de edema endometrial, cujo folículo dominante mede a partir de 30 a 35mm, são consideradas como candidatas ideais à indução de ovulação para fins de cobertura ou inseminação artificial (McCUE et al., 2002; McCUE et al., 2004; CARNEVALE et al., 2005). Alguns hormônios já foram utilizados com o objetivo de induzir e sincronizar ovulações na espécie eqüina, dentre eles a gonadotrofina coriônica humana (LOY e HUGHES, 1966; SULLIVAN et al., 1973; VOSS et al., 1975; McCUE et al., 2004), o GnRH (DUCHAMP et al., 1987; BECKER e JOHNSON, 1992) e seus análogos: deslorelina (McCUE et al., 2002; MELO et al., 2005) e busarelina (BARRIER-BATTUT et al., 2001), o extrato de pituitária eqüina (DUCHAMP et al., 1987; MELO et al., 2005) e o LH recombinante eqüino (YOON et al., 2007). Com o intuito de antecipar o início da estação de monta, ao induzir e acelerar a primeira ovulação de éguas transitórias, tanto o GnRH (JOHNSON, 1987; GINTHER e BERGFELT, 1990; HARRISON et al., 1990), como a deslorelina (McKINNON et al., 1997; RAZ et al., 2009) e a gonadotrofina coriônica humana (CARNEVALE et al., 1989; CUERVO-ARANGO e CLARK, 2010) já foram empregados.

Apesar de utilizados em estudos preliminares (ARBEITER e ARBEITER, 1985; SAVAGE e LIPTRAP, 1987), resultados recentes demonstraram que os análogos de prostaglandina são inconsistentes como indutores de ovulação (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008), razão pela qual não é recomendado seu emprego com este objetivo (SAMPER, 2008). A seguir, serão abordados os principais medicamentos utilizados na atualidade com o intuito de induzir ovulações em éguas.

2.4.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)

O medicamento mais utilizado para induzir ovulações e reduzir a duração do estro é o hCG (McCUE et al., 2004). Trata-se de um hormônio peptídico produzido pela placenta humana, capaz de estimular a função lútea e a manutenção da gestação nesta espécie.

O hCG é dotado de duas cadeias peptídicas contendo galactose e hexosamina, peso molecular de 30.000 e meia-vida de oito a 12 horas (VOSS, 1993). A sub-unidade alfa do hCG é igual a de outras gonadotrofinas, enquanto que 51% da seqüência de aminoácidos da sub-unidade beta é semelhante à da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG; SUGINO et al., 1987). Pelo fato da sub-unidade beta do eCG possuir a mesma seqüência de aminoácidos do LH eqüino (GALET et al., 2000), supõe-se que o LH e o hCG apresentam 50% de similaridade nesta sub-unidade. Em garanhões, foi demonstrado que o hCG e o LH eqüino se ligam aos mesmos receptores testiculares (EVANS et al., 1982).

Devido a sua semelhança com o LH, o hCG também estimula seus receptores foliculares, mimetizando suas ações envolvendo a maturação oocitária, folicular e a ovulação (WILSON et al., 1990). Foi demonstrado que mesmo que as concentrações de LH endógeno sejam drasticamente reduzidas através do uso de um antagonista de GnRH, o hCG continua sendo eficaz na indução de ovulação (BRIANT et al., 2004). Recentemente, Evans et al. (2006) e Ginther et al. (2009a) verificaram que a aplicação de hCG também estimula a ocorrência de um pico endógeno de LH. Estes autores supõem que isto possa ocorrer, mesmo que parcialmente, por alterações nas concentrações hormonais da própria égua tratada.

A administração de 1.500 a 5.000 unidades internacionais (UI) de hCG pela via intra-muscular (I.M.) ou intra-venosa (I.V.) resulta em uma resposta ovulatória entre 24 e 48 horas em aproximadamente 80% dos animais (LOY e HUGHES, 1966; VOSS et al., 1975; BARBACINI et al., 2000; SAMPER et al., 2002; McCUE et al., 2004). De acordo com McCue et al. (2004), as éguas que ovulam até 24 horas após a administração de hCG não responderam ao tratamento, tendo ovulado espontaneamente devido a um pico endógeno de LH. Ao acelerar o término do estro, a administração de hCG estimula a

ovulação de folículos pré-ovulatórios menores (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

Dois trabalhos foram realizados a fim de comparar o efeito da administração de diferentes doses de hCG. Davies Morel e Newcombe (2008) utilizaram apenas 750UI de hCG a fim de induzir ovulações e, nas éguas apresentando um folículo dominante no momento da indução, as taxas de ovulação após 48 horas foram semelhantes nos tratamentos com 750UI (92,5%) e 1.500UI (92,4%). Em estudo realizado no Brasil, Beal (2008) obteve resultado similar ao avaliar o uso de 1.000UI, 1.500UI e 2.000UI de hCG, com taxas de ovulação entre 24 e 48 horas de, respectivamente, 82,05%, 78,05% e 81,40%.

Sabe-se que o uso repetido desta gonadotrofina implica na redução de sua eficácia (SULLIVAN et al., 1973; WILSON et al., 1990), presumidamente pela formação de anticorpos. Duchamp et al. (1987) verificaram que as éguas imunizadas contra o hCG não ovulavam em um tempo previsível após sua administração. Por estas razões, recomenda-se a aplicação do hCG por apenas dois ciclos estrais em cada estação de monta (McCUE et al., 2004), devendo-se substituí-lo por outros indutores em ciclos subsequentes.

Siddiqui et al. (2009) observaram que éguas apresentando anticorpos anti-hCG, após a aplicação de 2.500UI (I.V.) desta gonadotrofina, não sofrem aumento nas concentrações plasmáticas de LH e no fluxo sanguíneo da parede folicular, ou redução nas concentrações plasmáticas e intra-foliculares de estradiol. Conforme Davies Morel e Newcombe (2008), além de baratear o custo, doses inferiores podem ser especialmente desejadas por, possivelmente, formarem quantidades menores de anticorpos.

O hCG tem sido rotineiramente utilizado quando da inseminação com sêmen congelado. Após a aplicação medicamentosa, recomenda-se a avaliação ultra-sonográfica a cada seis a oito horas, realizando-se a inseminação à detecção de uma ovulação (SAMPER e HANKINS, 2001). Um protocolo alternativo foi proposto por Squires et al. (2003a), a fim de permitir um menor número de avaliações. Estes autores realizaram duas inseminações fixas com sêmen congelado 24 e 48 horas após a administração de hCG, obtendo taxa de fertilidade satisfatória, semelhante àquela de éguas inseminadas até seis horas pós-ovulação. De acordo com Squires et al.

(2003a), este protocolo permite que haja quantidade suficiente de espermatozoides no trato reprodutivo feminino nas ovulações que ocorrem entre 18 e 52 horas do tratamento com hCG.

Gastal et al. (2006) afirmam que, após a indução de um folículo ≥ 35 mm com 2.500UI de hCG (I.V.), seu desenvolvimento cessa; isto é, seu diâmetro não se altera, permanecendo constante. Estes resultados contrastam com os obtidos por Silva et al. (2006) que, ao correlacionarem o diâmetro do folículo dominante (induzido com medicação semelhante) com o posterior diagnóstico de gestação, verificaram que as éguas prenhes apresentaram um aumento no diâmetro folicular, quando comparadas às não-gestantes. Estes autores afirmam que alterações no diâmetro folicular frente à indução podem servir, futuramente, como um parâmetro para determinar a possibilidade com que uma égua virá a se tornar gestante. Diante destes resultados, pode-se afirmar que ainda permanece incerta a taxa de desenvolvimento folicular após a indução de ovulação com o hCG.

No caso específico da TE, é possível que a indução da ovulação possua benefícios secundários. O emprego do hCG já foi associado a uma maior incidência de múltiplas ovulações (PERKINS e GRIMMET, 2001; VERONESI et al., 2003), as quais favorecem a recuperação embrionária. Não obstante, Araújo et al. (2005) detectaram que o uso do hCG levou a um aumento nas concentrações de progesterona apenas no dia da ovulação (D0), enquanto que Sousa et al. (2007) identificaram maiores concentrações plasmáticas deste hormônio no D4 de éguas tratadas. Sabe-se que o hCG, ao mimetizar as ações do LH, é capaz de agir estimulando a esteroidogênese. De acordo com Sousa et al. (2007), a utilização deste agente na indução de ovulações determinou um maior número de éguas receptoras aptas à transferência de embriões (com elevado tônus uterino, cervical e ausência de edema endometrial). Conforme Carnevale et al. (2000), o tônus uterino e cervical se trata do principal fator a ser avaliado na seleção de receptoras. Por outro lado, ao compararem as concentrações de progesterona de éguas induzidas com o hCG com as do grupo controle, Urquieta et al. (2009) não verificaram concentrações plasmáticas superiores de progesterona nos animais tratados no D1, D2, D3, D4 e D8. Em bovinos, a administração de hCG determina um aumento no

número e secreção das células lúteas grandes, produtoras de progesterona (DONALDSON e HANSEL, 1965).

O hCG pode ser utilizado, também, para aumentar a duração da fase lútea ao induzir ovulações no diestro, fato este particularmente interessante em animais de esporte, ao impedir manifestações indesejáveis de cio. Em seu estudo, Hedberg et al. (2006) induziram a ovulação de um folículo ≥ 30 mm a partir do oitavo dia pós-ovulação, obtendo sucesso em 75% dos ciclos tratados.

2.4.2 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos

O GnRH natural (gonadorrelina) e seus análogos estimulam a ovulação através da liberação de LH endógeno, cujo aumento pode ser detectado na circulação sanguínea de novilhas (CHENAULT et al., 1990) e éguas (BARRIER-BATTUT et al., 2001). Na espécie eqüina, o uso da gonadorrelina não se traduziu em resultados interessantes na sincronização e indução da ovulação devido a sua curta meia-vida e potência (SAMPER, 2008). Todavia, este autor afirma que aplicações repetidas de GnRH por dois a três dias, duas a três vezes ao dia, são capazes de induzir e sincronizar a ovulação eqüina.

Estima-se que aproximadamente 2000 análogos de GnRH, com diferentes eficácias e potências, já foram sintetizados (KARTEN e RIVIER, 1986). Ao estudarem o uso de deslorelina em ratos, Coy e Schally (1978) detectaram liberações até 17 vezes maiores de LH em comparação ao GnRH. Este análogo parece ser, aproximadamente, 100 vezes mais potente que o GnRH (PADULA, 2005), servindo como alternativa naquelas éguas que não respondem da forma esperada ao hCG, fato este particularmente comum após repetidas aplicações dentro de uma estação de monta ou em éguas mais velhas (BARBACINI et al., 2000). Assim como o hCG, a deslorelina acelera a ovulação de folículos pré-ovulatórios menores (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

A maioria dos trabalhos envolvendo o uso de deslorelina sob forma de implante não foi realizada no Brasil (McCUE et al., 2002; SAMPER et al., 2002). Este possui os inconvenientes da aplicação e posterior remoção. Caso o implante não seja retirado 48 horas após a sua colocação, algumas éguas podem apresentar intervalos inter-ovulatórios exacerbados (McCUE et al.,

2002), devido a reduções na sensibilidade ou no número de receptores para GnRH na pituitária (JOHNSON et al., 2002).

Utilizando 1,0 miligrama (mg) de deslorelina em veículo injetável de liberação lenta (I.M.), Melo et al. (2005) detectaram ovulações em 79,3% das éguas entre 24 e 48 horas após sua aplicação, quando estas apresentavam um folículo ≥ 35 mm. Ao compararem seu uso com o do extrato de pituitária eqüina (10,0mg, I.V.), estes autores obtiveram períodos ovulatórios médios próximos de, respectivamente, 38,9 e 34,7 horas. Estes resultados com a utilização de deslorelina injetável são semelhantes aos observados com o emprego de hCG pela maioria dos autores (BARBACINI et al., 2000; MCCUE et al. 2004). Ao aplicarem 1,0mg e 0,5mg desse mesmo composto, Fleury et al. (2004) obtiveram resultados similares, indicando que ambas as doses de deslorelina são capazes de induzir uma ovulação em éguas entre os períodos médios aproximados de 40 a 50 horas passadas de sua administração.

A deslorelina pode ser empregada como agente indutor de ovulação para éguas inseminadas com sêmen congelado. Squires et al. (2003a) administraram 1,0mg de deslorelina sob forma de implante nas éguas em que duas aplicações prévias de hCG já haviam sido conduzidas na mesma estação de monta. O protocolo utilizado foi de inseminações 30 e 46 horas após a medicação.

2.4.3 Associações de hCG e análogos de GnRH

O uso combinado de agentes indutores, como o hCG e a deslorelina, é recomendado em éguas idosas que se prestam à doação de oócitos, por supostamente favorecerem a maturação folicular e oocitária (CARNEVALE et al., 2005). Contudo, não há estudos determinando os possíveis benefícios da administração simultânea destes medicamentos em éguas.

Em vacas, através do emprego de técnicas de biologia molecular, detectou-se a expressão de diferentes tipos de receptores para LH nas células da granulosa folicular (NOGUEIRA et al., 2007). Estes receptores possuem afinidades distintas pelas moléculas de hCG e LH endógeno (MÜLLER et al., 2003). Apesar de não haver estudos semelhantes em folículos eqüinos, é possível que suas células da granulosa possuam, como em vacas, variadas

isoformas de receptores de LH, justificando o emprego de associações entre o hCG e análogos de GnRH para a indução de ovulação e obtenção de benefícios secundários.

2.4.4 Estrógenos

Preparados hormonais à base de estrógeno são economicamente interessantes para a indução de ovulações. Em vacas submetidas a regimes de sincronização com progestágenos, o uso de estrogênio fornece resultados satisfatórios em programas de inseminação artificial em tempo fixo. Tanto o benzoato (BARROS et al., 2000) quanto o cipionato de estradiol (ECP; COLAZO et al., 2003) se prestam à indução ovulatória de vacas, nas quais o pico de LH ocorre após 24 horas da aplicação de ECP (AMBROSE et al., 2005).

Segismundo et al. (2003) avaliaram a eficiência de compostos à base de estrógeno em induzir e sincronizar ovulações na espécie eqüina. Após a detecção de um folículo ≥ 35 mm durante o estro, foram administrados 10,0mg de ECP ou de benzoato de estradiol (I.M.). Os autores verificaram que somente o ECP foi capaz, à despeito de induzir ovulações de forma mais tardia que o hCG, de acelerá-las e sincronizá-las, sendo que estas ocorreram dentro de um período de 72 horas em 83,3% das éguas. Em contraste com Segismundo et al. (2003), ao utilizarem o ECP associado ou não à deslorelina, Fleury et al. (2004) detectaram que este hormônio esteróide aumentou o intervalo até a ovulação, tanto em éguas com folículos de 30 a 35mm, quanto naquelas com maiores diâmetros.

Os indutores de ovulação tradicionalmente utilizados na espécie eqüina possuem seu mecanismo de ação em torno do LH, seja estimulando sua liberação pela pituitária ou mimetizando suas ações. Conforme o estágio do ciclo estral, o estrógeno exerce um efeito positivo ou negativo sobre a síntese de LH nas espécies domésticas (LINDZEY et al., 2006).

O efeito positivo da administração de estradiol foi demonstrado em estudos anteriores em éguas íntegras ou ovariectomizadas. Maiores concentrações circulantes de LH foram detectadas em pôneis ovariectomizadas submetidas a tratamento com estradiol durante o verão

(GARCIA e GINTHER, 1978). Efeito positivo semelhante foi descrito por Thompson et al. (1991). Quando da aplicação de uma única injeção de estradiol, Miller et al. (1981) observaram reduções na concentração de LH nas primeiras horas, as quais foram transitórias e seguidas de aumento entre oito e 12 horas. Este efeito rebote também ocorre em vacas, com reduções nas primeiras seis horas e um pico às 24 horas (MARTINEZ et al., 2007).

Sharp et al. (2001) detectaram que a administração de estrogênio estimula a expressão do RNA do tipo mensageiro, responsável pela transcrição das sub-unidades de LH na hipófise. O estradiol, conjugado ou não, também estimulou uma maior secreção dessa gonadotrofina, em resposta ao GnRH, por células cultivadas da pituitária eqüina (BALDWIN et al., 1990).

Em éguas cíclicas, aplicações diárias de 10,0mg de estradiol resultaram em maiores concentrações de LH por até duas semanas após a regressão lútea (BURNS e DOUGLAS, 1981). Próximo ao início do estro, Garcia e Ginther (1975) observaram que uma única injeção de estrógeno foi capaz de aumentar as concentrações circulantes de LH.

Entretanto, os estudos mais recentes indicam exatamente o oposto, isto é, a existência de um “feedback” negativo do estrógeno sobre o LH. Durante o período de desvio folicular, a administração de estrógeno culminou em redução nas concentrações circulantes de LH (DONADEU e GINTHER, 2002). Não obstante, foi demonstrada correlação inversamente proporcional entre estes hormônios durante o “plateau”, com substancial incremento nas concentrações de LH quando a quantidade de estrógeno circulante entra em declínio (GINTHER et al., 2005; 2006). Recentemente, Ginther et al. (2007a) verificaram que administrações de estrógeno durante várias fases do estro reduziram as concentrações endógenas de LH, sendo este efeito dose-dependente. Os resultados obtidos com o estrógeno para a indução de ovulação ainda são inconclusivos na espécie eqüina.

2.4.5 Outros indutores de ovulação

O extrato de pituitária eqüina (EPE) é um preparado parcial de gonadotrofina eqüina (CARMO, 2003), tendo sido um dos primeiros hormônios utilizados na tentativa de se superovular éguas (DOUGLAS et al., 1974). O

EPE é produzido a partir de pituitárias (hipófises) de eqüinos recém-abatidos, razão pela qual possui concentrações variáveis de LH e FSH.

O LH eqüino presente no EPE age de maneira semelhante ao hCG na indução de ovulação, sem o inconveniente da formação de anticorpos. O EPE pode, também, ser administrado a éguas acíclicas, para antecipar o início da estação de monta (SQUIRES et al., 2003b). Todavia, as concentrações de FSH e LH no EPE são inconstantes, o que dificulta parcialmente a repetibilidade dos resultados obtidos (SCOGGIN et al., 2002).

Duchamp et al. (1987) verificaram que a administração de 25,0mg de EPE (I.V.), na presença de um folículo de 35mm, foi capaz de induzir a ovulação em 75% das éguas no período entre 24 e 48 horas. Resultados semelhantes foram obtidos por Medeiros et al. (2005), já que a ovulação ocorreu, em média, 36 horas após a aplicação de 5,0mg ou 10,0mg de EPE (I.V.).

Recentemente, estudos foram realizados com o LH recombinante eqüino (reLH) (JABLONKA-SHARIFF et al., 2007; YOON et al., 2007), gonadotrofina de cadeia única muito menos antigênica que o hCG devido a seu menor peso molecular (SAMPER et al., 2008). Após o tratamento com 0,75mg e 0,90mg de reLH, detectou-se a ovulação entre 24 e 48 horas em, respectivamente, 80% e 75% das éguas (YOON et al., 2007). Neste estudo, apesar de superiores a 6 nanogramas por mililitro (ng/mL), as concentrações de progesterona das éguas tratadas com 1,0mg de reLH foram inferiores às do controle nos dias D8, D9, D10 e D15 do ciclo estral.

3. OBJETIVOS

- 1) Verificar se a associação do hCG com um análogo sintético do GnRH, o acetato de deslorelina, nas doses convencionais ou sub-doses, age de forma sinérgica ou interfere no mecanismo de indução de ovulação.

- 2) Verificar se o cipionato de estradiol pode ser utilizado na indução e sincronização da ovulação e se sua administração prévia interfere na indução de ovulação obtida com a deslorelina.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultra-sonográficos

O presente experimento foi conduzido em dois Haras localizados no município de Conselheiro Lafaiete (LATITUDE 20^o40'S e LONGITUDE 43^o48'W), Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 237 éguas da raça Campolina, apresentando entre três e 14 anos de idade (7,3 anos de média), 350 a 650 quilogramas de peso e boa condição corporal, entre 6,5 e 8,0, conforme escala proposta por Henneke et al. (1983). As avaliações foram realizadas com auxílio de aparelho digital de ultra-sonografia, equipado com transdutor linear de 5,0 Megahertz (Chison V8300® – China). Os animais selecionados encontravam-se na estação ovulatória, confirmado através da identificação de um corpo lúteo no ovário em uma área onde havia um folículo pré-ovulatório. Apenas éguas sem anormalidades reprodutivas avaliadas por ultra-sonografia participaram deste estudo.

Antes que fossem randomicamente separados em grupos, todos os animais foram diariamente avaliados até a ocorrência de uma ovulação espontânea, para que fossem tratados, sete dias após, com 5,0mg de dinoprost trometamina (I.M.; Lutalyse® – Laboratórios Pfizer – Brasil), com o objetivo de induzir a luteólise. A partir do quarto dia desta administração, as avaliações diárias por palpação retal e ultra-sonografia, entre oito e dez horas da manhã, eram retomadas. Durante estes exames, o diâmetro dos dois maiores folículos foi determinado considerando-se a média da máxima área transversal da altura e da largura de uma simples imagem “congelada” no monitor do aparelho de ultra-som. Foram excluídos os ciclos estrais quando da detecção de mais do que um folículo ≥ 25 mm um dia antes do momento da indução de ovulação.

A eco-textura do endométrio foi classificada por meio de um sistema de escores de 0 a 5 (mínimo e máximo) da imagem uterina, baseado na extensão do edema (áreas anecóicas = pretas) de suas dobras (SAMPER, 1997). Foram excluídos os ciclos estrais quando da detecção de edema endometrial grau 5, por este ser considerado anormal conforme Samper (2008).

4.2 Grupos e análise estatística

Ao surgimento de um folículo ≥ 30 mm de diâmetro acompanhado de edema endometrial de, no mínimo, grau 2, 145 éguas foram randomicamente separadas em diferentes grupos, para que sua ovulação fosse induzida no dia subsequente. Considerou-se como Hora 0 o momento da indução de ovulação. O dia seguinte foi denominado de Hora 24, e assim sucessivamente.

A partir da Hora 0, as avaliações ultra-sonográficas diárias foram conduzidas até a detecção de uma ovulação (D0) ou até a Hora 120, o que ocorresse primeiro. Para os animais tratados com hCG, administrou-se o produto Vetecor® (Laboratório Hertape Calier – Brasil); para os injetados com cipionato de estradiol, utilizou-se o E.C.P.® (Laboratórios Pfizer – Brasil). O acetato de deslorelina foi produzido no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP – Campus de Botucatu, Brasil. Conforme o protocolo utilizado, as éguas foram aleatoriamente separadas nos seguintes grupos experimentais:

- * G1 (n=20): 1,0mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação lenta.
- * G2 (n=20): 0,5mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação lenta.
- * G3 (n=20): 2.000UI de hCG (I.V.).
- * G4 (n=20): 750UI de hCG (I.V.).
- * G5 (n=15): 1,0mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação lenta e 2.000UI de hCG (I.V.).
- * G6 (n=10): 0,5mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação lenta e 750UI de hCG (I.V.).
- * G7 (n=10): 10,0mg de ECP (I.M.).
- * G8 (n=10): 1,0mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação lenta, 24 horas após pré-tratamento com 10,0mg de ECP (I.M.).
- * GC (n=20): As éguas deste grupo não receberam tratamento, sendo utilizadas como controle.

A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas, o grau de edema endometrial, bem como o diâmetro folicular e sua taxa de desenvolvimento foram avaliados nos diferentes grupos e/ou momentos, utilizando-se o Statistical Analysis System (SAS), sendo a diferença significativa quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Taxa de ovulação entre 24 e 48 horas após a indução

A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas após a indução foi estatisticamente semelhante nos grupos G1 ao G6. Todas as éguas (100%) do G5 e G6 ovularam entre 24 e 48 horas após a indução; isto ocorreu em 80% das éguas do G1, G2 e G4, e em 75% dos animais do G3. Verificou-se uma maior porcentagem ($P<0,01$) de éguas ovulando entre 24 e 48 horas da aplicação de um indutor de ovulação no G1 ao G6 em relação ao G7 e GC. O G8 apresentou taxa de ovulação intermediária, de 40%, somente inferior ($P<0,01$) ao G5 e G6. Nos grupos controle, G2, G3 e G7, 10% das ovulações foram detectadas na Hora 24, em comparação ao G4 (15%) e G8 (20%). Verificou-se a formação de folículos hemorrágicos anovulatórios no G1 (2/20; 10%), G2 (1/20; 5%), G3 (1/20; 5%), G7 (3/10; 30%) e G8 (2/10; 20%). A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas dentro dos grupos estudados encontra-se agrupada na Tabela 1.

TABELA 1 – Porcentagem (%) de éguas que ovularam entre 24 e 48 horas após a indução de ovulação dentro dos grupos estudados.

Grupo	Taxa de ovulação entre 24 e 48 horas da indução
GC (Controle)	20,0% / (4/20) ^c
G1 (Deslorelina 1,0mg)	80,0% / (16/20) ^{ab}
G2 (Deslorelina 0,5mg)	80,0% / (16/20) ^{ab}
G3 (hCG 2.000UI)	75,0% / (15/20) ^{ab}
G4 (hCG 750UI)	80,0% / (16/20) ^{ab}
G5 (Deslorelina 1,0mg + hCG 2.000UI)	100,0% / (15/15) ^a
G6 (Deslorelina 0,5mg + hCG 750UI)	100,0% / (10/10) ^a
G7 (ECP 10,0mg)	20,0% / (2/10) ^c
G8 (ECP 10,0mg + Deslorelina 1,0mg)	40,0% / (4/10) ^{bc}

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P<0,01$).

A porcentagem de éguas de cada grupo cuja ovulação foi detectada nos diferentes momentos pode ser visualizada na Figura 1.

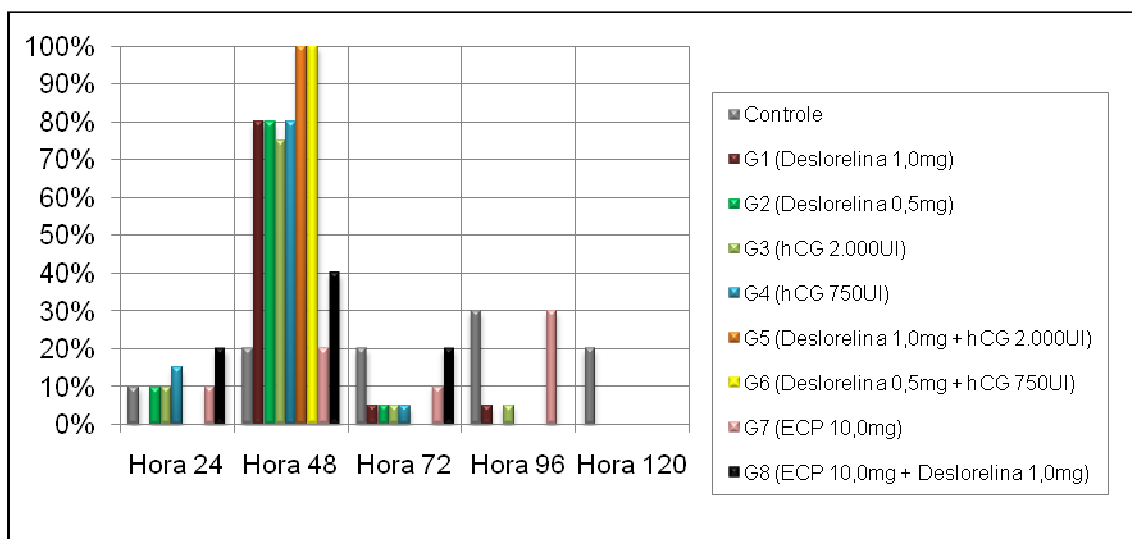


FIGURA 1 – Porcentagem (%) de éguas em que a ovulação foi detectada 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a indução de ovulação dentro dos grupos estudados.

5.2 Edema endometrial

O grau de edema endometrial na Hora 0 foi maior ($P < 0,05$) no G8, cujas éguas foram pré-tratadas com 10,0mg de ECP (I.M.) 24 horas antes da indução com 1,0mg de deslorelina (I.M.). Na Hora 24, este grau foi maior ($P < 0,05$) no G7 (10,0mg de ECP). A partir da Hora 48, esta variável não foi avaliada, devido à ocorrência de ovulações. Os valores obtidos de edema endometrial nas Horas 0 e 24 encontram-se agrupados na Tabela 2.

TABELA 2 – Média e desvio padrão do grau de edema endometrial visualizado ultra-sonograficamente no momento da indução (Hora 0) e no dia seguinte (Hora 24) dentro dos grupos estudados.

Grupo	Hora 0	Hora 24
GC (Controle)	2,32 ^a ± 0,53	2,15 ^a ± 0,83
G1 (Deslorelina 1,0mg)	2,36 ^a ± 0,45	2,05 ^a ± 0,36
G2 (Deslorelina 0,5mg)	2,37 ^a ± 0,40	1,65 ^a ± 0,73
G3 (hCG 2.000UI)	2,40 ^a ± 0,57	1,75 ^a ± 0,72
G4 (hCG 750UI)	2,60 ^a ± 0,53	1,78 ^a ± 0,66
G5 (Deslorelina 1,0mg + hCG 2.000UI)	2,07 ^{a *} ± 0,50	1,67 ^a ± 0,56
G6 (Deslorelina 0,5mg + hCG 750UI)	2,40 ^a ± 0,54	1,80 ^a ± 0,48
G7 (ECP 10,0mg)	2,36 ^{a *} ± 0,63	2,95 ^b ± 0,83
G8 (ECP 10,0mg + Deslorelina 1,0mg)	3,17 ^b ± 0,43	1,85 ^a ± 0,41

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

Foi observada redução no valor médio de edema endometrial no D0 em comparação à Hora 0, tanto no G5 e G8 ($P < 0,001$), quanto nos demais ($P < 0,0001$). Esta diminuição ocorreu um dia antes da ovulação (D-1) em todos os grupos ($P < 0,0001$) com exceção do G5, G6 e G7.

No D-1, o GC apresentou o menor valor numérico médio no grau de edema endometrial ($1,55 \pm 0,54$), sendo inferior ($P < 0,05$) ao obtido no G1, G4 e G8. O maior valor numérico médio ($2,25 \pm 0,46$) foi identificado no G8, o qual foi superior ($P < 0,05$) ao visualizado no G5 ($1,67 \pm 0,56$) e GC. Com exceção do G8 e do GC, os valores médios do grau de edema endometrial não diferiram ($P > 0,05$).

No D0, o GC apresentou o menor grau ($P < 0,01$) de edema endometrial em comparação aos grupos G1 ao G6. Os grupos tratados com cipionato de estradiol (G7 e G8) obtiveram valores médios intermediários, similares aos demais. Esses dados encontram-se organizados na Tabela 3.

TABELA 3 – Média e desvio padrão do grau de edema endometrial visualizado ultra-sonograficamente no momento da indução (Hora 0), um dia antes da ovulação (D-1) e no dia da ovulação (D0) dentro dos grupos estudados.

Grupo	Hora 0	D-1	D0
GC (Controle)	2,32 ^a ± 0,53	1,55 ^{zb} ± 0,54	0,42 ^{xc} ± 0,47
G1 (Deslorelina 1,0mg)	2,36 ^a ± 0,45	1,94 ^{xyb} ± 0,45	0,78 ^{yc} ± 0,46
G2 (Deslorelina 0,5mg)	2,37 ^a ± 0,40	1,84 ^{xyzb} ± 0,47	0,87 ^{yc} ± 0,64
G3 (hCG 2.000UI)	2,40 ^a ± 0,57	1,79 ^{xyzb} ± 0,63	0,79 ^{yc} ± 0,65
G4 (hCG 750UI)	2,60 ^a ± 0,53	1,95 ^{xyb} ± 0,65	0,90 ^{yc} ± 0,64
G5 (Deslorelina 1,0mg + hCG 2.000UI)	2,07 ^a * ± 0,50	1,67 ^{yz^a} ± 0,56	0,73 ^{yb} * ± 0,56
G6 (Deslorelina 0,5mg + hCG 750UI)	2,40 ^a ± 0,54	1,80 ^{xyz^a} ± 0,48	0,95 ^{yc} ± 0,37
G7 (ECP 10,0mg)	2,36 ^a * ± 0,63	1,71 ^{xyz^a} ± 0,70	0,71 ^{xyz} * ± 0,57
G8 (ECP 10,0mg + Deslorelina 1,0mg)	3,17 ^a ± 0,43	2,25 ^{xb} ± 0,46	0,72 ^{xyz} ± 0,56

^{abc} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,0001) ou, na presença de *, (P<0,001).

^{XYZ} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, (P<0,05) no D-1 e (P<0,01) no D0.

5.3 Taxa de desenvolvimento e diâmetro folicular

A taxa de desenvolvimento folicular entre a Hora 0 e 24 foi semelhante (P>0,05) dentro dos grupos estudados, de, respectivamente: 3,37mm ± 1,55 (GC), 2,73mm ± 1,34 (G1), 3,29mm ± 2,34 (G2), 2,49mm ± 2,07 (G3), 3,18mm ± 1,53 (G4), 2,76mm ± 1,43 (G5), 2,29mm ± 1,36 (G6), 2,91mm ± 1,98 (G7) e 2,30mm ± 1,0 (G8). Entre as Horas 24 e 48, a avaliação desta variável não foi realizada em todos os grupos, devido à ocorrência de ovulações.

O diâmetro folicular na Hora 0 e na Hora 24 foi similar (P>0,05) entre os grupos, conforme a Tabela 4. A avaliação desta variável não pôde ser realizada em todos os grupos na Hora 48, devido à ocorrência de ovulações.

TABELA 4 – Média e desvio padrão do diâmetro folicular no momento da indução (Hora 0) e no dia seguinte (Hora 24) dentro dos grupos estudados.

Grupo	Hora 0	Hora 24
GC (Controle)	35,40 ± 1,30	38,71 ± 2,17
G1 (Deslorelina 1,0mg)	35,70 ± 1,11	38,45 ± 1,73
G2 (Deslorelina 0,5mg)	35,82 ± 1,08	38,70 ± 2,23
G3 (hCG 2.000UI)	35,95 ± 1,47	38,46 ± 2,40
G4 (hCG 750UI)	35,70 ± 1,15	38,88 ± 2,09
G5 (Deslorelina 1,0mg + hCG 2.000UI)	36,34 ± 1,45	39,10 ± 1,84
G6 (Deslorelina 0,5mg + hCG 750UI)	36,60 ± 1,37	38,89 ± 2,38
G7 (ECP 10,0mg)	36,93 ± 0,79	39,52 ± 2,34
G8 (ECP 10,0mg + Deslorelina 1,0mg)	36,75 ± 1,04	39,46 ± 2,16

P>0,05

Todos os grupos apresentaram aumento significativo no diâmetro folicular entre a Hora 0 e o D-1. Neste último dia, o G7 e o GC obtiveram os maiores diâmetros foliculares médios pré-ovulatórios ($P<0,01$) em comparação aos grupos G1 ao G5. Os diâmetros médios no G6 e G8 apresentaram tendência a serem inferiores ($P<0,09$) aos obtidos no G7 e GC. Estes dados encontram-se agrupados na Tabela 5.

TABELA 5 – Média e desvio padrão do diâmetro folicular no momento da indução (Hora 0) e um dia antes da ovulação (D-1) dentro dos grupos estudados.

Grupo	Hora 0	D-1
GC (Controle)	35,40 ^{aX} ± 1,30	41,42 ^{bX} ± 3,60
G1 (Deslorelina 1,0mg)	35,70 ^{aX} ± 1,11	38,54 ^{bY} ± 2,03
G2 (Deslorelina 0,5mg)	35,82 ^{aX} ± 1,08	39,06 ^{bY} ± 2,68
G3 (hCG 2.000UI)	35,95 ^{aX} ± 1,47	38,61 ^{bY} ± 3,02
G4 (hCG 750UI)	35,70 ^{aX} ± 1,15	38,56 ^{bY} ± 2,94
G5 (Deslorelina 1,0mg + hCG 2.000UI)	36,34 ^{aX} ± 1,45	39,10 ^{bY} ± 1,84
G6 (Deslorelina 0,5mg + hCG 750UI)	36,60 ^{aX} ± 1,37	38,89 ^{bXY} ± 2,38
G7 (ECP 10,0mg)	36,93 ^{aX} ± 0,79	42,19 ^{bX} ± 2,71
G8 (ECP 10,0mg + Deslorelina 1,0mg)	36,75 ^{aX} ± 1,04	38,87 ^{bXY} ± 1,98

^{XY} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,01$).

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,01$).

No grupo controle, detectou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) no diâmetro folicular até dois dias antes da ovulação (D-2). Aumento semelhante não foi observado entre o D-2 e o D0, isto é, a taxa de crescimento folicular próxima à ovulação não foi significativa ($P > 0,05$) no grupo controle. O diâmetro folicular médio obtido no GC foi de, respectivamente, $38,38 \pm 2,71$ no D-3, $40,82 \pm 3,95$ no D-2 e $41,42 \pm 3,60$ no D-1.

6. DISCUSSÃO

As taxas obtidas com o uso de ambas as doses de deslorelina (1,0mg e 0,5mg), de 80%, não diferiram das encontradas na literatura para formulações injetáveis similares (FLEURY et al., 2004; MELO et al., 2005) ou sob forma de implante (McCUE et al., 2002; SAMPER et al., 2002). Em seu estudo, Fleury et al. (2004) verificaram que as éguas tratadas com 0,5mg de deslorelina ovularam, em média, cinco horas após às injetadas com 1,0mg. Tal comportamento não pôde ser observado no presente experimento, já que as avaliações foram realizadas em intervalos de 24 horas.

As taxas de ovulação entre 24 e 48 horas para os grupos induzidos com 2.000UI e 750UI de hCG (G3 e G4; de 75% e 80%, respectivamente) foram similares às encontradas na literatura quando da utilização de hCG nas doses preconizadas (LOY e HUGHES, 1966; VOSS et al., 1975; BARBACINI et al., 2000; SAMPER et al., 2002; McCUE et al., 2004; BEAL 2008) ou em sub-doses, de 1.000UI (BEAL, 2008) e 750UI (DAVIES MOREL e NEWCOMBE, 2008). Entretanto, ao contrário destes últimos dois experimentos, o presente estudo apresenta um grupo controle.

Através do uso de doses menores, há redução substancial no custo da indução com hCG ou deslorelina. De acordo com Davies Morel e Newcombe (2008), além de baratear o custo, doses inferiores de hCG podem ser especialmente desejadas por, possivelmente, formarem quantidades menores de anticorpos. No presente estudo, apenas um ciclo estral por égua foi avaliado, razão pela qual não se observou o efeito de seguidas aplicações de hCG, utilizando-se a dose preconizada ou sub-dose, sobre sua eficácia.

Todas as éguas (100%) do G5 (1,0mg de deslorelina e 2.000UI de hCG) e G6 (0,5mg de deslorelina e 750UI de hCG) ovularam entre 24 e 48 horas, sendo esta porcentagem superior à obtida no grupo controle, G7 (10,0mg de ECP) e G8 (10,0mg de ECP 24 horas antes de 1,0mg de deslorelina). Esta sincronização pode ser decorrente do suposto estímulo à maturação folicular que ocorre através do uso combinado destes agentes indutores, atuando em sinergismo (CARNEVALE et al., 2005).

Sabe-se que os análogos de GnRH induzem a ovulação através da liberação de LH endógeno (BARRIER-BATTUT et al., 2001). Além de ligar-se

aos receptores foliculares de LH, o hCG também estimula esta liberação (EVANS et al., 2006), devido à imediata redução na concentração de estrógeno circulante (GINTHER et al., 2009a). Para que um possível efeito sinérgico do uso associado destes indutores seja confirmado, são necessários estudos com um número maior de éguas e avaliações reprodutivas mais freqüentes, a fim de detectar uma possível antecipação no momento ovulatório, em conjunto com dosagens das concentrações plasmáticas de LH.

Sabe-se da existência de variadas isoformas de receptores de LH nas células da granulosa folicular de vacas (ROBERT et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2007) e ovelhas (ABDENNEBI et al., 2002). Estas isoformas podem apresentar afinidades distintas pelas moléculas de hCG e LH endógeno, como na espécie humana (MÜLLER et al., 2003). Apesar de estudos semelhantes ainda não terem sido realizados em folículos eqüinos, é possível que isto também ocorra, justificando os resultados satisfatórios obtidos perante o uso combinado destes indutores de ovulação.

Em suma, a taxa de ovulação entre 24 e 48 horas obtida nos grupos G1 a G6 foi estatisticamente similar e maior ou igual a 75%, demonstrando que o emprego do hCG e da deslorelina, associado ou não, seja nas doses preconizadas (2.000UI e 1,0mg, respectivamente) ou em sub-doses (750UI e 0,5mg), induz e sincroniza a ovulação de maneira eficaz na espécie eqüina.

A menor taxa de ovulação entre 24 e 48 horas nos grupos tratados, de apenas 20%, foi obtida no G7, cuja indução foi realizada com 10,0mg de ECP. Esta taxa de ovulação foi similar à verificada no GC, inferior à dos grupos G1 a G6 e estatisticamente semelhante à do G8. Não houve, no G7, sincronização das ovulações, conforme a Figura 1. A alta dose aplicada teve por objetivo mimetizar os resultados de Segismundo et al. (2003), que observaram a ovulação em 83,3% das éguas dentro de um período de 72 horas após a indução com 10,0mg de ECP, contra 40,0% neste estudo.

No presente experimento, além da fonte do estrógeno ter sido o cipionato de estradiol, o qual possui meia-vida longa, a dose utilizada foi alta, dez vezes superior à empregada na indução de ovulação em vacas por Colazo et al. (2003). Conforme Ginther et al. (2007a), os trabalhos que indicavam haver um “feedback” positivo do estrógeno sobre o LH são decorrentes do uso de doses excessivas de estrogênio, conjugado ou não, e da infreqüente coleta de sangue

dos animais, a cada 24 horas. Estes autores supõem que um efeito rebote, possivelmente associado ao uso de doses excessivas de estrógeno, pode ser responsável pelos resultados previamente obtidos.

Ginther et al. (2007a) avaliaram o efeito da administração de estrógeno para éguas no estro apresentando um folículo ≥ 28 mm. Neste estudo, foram administrados 0,4mg de estradiol-17beta, divididos em três aplicações de, respectivamente, 0,2mg e 0,1mg, sendo esta última dose utilizada duas vezes, quatro e oito horas da primeira injeção. As concentrações médias de LH foram numericamente inferiores nas éguas tratadas, em relação ao grupo controle. Ainda, a curva de LH no grupo medicado com estradiol apresentou um comportamento diferente, havendo uma redução, seguida de aumento 20 e 24 horas da aplicação.

As alterações nos níveis circulantes de LH podem ocasionar efeitos indesejados sobre a fertilidade. O LH é essencial ao participar da fase final do desenvolvimento e da seleção folicular (GINTHER et al., 1996), sendo necessário ao estimular a maturação nuclear oocitária (DEKEL et al., 1988). Entretanto, a supressão do “plateau” de LH com um antagonista de GnRH, em éguas induzidas com o hCG, não ocasionou em alterações na ovulação, formação do corpo lúteo ou produção embrionária (BRIANT et al., 2003; 2004).

Diante dos dados presentes na literatura, é difícil supor o efeito da indução ou pré-tratamento com 10,0mg de ECP sobre as concentrações circulantes de LH, por estas não terem sido dosadas. O resultado da aplicação de estrógeno pôde ser observado ultra-sonograficamente no G7 e G8, já que houve aumento no grau de edema endometrial passadas 24 horas. Pode-se afirmar, através da avaliação dos resultados obtidos no presente experimento, que a indução e sincronização da ovulação com 10,0mg de ECP foi ineficaz.

O G8 apresentou taxa de ovulação de 40% entre 24 e 48 horas, inferior à dos grupos G5 e G6 e semelhante a dos demais. Apesar de estatisticamente similares, a taxa de ovulação entre 24 e 48 horas no G1 (80%) foi numericamente superior, não sendo detectado benefício no pré-tratamento com o ECP.

Ao utilizarem o cipionato de estradiol em conjunto com a deslorelina, Fleury et al. (2004) observaram que o estrógeno retardou a indução de ovulação. É possível que a aplicação de estrógeno influencie negativamente as

concentrações circulantes de LH, seja por longos períodos ou de forma transitória, o suficiente para interferir no efeito da deslorelina. De acordo com Machado et al. (2008), inibição semelhante ocorre em éguas superovuladas com FSH eqüino purificado, as quais apresentam, durante o estro, concentrações de estrógeno superiores às fisiológicas e ausência de uma curva ascendente peri-ovulatória de LH.

Verificou-se a formação de folículos hemorrágicos anovulatórios no G1 (2/20; 10%), G2 (1/20; 5%), G3 (1/20; 5%), G7 (3/10; 30%) e G8 (2/10; 20%). Apesar de não avaliada estatisticamente, devido ao menor número de animais no G7 e G8, observou-se nestes grupos uma maior incidência de folículos hemorrágicos anovulatórios.

Durante a fase inicial do desenvolvimento folicular, concentrações excessivas (GINTHER et al., 2008) ou insuficientes de LH (ACOSTA et al., 2004) já foram associadas ao surgimento de folículos hemorrágicos anovulatórios. Estes são comumente observados em éguas superovuladas com FSH eqüino purificado (SQUIRES, 2006), nas quais, conforme anteriormente citado, as concentrações de estrógeno são altas e as de LH, consideravelmente baixas (MACHADO et al., 2008).

Os dados presentes na literatura também indicam que o excesso de estrógeno é um dos responsáveis pelo aparecimento destas estruturas. Ginther et al. (2006a) verificaram nas éguas desenvolvendo folículos hemorrágicos anovulatórios maiores concentrações de estradiol a partir do quarto dia antes do seu surgimento. Na espécie humana, o hiperestrogenismo leva a uma tendência à hipercoagulabilidade sangüínea, com aumento na concentração de fibrinogênio plasmático (BIRON et al., 1997) e redução no hematócrito (MICHELON et al., 2002), bem como vaso-dilatação (CLAPAUCH et al., 2007). Mulheres sob reposição hormonal com estrógeno possuem predisposição à trombose venosa (MEADE, 1997) e redução nos níveis de anti-trombina III (BONDUKI et al., 2007). As alterações hemostáticas causadas pelo hiperestrogenismo podem interferir na vascularização e induzir a uma maior hemorragia folicular, levando ao aparecimento de folículos hemorrágicos anovulatórios. São necessários estudos avaliando o efeito da aplicação de estrógeno sobre estas variáveis na espécie eqüina.

A administração de prostaglandina com o intuito de reduzir a fase lútea e induzir o estro parece predispor ao surgimento de folículos anovulatórios (GINTHER et al. 2008; CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2009), ao aumentar as concentrações circulantes de LH (GINTHER et al. 2009a). É possível que o uso de prostaglandina tenha influenciado a incidência de folículos anovulatórios no presente estudo, já que todos os estros avaliados foram induzidos com 5,0mg de dinoprost trometamina (I.M.). A fim de descartar este efeito nas éguas medicadas com estrogênio, é necessário avaliar seu emprego em estros não induzidos com prostaglandina.

Com exceção dos grupos tratados com ECP (G7 e G8), cujo grau de edema endometrial 24 horas após a injeção foi superior, os valores de edema endometrial não diferiram, tanto no momento da indução de ovulação quanto no dia seguinte. Este resultado no G7 e G8 se justifica, pois o edema endometrial é dependente dos níveis circulantes de estrógenos (CHAVATTE e PALMER, 1998).

Apesar de estatisticamente semelhantes, observou-se valores numericamente superiores no grau de edema endometrial na Hora 24 no grupo controle, em relação aos grupos G1 a G6. Este resultado está em acordo com os obtidos por Gastal et al. (2006) e Ginther et al. (2009a), que verificaram um declínio nas concentrações circulantes de estradiol horas após a indução com 2.500UI (I.V.) de hCG. Pode-se supor, diante dos dados obtidos no presente experimento, que reduções semelhantes na concentração de estradiol também ocorram após a indução com o acetato de deslorelina.

Houve considerável redução no valor médio do grau de edema endometrial no dia da ovulação em comparação ao momento da indução, tanto no G5 e G8 ($P < 0,001$), quanto nos demais ($P < 0,0001$). Este resultado era esperado, pois a intensidade de edema endometrial diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (HAYES et al., 1985; SAMPER, 1997). Diminuição semelhante foi observada um dia antes da ovulação em todos os grupos ($P < 0,0001$) com exceção do G5, G6 e G7. Pelo fato da ovulação no G5 e G6 ter sido detectada na Hora 48 em 100% dos animais, é possível que este resultado seja devido ao tempo insuficiente para que o edema se dissipasse gradativamente. Já no G7, apesar do grande intervalo entre a indução de

ovulação e a sua ocorrência, o alto grau de edema na Hora 24 pode não ter sofrido considerável diminuição em função da longa meia-vida do ECP.

Um dia antes da ovulação, o grupo controle apresentou o menor valor numérico médio no grau de edema endometrial em relação aos demais grupos. Isto se tornou evidente no dia da ovulação, quando os valores de edema endometrial do GC foram inferiores ($P < 0,01$) aos verificados no G1 ao G6. O G7 e o G8 obtiveram valores intermediários, os quais foram similares devido ao pequeno número de animais presentes. O grau de edema endometrial nos grupos tratados com cipionato de estradiol pode ter sido influenciado pela longa meia-vida do composto e alta dose utilizada.

Neste estudo, as éguas tratadas com hCG e deslorelina apresentaram maior grau de edema endometrial no dia da ovulação, em relação ao controle. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Cuervo-Arango e Newcombe (2008), onde as éguas cuja ovulação foi induzida com 1.500UI de hCG pela via sub-cutânea ou 2,1mg de deslorelina sob forma de implante apresentaram valores numéricos superiores no grau de edema endometrial 24, 16 e oito horas precedendo a ovulação e no momento de sua detecção. De acordo com estes autores, uma possível explicação para este fato é que os agentes indutores de ovulação levam a alterações nos hormônios esteróides, seja em sua concentração ou no período em que estes são capazes de estimular os receptores endometriais de progesterona.

A taxa de desenvolvimento folicular entre as Horas 0 e 24 foi similar ($P > 0,05$), sendo o maior valor numérico médio observado no GC ($3,37\text{mm} \pm 1,55$). Apesar desta variável não ter sido estatisticamente avaliada entre as Horas 24 e 48, pela ocorrência de ovulações, seu maior valor numérico neste período foi novamente identificado no GC ($2,57\text{mm} \pm 1,93$). Da mesma forma, não houve diferença ($P > 0,05$) no diâmetro folicular nas Horas 0 e 24. Ainda, todos os grupos apresentaram aumento significativo no diâmetro folicular entre a Hora 0 e um dia antes da ovulação. Nenhum protocolo no presente estudo, seja com hCG, acetato de deslorelina ou cipionato de estradiol, associado ou não, nas doses preconizadas ou em sub-doses, foi capaz de impedir ou alterar significativamente o desenvolvimento folicular.

A taxa de desenvolvimento folicular obtida no grupo controle está em acordo com a verificada por diversos autores: 3,0mm por dia até 48 horas

antes da ovulação (KOSKINEN et al., 1989), 2,5mm por dia a partir do sexto dia antes da ovulação (PIERSON, 1993) e de 4,0mm, 4,1mm e 3,3mm por dia entre cinco e dois dias antes da ovulação em éguas jovens, de idade intermediária e velhas, respectivamente (GINTHER et al., 2009b).

Entre as Horas 0 e 24, a taxa de desenvolvimento folicular das éguas tratadas com 2.000UI e 750UI (I.V.) de hCG (de 2,49mm \pm 2,07 e 3,18mm \pm 1,53, respectivamente) foi similar à dos demais grupos, contradizendo os dados obtidos por Gastal et al. (2006), em cujo experimento o diâmetro folicular permaneceu praticamente inalterado nas éguas induzidas com 2.500UI (I.V.) desta gonadotrofina. Por outro lado, Silva et al. (2006) verificaram um aumento no diâmetro folicular, 30 horas da indução com dose semelhante de hCG, somente no folículo pré-ovulatório de éguas que se tornaram gestantes após monta natural. Conforme este último experimento, a taxa de desenvolvimento folicular foi menor que 1,0mm em todas as éguas que não se tornaram gestantes e maior que 1,0mm em 57% das com diagnóstico positivo. Possíveis justificativas para a discordância entre os resultados são desconhecidas.

Os grupos G7 e controle obtiveram os maiores diâmetros foliculares médios pré-ovulatórios ($P < 0,01$) em comparação aos grupos G1 a G5, um dia antes da ocorrência de uma ovulação. Os diâmetros médios nos grupos G6 e G8 tenderam a ser inferiores ($P < 0,09$) aos obtidos nos grupos G7 e controle, não atingindo significância, possivelmente, devido a seu pequeno número de animais e ciclos estrais. No presente estudo, observou-se um menor diâmetro folicular pré-ovulatório quando da indução com hCG e deslorelina, associados ou não, nas doses preconizadas ou sub-doses, mesmo quando se aplicou este análogo de GnRH em éguas pré-tratadas com o ECP. Isto foi demonstrado em experimentos anteriores, através da indução com a dose preconizada de hCG (GASTAL et al., 2006; CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008) ou de deslorelina (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

No grupo controle, o diâmetro folicular apresentou aumento significativo somente até dois dias antes da ovulação (D-2). Das 18 éguas controle cujos valores de diâmetro folicular no D-2 e D-1 eram passíveis de análise (excluindo-se as duas que ovularam no dia seguinte ao início do acompanhamento), em sete (38,89%) verificou-se um aumento $> 1,0$ mm e,

noutras sete (38,89%), <1,0mm. Foi observada redução no diâmetro folicular nas quatro restantes (22,22%).

Conforme Koskinen et al. (1989), o folículo pré-ovulatório cresce 3,0mm por dia até dois dias antes da ovulação, até que permaneça constante e sofra redução, em alguns animais, de dois a três milímetros nas últimas 12 horas que a precedem. Ginther et al. (2009b) verificaram que a taxa de crescimento folicular entre os dois dias que precedem a ovulação de $1,2 \pm 0,8$, $2,0 \pm 0,4$ e $1,7 \pm 0,7$ em éguas jovens, de idade intermediária e velhas, respectivamente, foi inferior à observada entre cinco e dois dias, de $4,0 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,2$ e $3,3 \pm 0,3$, respectivamente.

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado, podemos concluir que:

- 1) O uso do hCG e do acetato de deslorelina, associado ou não, seja nas doses preconizadas ou em sub-doses, induz e sincroniza a ovulação de maneira eficaz. Não foi observado um efeito sinérgico quando estes indutores foram utilizados em conjunto.
- 2) O ECP não foi capaz de induzir ou sincronizar as ovulações. O pré-tratamento com ECP parece ter interferido negativamente nas éguas induzidas com 1,0mg de acetato de deslorelina.
- 3) No dia da ovulação, observa-se redução no grau de edema endometrial em comparação ao momento da indução. Verifica-se um maior grau de edema endometrial em relação ao controle no dia da ovulação de éguas induzidas com hCG ou acetato de deslorelina.
- 4) Nenhum protocolo utilizado, seja com hCG, acetato de deslorelina ou cipionato de estradiol, associado ou não, nas doses preconizadas ou em sub-doses, foi capaz de interferir na taxa de desenvolvimento folicular nas primeiras 24 horas após a indução, as quais foram similares.
- 5) O diâmetro folicular pré-ovulatório é menor nos protocolos em que se emprega o hCG ou o acetato de deslorelina, mesmo que em conjunto com o ECP. Observa-se nos animais não tratados um aumento progressivo no diâmetro folicular até dois dias antes da ovulação.

8. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BALDWIN, D.; ROSER, J.; MUYAN, M.; LASLEY, B.; DYBDAL, N. Direct effects of free and conjugated oestrogens on GnRH stimulated LH release in cultured equine anterior pituitary cells. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EQUINE REPRODUCTION, 1990. Proceedings...

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

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

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

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

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

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

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

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

BIRON, C.; GALTIER-DEREURE, F.; RABESANDRATANA, H.; BERNARD, I.; AGUILAR-MARTINEZ, P.; SCHVED, J.F.; HEDON, B. Hemostasis parameters during ovarian stimulation for a *in vitro* fertilization: results of a prospective study. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 104-109, 1997.

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

BONDUKI, C.E.; LOURENÇO, D.M.; DA MOTTA, E.L.A.; SOARES JR, J.M.; HAIDAR, M.A.; BARACAT, E.C. Effect of estrogen-progestin hormonal replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. **Clinics**, v. 62, p. 553-560, 2007.

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

BRIANT, C.; OTTOGALLI, M.; MOREL, M.; GUILLAUME, D. Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 24, p. 305-322, 2003.

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

CARMO, M.T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas**. 2003. 156f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

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

CARNEVALE, E.M.; ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCILO DI BRIENZA, V. How to collect and vitrify equine embryos for direct transfer. In: 50TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2004. Proceedings...

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

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

CHAVATTE, P.; PALMER, E. Induction of ovulation in the mare. **Equine Veterinary Education**, v. 10, p. 26-30, 1998.

CHENAULT, J.R.; KRATZER, D.D.; RZEPKOWSKI, R.A.; GOODWIN, M.C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v. 34, p. 81-98, 1990.

CLAPAUCH, R.; MATTOS, T.M.; UCHOA, H.B.M.P.; FERREIRA, A.S.R.; BONISSON, V.G.; LOPES, E.L.; NASCIMENTO, I.C.S.; BOUSKELA, E. Use of vascular Doppler ultrasound to detect acute estradiol vascular effect in postmenopausal women. **Clinics**, v. 62, p. 673-678, 2007.

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

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

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

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

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

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

DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W.H. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 517-521, 1988.

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

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

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

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

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

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

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

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

EVANS, J.W.; ROSER, J.F.; MIKUCKIS, G.M. Comparison of the interaction of equine LH and human chorionic gonadotrophin to equine testicular receptors. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 32, p. 113-121, 1982.

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

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

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

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

GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Regulation of plasma LH by estradiol and progesterone in ovariectomized mares. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 477-453, 1978.

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

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

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied aspects**. 2.ed. Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, 1992, 640p.

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

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

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

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 29-40, 2006a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATES, B.F. Relationship between condition score, physical measurement, and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 371-372, 1983.

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

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

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

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

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

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

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

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

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.

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

MACLELLAN, L.J.; CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SCOGGIN, C.F.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 911-919, 2002.

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

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

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

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

MCCUE, P.M.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: 50TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2004. Proceedings...

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

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

MEADE, T.W. Hormone replacement therapy and haemostatic function. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, p.765-769, 1997.

MEDEIROS, A.S.L.; SILVA JÚNIOR, B.L.; MELO, C.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; PUOLI FILHO, J.N.P.; ARAÚJO, G.H.M; ALVARENGA, M.O. Utilização do extrato de pituitária eqüina como agente indutor da ovulação em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30 (Suppl. 1), p. 195, 2005.

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

MICHELON, J.; PETRACCO, A.; BRUXEL, D.M.; MORETTO, M.; BADALOTTI, M. Análise da coagulação sangüínea em pacientes submetidas à hiperestimulação ovariana para fertilização *in vitro*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, p. 345-347, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

PESSOA, M.A.; CANNIZZA, A.P.; FELICIO, G. Contemporary aspects of embryo transfer; a Brazilian perspective. In: 11TH WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 2009. Proceedings...

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

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

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

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

ROBERT, C.; GAGNE', D.; LUSSIER, J.G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L.; SIRARD, M.A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v. 125, p. 437-446, 2003.

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

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

SAMPER, J.C.; HANKINS, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. **Proceedings of the American Association of the Equine Practitioners**, v. 47, p. 314-318, 2001.

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

SAVAGE, N.C.; LIPTRAP, R.M. Induction of ovulation in cyclic mares by administration of a synthetic prostaglandin, fenprostalene, during estrus. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 239-243, 1987.

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

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

SHARP, D.C. Environmental influences on reproduction in horses. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, v. 2, p. 207-223, 1980.

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

SIDDIQUI, M.A.R.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Effect of hCG in the presence of hCG antibodies on the follicle, hormone concentrations and oocyte in mares. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 474-479, 2009.

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

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

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

SQUIRES, E.L. Superovulation in mares. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 819-830, 2006.

SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: 49TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2003a. Proceedings...

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

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

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

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. **Data Retrieval Committee Annual Report (2004)**, International Embryo Transfer Society, 2004.

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

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

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

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

VOSS, J.L. Human chorionic gonadotrophin. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febizer, 1993, chap. 35, p.114-189.

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

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

WATSON, E.D.; THOMASSEN, R.; STEELE, M.; HEALD, M.; LEASK, R.; GROOME, N.P.; RILEY, S.C. Concentrations of inhibin, progesterone and estradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during the spring transition and the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 74, p. 55-67, 2002.

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

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

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

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

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

9. TRABALHO CIENTÍFICO**AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS VISANDO INDUZIR E
SINCRONIZAR A OVULAÇÃO EM ÉGUAS****EVALUATION OF NEW PROTOCOLS TO INDUCE AND SYNCHRONIZE
OVULATIONS IN MARES.****EVALUACIÓN DE NUEVOS PROTOCOLOS PARA INDUCIR Y
SINCRONIZAR OVULACIONES EN LAS YEGUAS.**

Gabriel Maksoud Greco^{1,2}
Marco Antônio Alvarenga³

¹ Agradecimento: FAPESP

² Mestrando – Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu.

³ Professor Adjunto – Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, marco.alvarenga@terra.com.br

Correspondência para: Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP, Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000. Tel: (14) 3811-6249 Fax: (14) 3815-8799.

1 **AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS VISANDO INDUZIR E**
2 **SINCRONIZAR A OVULAÇÃO EM ÉGUAS**

3
4 **RESUMO**

5 Os agentes indutores de ovulação são rotineiramente utilizados na reprodução equina,
6 em especial quando da aplicação de biotecnologias. A fim de reduzir custos e otimizar
7 seus resultados, este estudo teve como objetivos avaliar o efeito de novos protocolos
8 sobre a indução e sincronização de ovulação, quantidade de edema endometrial bem
9 como taxa de desenvolvimento e diâmetro folicular. Foram utilizadas 145 éguas da raça
10 Campolina, entre três e 14 anos, em Conselheiro Lafaiete – MG, Brasil. Na presença de
11 um folículo ≥ 30 mm e de edema endometrial, no mínimo, grau 2 (0-5), as éguas foram
12 randomicamente separadas em grupos e tratadas no dia seguinte (Hora 0) com: 1,0mg
13 de deslorelina (I.M.) (G1; n=20); 0,5mg de deslorelina (I.M.) (G2; n=20); 2.000UI de
14 hCG (I.V.) (G3; n=20); 750UI de hCG (I.V.) (G4; n=20); 1,0mg de deslorelina (I.M.) e
15 2.000UI de hCG (I.V.) (G5; n=15); 0,5mg de deslorelina (I.M.) e 750UI de hCG (I.V.)
16 (G6; n=10); 10,0mg de ECP (I.M.) (G7; n=10) e, por fim, 1,0mg de deslorelina (I.M.),
17 após pré-tratamento com 10,0mg de ECP (I.M.) no dia anterior (G8; n=10). Vinte éguas
18 não foram tratadas, utilizadas como controle (GC; n=20). As avaliações ultra-
19 sonográficas diárias foram conduzidas até a ovulação (D0) ou Hora 120, o que
20 ocorresse primeiro. A análise estatística valeu-se do Statistical Analysis System (SAS).
21 A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas da indução no G1 ao G6 foi similar e $\geq 75\%$. No
22 G7, esta foi de 20%, inferior ($P < 0,01$) à obtida no G1 ao G6. Verificou-se taxa de 40%
23 no G8, menor ($P < 0,01$) que a do G5 e G6 (de 100%) e similar aos demais. O ECP não
24 foi capaz de induzir ou sincronizar as ovulações, apesar de estimular um aumento no
25 grau de edema endometrial. Não houve benefício do pré-tratamento com ECP em éguas
26 induzidas com deslorelina. O edema endometrial foi maior na Hora 0 em comparação
27 ao D0, quando o G1 ao G6 apresentaram maior quantidade de edema endometrial
28 ($P < 0,01$) em relação ao GC. Nenhum protocolo impediu o desenvolvimento folicular
29 nas primeiras 24 horas, sendo estas taxas estatisticamente semelhantes. Nos grupos
30 tratados, o diâmetro folicular pré-ovulatório foi menor, com exceção do G7. Observou-
31 se no GC um aumento ($P < 0,05$) no diâmetro folicular até dois dias antes da ovulação.

32 **Palavras-chave:** égua; ovulação; hCG; deslorelina; ECP.

1 **EVALUATION OF NEW PROTOCOLS TO INDUCE AND SYNCHRONIZE**
 2 **OVULATIONS IN MARES.**

3
 4 **ABSTRACT**

5 Ovulation inductors are routinely used in the equine species, especially when modern
 6 reproductive technologies are applied. In order to reduce costs and optimize their
 7 results, the present study aimed to evaluate the effect of new treatment protocols on
 8 ovulation induction and synchronization, endometrial edema as well as follicular
 9 diameter and development rate. One hundred and forty-five Campolina breed mares,
 10 aging three to 14 years, from Conselheiro Lafaiete – MG, Brazil, were used.
 11 Prostaglandin-induced estrous mares showing one follicle ≥ 30 mm and at least grade 2
 12 (0-5) endometrial edema were randomly assigned to different groups and treated, at the
 13 following day (Hour 0), with either: 1.0mg of deslorelin (I.M.) (G1; n=20); 0.5mg of
 14 deslorelin (I.M.) (G2; n=20); 2.000UI of hCG (I.V.) (G3; n=20); 750UI of hCG (I.V.)
 15 (G4; n=20); 1.0mg of deslorelin (I.M.) and 2.000UI of hCG (I.V.) (G5; n=15); 0.5mg of
 16 deslorelin (I.M.) and 750UI of hCG (I.V.) (G6; n=10); 10.0mg of ECP (I.M.) (G7;
 17 n=10) and 1.0mg of deslorelin (I.M.), 24 hours post-injection with 10.0mg of ECP
 18 (I.M.) (G8; n=10). Twenty mares served as control (GC; n=20). Ultra-sonography was
 19 daily performed until an ovulation (D0) or Hour 120, whichever occurred first. Data
 20 was evaluated through the Statistical Analysis System (SAS). Ovulation rate between
 21 24 and 48 hours post-induction in G1 to G6 was $\geq 75\%$ and statistically similar
 22 ($P > 0.05$). Obtained G7 rate was 20%, lower ($P < 0.01$) than in G1 to G6. G8 showed a
 23 40% rate, which was lower ($P < 0.01$) than G5 and G6 and similar to the remaining
 24 groups. ECP treatment was unable to induce or synchronize ovulations, although mares
 25 showed higher endometrial edema scores the day after its injection. Deslorelin-induced
 26 mares did not benefit from pre-treatment with ECP. Higher endometrial edema scores
 27 were detected at Hour 0 compared to D0, when G1 to G6 showed higher ($P < 0.01$)
 28 edema scores than control. Used protocols did not prevent follicular development
 29 during the first 24 hours post-induction, similar between groups. Induced mares
 30 ovulated from smaller follicles, except for G7. Follicle diameter increased ($P < 0.05$) in
 31 control until two days before ovulation.

32 **Key-words:** mare, ovulation; hCG; deslorelin; ECP.

33

EVALUACIÓN DE NUEVOS PROTOCOLOS PARA INDUCIR Y SINCRONIZAR OVULACIONES EN LAS YEGUAS.

RESUMEN

Inductores de ovulación se usan rutinariamente en el equino, sobre todo cuando se aplican las modernas tecnologías de reproducción. Con el fin de reducir costos y optimizar sus resultados, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del uso de nuevos protocolos de tratamiento en la inducción y sincronización de la ovulación, edema endometrial, así como en el diámetro y desarrollo folicular. Hemos utilizado 145 yeguas Campolina de edades entre 3 y 14 años en Conselheiro Lafaiete - MG, Brasil. En presencia de un folículo ≥ 30 mm y edema endometrial en al menos de grado 2 (0-5), yeguas fueron separadas al azar en grupos y drogadas al día siguiente (Tiempo 0) con: 1,0mg de deslorelina (I.M.) (G1; n=20); 0,5mg de deslorelina (I.M.) (G2; n=20); 2.000UI de hCG (I.V.) (G3; n=20); 750UI de hCG (I.V.) (G4; n=20); 1,0mg de deslorelina (I.M.) y 2.000UI de hCG (I.V.) (G5; n=15); 0,5mg de deslorelina (I.M.) y 750UI de hCG (I.V.) (G6; n=10); 10,0mg de ECP (I.M.) (G7; n=10) y, por último, 1,0mg de deslorelina (I.M.) después del tratamiento previo con 10,0mg de ECP (I.M.) el día anterior (G8; n=10). Veinte yeguas no fueron tratadas (GC; n=20). Las evaluaciones de ultrasonido se realizaron todos los días hasta la ovulación (D0) o Tiempo 120, lo que vino primero. Los datos fueron evaluados estadísticamente mediante el Statistical Analysis System (SAS). La tasa de ovulación entre 24 y 48 horas de inducción en los grupos G1 a G6 fue similar y $\geq 75\%$. El G7 tuvo una tasa de 20%, el cual fue menor ($P < 0,01$) que la obtenida en los G1 a G6. Hubo una tasa de 40% en el G8, menor ($P < 0,01$) que el G5 y G6 (100%) y similar a los otros. El ECP no fue capaz de inducir o sincronizar la ovulación, sin embargo de estimular un aumento en el grado de edema endometrial. No se obtuvieron beneficios de pre-tratamiento con ECP en las yeguas inyectados con deslorelina. El edema endometrial fue mayor en la Hora 0 en comparación con D0, cuando el G1 a G6 mostraron un grado más elevado de edema endometrial ($P < 0,01$) en comparación con el GC. No hay protocolo impidiendo el desarrollo folicular en las primeras 24 horas, cuando dichas tasas son estadísticamente similares. A excepción de G7, el diámetro del folículo preovulatorio fue menor en los grupos tratados. En el control, se observó un incremento ($P < 0,05$) de diámetro folicular hasta dos días anteriores a la ovulación.

Palabras-clave: yeguas, ovulación, hCG, deslorelina, ECP.

1 INTRODUÇÃO

2

3 Na espécie eqüina, há grande variação na duração do estro e no intervalo entre o
4 seu início e a ovulação. Estimar com precisão o momento ovulatório se torna
5 necessário, pois maiores taxas de concepção são obtidas quando o sêmen é depositado
6 no trato reprodutivo da égua próximo à ovulação (1). A indução de ovulação é um
7 procedimento rotineiro quando o sêmen que se pretende utilizar é limitado/de um
8 garanhão muito requisitado ou em éguas apresentando endometrite pós-cobertura (2).
9 Medicamentos objetivando induzir e sincronizar as ovulações são usualmente utilizados
10 em doadoras de embriões (3) ou de oócitos (4), em especial quando estas são
11 inseminadas com sêmen criopreservado (5).

12 O medicamento mais utilizado para induzir ovulações é a gonadotrofina
13 coriônica humana (hCG) (6). Devido a sua semelhança com o LH, o hCG estimula seus
14 receptores foliculares, mimetizando suas ações envolvendo a maturação oocitária,
15 folicular e a ovulação (7). Uma aplicação de hCG resulta em resposta ovulatória entre
16 24 e 48 horas em aproximadamente 80% dos animais (5,8,9). Contudo, o uso repetido
17 desta gonadotrofina reduz sua eficácia, presumidamente pela formação de anticorpos
18 (7,10,11).

19 Aproximadamente 2000 análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas
20 (GnRH) já foram sintetizados (12), estimulando a ovulação através da liberação de LH
21 endógeno (13). Dentre eles, destaca-se o acetato de deslorelina, cuja potência é cem
22 vezes maior que a do GnRH (14). A deslorelina serve como alternativa nos animais que
23 não respondem da forma esperada ao hCG, fato este comum após repetidas aplicações
24 dentro de uma estação de monta ou em éguas mais velhas (5). Assim como o hCG, a
25 aplicação de deslorelina resulta em resposta ovulatória entre 24 e 48 horas em
26 aproximadamente 80% dos animais (9,15,16).

27 Em vacas, o cipionato de estradiol (ECP) se presta à indução ovulatória, ao
28 estimular a ocorrência de um pico de LH (17). Apesar de Segismundo et al. (18) terem
29 observado a capacidade do ECP em induzir a ovulação dentro de um período de 72
30 horas em 83,3% das éguas tratadas, Fleury et al. (15) verificaram retardo até a ovulação,
31 razão pela qual seu efeito sobre a indução e sincronização da ovulação eqüina ainda
32 permanece incerto.

33 Os protocolos de indução atualmente utilizados na espécie eqüina possuem como
34 limitações o seu custo, bem como, em algumas situações, resultados insatisfatórios

1 quanto à indução e sincronização das ovulações. O presente estudo tem como objetivos
2 investigar a eficácia de novos protocolos de indução de ovulação, sendo proposto o uso
3 de cipionato de estradiol e da associação de deslorelina e hCG nas doses convencionais
4 ou sub-doses.

6 MATERIAL E MÉTODOS

8 Seleção dos animais, avaliações e parâmetros ultra-sonográficos

10 Este experimento foi conduzido em dois Haras no município de Conselheiro
11 Lafaiete, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 237 éguas da raça Campolina, entre
12 três e 14 anos de idade (7,3 anos de média), 350 a 650 quilogramas e boa condição
13 corporal. As avaliações foram realizadas com aparelho de ultra-sonografia, equipado
14 com transdutor linear de 5,0 Megahertz (Chison V8300® – China). Todos os animais
15 encontravam-se na estação ovulatória.

16 Antes que fossem separados em grupos, os animais foram diariamente avaliados
17 até a ocorrência de uma ovulação espontânea, para que fossem tratados, sete dias após,
18 com 5,0mg de dinoprost trometamina (I.M; Lutalyse® – Laboratórios Pfizer – Brasil).
19 Quatro dias depois, foram retomadas as avaliações ultra-sonográficas diárias. O
20 diâmetro dos dois maiores folículos foi determinado considerando-se a média da
21 máxima área transversal da altura e da largura de uma simples imagem “congelada” no
22 monitor do aparelho de ultra-som. A eco-textura do endométrio foi classificada por
23 meio de um sistema de escores (19) de 0 a 5 (mínimo e máximo) da imagem uterina.
24 Foram excluídos os ciclos estrais quando da detecção de edema endometrial grau 5. Da
25 mesma forma, quando da identificação de mais do que um folículo ≥ 25 mm um dia antes
26 do momento da indução de ovulação.

28 Grupos e análise estatística

30 Ao surgimento de um folículo ≥ 30 mm e edema endometrial de, no mínimo, grau
31 2, 145 éguas foram randomicamente separadas em diferentes grupos, para que sua
32 ovulação fosse induzida no dia subsequente. Considerou-se como Hora 0 o momento da
33 indução de ovulação. O dia seguinte foi denominado de Hora 24, e assim
34 sucessivamente. A partir da Hora 0, as avaliações ultra-sonográficas diárias foram

1 conduzidas até a detecção de uma ovulação (D0) ou até a Hora 120, o que ocorresse
2 primeiro. Para os animais tratados com hCG, administrou-se o produto Vetecor®
3 (Laboratório Hertape Calier – Brasil); para os injetados com cipionato de estradiol,
4 utilizou-se o E.C.P.® (Laboratórios Pfizer – Brasil). O acetato de deslorelina foi
5 produzido no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia
6 Veterinária da UNESP – Campus de Botucatu, Brasil. As éguas foram aleatoriamente
7 separadas nos seguintes grupos experimentais:

8

9 * G1 (n=20): 1,0mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação
10 lenta.

11 * G2 (n=20): 0,5mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação
12 lenta.

13 * G3 (n=20): 2.000UI de hCG (I.V.).

14 * G4 (n=20): 750UI de hCG (I.V.).

15 * G5 (n=15): 1,0mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação
16 lenta e 2.000UI de hCG (I.V.).

17 * G6 (n=10): 0,5mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação
18 lenta e 750UI de hCG (I.V.).

19 * G7 (n=10): 10,0mg de ECP (I.M.).

20 * G8 (n=10): 1,0mg de acetato de deslorelina (I.M.) em veículo injetável de liberação
21 lenta, 24 horas após pré-tratamento com 10,0mg de ECP (I.M.).

22 * GC (n=20): As éguas deste grupo não receberam tratamento, sendo utilizadas como
23 controle.

24

25 A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas, o grau de edema endometrial, bem como
26 o diâmetro folicular e sua taxa de desenvolvimento foram avaliados utilizando-se o
27 Statistical Analysis System, sendo a diferença significativa quando $P < 0,05$.

28

29 **RESULTADOS**

30

31 A taxa de ovulação entre 24 e 48 horas após a indução foi semelhante entre o G1
32 ao G6. Todas as éguas (100%) do G5 e G6 ovularam entre 24 e 48 horas após a
33 indução; isto ocorreu em 80% das éguas do G1, G2 e G4, e em 75% dos animais do G3.
34 Verificou-se uma maior porcentagem ($P < 0,01$) de éguas ovulando entre 24 e 48 horas

1 da aplicação de um indutor de ovulação no G1 ao G6 em relação ao G7 e GC. O G8
2 apresentou taxa de ovulação de 40%, somente inferior ($P < 0,01$) ao G5 e G6. Nos grupos
3 controle, G2, G3 e G7, 10% das ovulações foram detectadas na Hora 24, em
4 comparação ao G4 (15%) e G8 (20%). Verificou-se a formação de folículos
5 hemorrágicos anovulatórios no G1 (2/20; 10%), G2 (1/20; 5%), G3 (1/20; 5%), G7
6 (3/10; 30%) e G8 (2/10; 20%).

7 O grau de edema endometrial na Hora 0 foi maior ($P < 0,05$) no G8 ($3,17 \pm 0,43$),
8 cujas éguas foram pré-tratadas com 10,0mg de ECP (I.M.) 24 horas antes da indução
9 com 1,0mg de deslorelina (I.M.), sendo que os demais grupos apresentaram entre $2,07 \pm$
10 $0,50$ e $2,6 \pm 0,53$. Na Hora 24, este grau foi maior ($P < 0,05$) no G7 (10,0mg de ECP;
11 $2,95 \pm 0,83$), enquanto os demais obtiveram valores entre $1,65 \pm 0,73$ e $2,15 \pm 0,83$. A
12 partir da Hora 48, esta variável não foi avaliada, devido à ocorrência de ovulações. Foi
13 observada redução ($P < 0,001$) no valor médio de edema endometrial no D0 em
14 comparação à Hora 0. Esta diminuição ocorreu um dia antes da ovulação (D-1) em
15 todos os grupos ($P < 0,0001$) com exceção do G5, G6 e G7.

16 No D-1, o GC apresentou o menor valor numérico médio no grau de edema
17 endometrial ($1,55 \pm 0,54$), sendo inferior ($P < 0,05$) ao obtido no G1, G4 e G8. O maior
18 valor numérico médio ($2,25 \pm 0,46$) foi identificado no G8, o qual foi superior ($P < 0,05$)
19 ao visualizado no G5 ($1,67 \pm 0,56$) e GC. Com exceção do G8 e do GC, os valores
20 médios no grau de edema endometrial não diferiram ($P > 0,05$). No D0, o GC apresentou
21 o menor grau ($P < 0,01$) de edema endometrial ($0,425 \pm 0,47$) em comparação aos grupos
22 G1 ao G6, entre $0,73 \pm 0,56$ e $0,95 \pm 0,37$. O G7 ($0,71 \pm 0,57$) e o G8 ($0,72 \pm 0,56$)
23 obtiveram valores similares aos demais.

24 A taxa de desenvolvimento folicular entre a Hora 0 e 24 foi semelhante ($P > 0,05$)
25 dentro dos grupos estudados, de, respectivamente: $3,37\text{mm} \pm 1,55$ (GC), $2,73\text{mm} \pm 1,34$
26 (G1), $3,29\text{mm} \pm 2,34$ (G2), $2,49\text{mm} \pm 2,07$ (G3), $3,18\text{mm} \pm 1,53$ (G4), $2,76\text{mm} \pm 1,43$
27 (G5), $2,29\text{mm} \pm 1,36$ (G6), $2,91\text{mm} \pm 1,98$ (G7) e $2,30\text{mm} \pm 1,0$ (G8). Entre as Horas
28 24 e 48, a comparação desta variável não foi realizada, devido à ocorrência de
29 ovulações.

30 O diâmetro folicular na Hora 0 e na Hora 24 foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos.
31 A avaliação desta variável não pôde ser realizada em todos os grupos na Hora 48,
32 devido à ocorrência de ovulações. Todos os grupos apresentaram aumento significativo
33 no diâmetro folicular entre a Hora 0 e o D-1. Neste último dia, os maiores diâmetros
34 foliculares médios pré-ovulatórios ($P < 0,01$) foram obtidos no G7 ($42,19 \pm 2,71$) e no

1 GC ($41,42 \pm 3,60$), em comparação ao G1 até o G5, entre $38,54 \pm 2,03$ e $39,10 \pm 1,84$.
2 Os diâmetros médios no G6 e G8 apresentaram tendência a serem inferiores ($P < 0,09$)
3 aos obtidos no G7 e GC.

4 No grupo controle, detectou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) no diâmetro
5 folicular até dois dias antes da ovulação (D-2). Aumento semelhante não foi observado
6 entre o D-2 e o D0, isto é, a taxa de crescimento folicular próxima à ovulação não foi
7 significativa ($P > 0,05$) no grupo controle. O diâmetro folicular médio obtido no GC foi
8 de, respectivamente, $38,38 \pm 2,71$ no D-3, $40,82 \pm 3,95$ no D-2 e $41,42 \pm 3,60$ no D-1.

9

10 **DISCUSSÃO**

11

12 As taxas de ovulação entre 24 e 48 horas obtidas com o uso de ambas as doses de
13 deslorelina (1,0mg e 0,5mg), de 80%, não diferiram das encontradas na literatura para
14 formulações injetáveis similares (15,16) ou sob forma de implante (9). Em seu estudo,
15 Fleury et al. (15) verificaram que as éguas tratadas com 0,5mg de deslorelina ovularam,
16 em média, cinco horas após às tratadas com 1,0mg. Tal comportamento não pôde ser
17 observado no presente experimento, já que as avaliações foram realizadas em intervalos
18 de 24 horas.

19 As taxas de ovulação entre 24 e 48 horas para os grupos induzidos com 2.000UI e
20 750UI de hCG (G3 e G4; de 75% e 80%, respectivamente) foram similares às
21 encontradas na literatura quando da utilização de hCG nas doses preconizadas (5,6,8) ou
22 em sub-doses, de 1.000UI (20) e 750UI (21). Através do uso de doses inferiores, há
23 redução substancial no custo da indução com hCG ou deslorelina. Além de baratear o
24 custo, doses inferiores de hCG podem formar quantidades menores de anticorpos (21).
25 No presente estudo, apenas um ciclo estral por égua foi avaliado, razão pela qual não se
26 observou o efeito de seguidas aplicações de hCG, na dose preconizada ou sub-dose,
27 sobre sua eficácia.

28 Todas as éguas (100%) do G5 (1,0mg de deslorelina e 2.000UI de hCG) e G6
29 (0,5mg de deslorelina e 750UI de hCG) ovularam entre 24 e 48 horas, sendo esta
30 porcentagem superior à obtida no grupo controle, G7 (10,0mg de ECP) e G8 (10,0mg de
31 ECP 24 horas antes de 1,0mg de deslorelina). Este resultado pode ser decorrente do
32 suposto estímulo à maturação folicular do uso combinado destes indutores (4).

33 Sabe-se que os análogos de GnRH estimulam a ovulação através da liberação de
34 LH endógeno (13). Além de estimular a liberação de LH (22), o hCG se liga a seus

1 receptores foliculares, mimetizando suas ações (7). A imediata redução nas
2 concentrações circulantes de estrógeno, detectadas em éguas induzidas com o hCG, tem
3 sido incriminada como responsável pelo pico de LH quando da aplicação desta
4 gonadotrofina (22,23). Sabe-se da existência de variadas isoformas de receptores de LH
5 nas células da granulosa de vacas (24). Estas isoformas podem apresentar afinidades
6 distintas pelas moléculas de hCG e LH endógeno, como na espécie humana (25). É
7 possível que isto também ocorra em folículos eqüinos, justificando os resultados
8 satisfatórios obtidos com o uso combinado destes indutores. Para que um possível efeito
9 sinérgico do uso de ambos indutores seja confirmado, são necessários estudos avaliando
10 as concentrações plasmáticas de LH em éguas tratadas.

11 Em suma, a taxa de ovulação entre 24 e 48 horas obtida nos grupos G1 a G6 foi
12 similar e $\geq 75\%$, demonstrando que o emprego do hCG e da deslorelina, associado ou
13 não, seja nas doses preconizadas (2.000UI e 1,0mg, respectivamente) ou em sub-doses
14 (750UI e 0,5mg), induz e sincroniza a ovulação de maneira eficaz na espécie eqüina.

15 A menor taxa de ovulação entre 24 e 48 horas nos grupos tratados, de apenas
16 20%, foi obtida no G7. Esta foi similar à verificada no controle, inferior à dos grupos
17 G1 a G6 e estatisticamente semelhante à do G8. Não houve, no G7, sincronização das
18 ovulações. Apesar de alta, a dose aplicada teve por objetivo mimetizar os resultados de
19 Segismundo et al. (18), que observaram a ovulação em 83,3% das éguas dentro de um
20 período de 72 horas da injeção.

21 Os indutores de ovulação tradicionalmente utilizados na espécie eqüina possuem
22 seu mecanismo de ação em torno do LH, seja estimulando sua liberação pela pituitária
23 ou mimetizando suas ações. O efeito positivo da administração de estradiol foi
24 demonstrado em estudos anteriores, seja em éguas íntegras ou ovariectomizadas.
25 Maiores concentrações circulantes de LH foram detectadas, durante o verão, em pôneis
26 ovariectomizadas submetidas a tratamento com estradiol (26). Quando da aplicação de
27 uma única injeção de estradiol, Miller et al. (27) observaram reduções na concentração
28 de LH nas primeiras horas, as quais foram transitórias e seguidas de aumento entre oito
29 e 12 horas.

30 Recentemente, correlação inversamente proporcional entre estes hormônios foi
31 demonstrada durante o "plateau", com substancial incremento nas concentrações de LH
32 quando a quantidade de estrógeno circulante entra em declínio (28). Ginther et al. (29)
33 verificaram que administrações de estrógeno durante várias fases do estro reduziram as
34 concentrações endógenas de LH, sendo este efeito dose-dependente. De acordo com

1 estes autores, os resultados contrastantes são decorrentes do uso de doses excessivas de
2 estrogênio, conjugado ou não, e da infreqüente coleta de sangue dos animais, a cada 24
3 horas. No presente estudo, além da fonte do estrógeno ter sido o cipionato de estradiol,
4 o qual possui meia-vida longa, a dose utilizada foi alta, dez vezes superior à empregada
5 na indução de vacas (17).

6 Diante dos resultados conflitantes presentes na literatura, é difícil supor o efeito
7 da indução ou pré-tratamento com 10,0mg de ECP sobre as concentrações circulantes
8 de LH. O resultado da aplicação de estrógeno pôde ser observado ultra-
9 sonograficamente no G7 e G8, já que houve aumento no grau de edema endometrial
10 passadas 24 horas. Através da avaliação dos resultados obtidos no presente
11 experimento, pode-se afirmar que a indução e sincronização da ovulação com 10,0mg
12 de ECP foi ineficaz.

13 O G8 apresentou taxa de ovulação de 40% entre 24 e 48 horas, inferior à dos
14 grupos G5 e G6 e semelhante a dos demais. As éguas do G8 foram pré-tratadas com
15 10,0mg de ECP, seguido de 1,0mg de deslorelina em veículo injetável de liberação lenta
16 na Hora 0. Apesar de estatisticamente semelhantes, a taxa de ovulação entre 24 e 48
17 horas no G1 foi numericamente superior, de 80%, não havendo benefício no pré-
18 tratamento com o ECP.

19 Ao utilizarem o cipionato de estradiol em conjunto com a deslorelina, Fleury et al.
20 (15) observaram que o estrógeno retardou a indução de ovulação. É possível que a
21 aplicação de estrógeno influencie negativamente as concentrações circulantes de LH,
22 seja por longos períodos ou de forma transitória, o suficiente para interferir no efeito da
23 deslorelina. Inibição semelhante ocorre em éguas superovuladas com FSH equino
24 purificado, as quais apresentam, durante o estro, concentrações de estrógeno superiores
25 às fisiológicas e a ausência de uma curva ascendente peri-ovulatória de LH (30).

26 Verificou-se a formação de folículos hemorrágicos anovulatórios no G1 (2/20;
27 10%), G2 (1/20; 5%), G3 (1/20; 5%), G7 (3/10; 30%) e G8 (2/10; 20%). Apesar de não
28 avaliada estatisticamente, observou-se uma maior incidência de animais desenvolvendo
29 folículos hemorrágicos anovulatórios no G7 e G8, tratados com cipionato de estradiol.

30 Com exceção do G7 e G8, cujo grau de edema endometrial 24 horas após a
31 injeção foi superior, os valores de edema endometrial não diferiram, tanto no momento
32 da indução de ovulação quanto no seguinte. O resultado no G7 e G8 se justifica, pois o
33 edema endometrial depende da concentração de estrógenos (19). Apesar de
34 estatisticamente semelhantes, foram identificados valores numericamente superiores, no

1 grupo controle, no grau de edema endometrial na Hora 24, em relação aos grupos G1 a
2 G6. Isto já foi verificado na indução com o hCG (22,23). Diante dos resultados do
3 presente estudo, supõe-se que reduções similares nas concentrações circulantes de
4 estradiol ocorram, também, após a indução com deslorelina.

5 Houve redução no valor médio do grau de edema endometrial no dia da ovulação
6 em comparação ao momento da indução. Este resultado era esperado, pois a intensidade
7 de edema endometrial diminui gradativamente com a proximidade ovulatória (19).
8 Diminuição semelhante foi observada um dia antes da ovulação em todos os grupos,
9 com exceção do G5, G6 e G7. Pelo fato da ovulação no G5 e G6 ter sido detectada na
10 Hora 48 em 100% dos animais, é possível que este resultado seja devido ao tempo
11 insuficiente para que o edema fosse gradativamente dissipado. Já no G7, apesar do
12 grande intervalo entre a indução de ovulação e a sua ocorrência, o alto grau de edema na
13 Hora 24 pode não ter sofrido considerável diminuição, em função da longa meia-vida
14 do ECP.

15 Um dia antes da ovulação, o grupo controle apresentou o menor valor numérico
16 médio no grau de edema endometrial em relação aos demais grupos. Isto se tornou
17 evidente no dia da ovulação, quando os valores de edema endometrial do GC foram
18 inferiores aos verificados no G1 ao G6. O G7 e o G8 obtiveram valores intermediários,
19 os quais foram similares devido ao pequeno número de animais presentes. O grau de
20 edema endometrial nos grupos tratados com cipionato de estradiol pode ter sido
21 influenciado pela longa meia-vida do composto e alta dose utilizada. Esses resultados
22 estão em concordância com os obtidos por Cuervo-Arango e Newcombe (31), onde as
23 éguas induzidas com 1.500UI de hCG pela via sub-cutânea ou 2,1mg de deslorelina sob
24 forma de implante apresentaram valores numéricos superiores no grau de edema
25 endometrial 24, 16 e oito horas precedendo a ovulação e no momento de sua detecção.
26 Uma possível explicação é que os agentes indutores de ovulação levam a alterações nos
27 hormônios esteróides, seja em sua concentração ou no período em que estes são capazes
28 de estimular os receptores endometriais de progesterona (31).

29 Não houve diferença no diâmetro folicular nas Horas 0 e 24. Todos os grupos
30 apresentaram aumento significativo no diâmetro folicular entre a Hora 0 e um dia antes
31 da ovulação. A taxa de desenvolvimento folicular entre as Horas 0 e 24 foi similar,
32 sendo o maior valor numérico médio observado no GC ($3,37\text{mm} \pm 1,55$). Apesar desta
33 variável não ter sido estatisticamente avaliada entre as Horas 24 e 48, pela ocorrência de
34 ovulações, seu maior valor numérico neste período foi novamente identificado no GC

1 (2,57mm \pm 1,93). Neste grupo, o diâmetro folicular apresentou aumento somente até
2 dois dias antes da ovulação (D-2). A taxa de desenvolvimento folicular obtida no GC e
3 este comportamento estão em acordo com dados presentes na literatura (32). Entretanto,
4 a taxa obtida nos grupos induzidos com hCG contradiz Gastal et al. (23), em cujo
5 experimento o diâmetro folicular permaneceu praticamente inalterado nas éguas
6 induzidas com 2.500UI (I.V.) deste hormônio. Por outro lado, Silva et al. (33)
7 verificaram um aumento no diâmetro folicular, 30 horas da indução com dose
8 semelhante de hCG, somente no folículo pré-ovulatório de éguas que se tornaram
9 gestantes após monta natural. Nenhum protocolo utilizado no presente estudo, seja com
10 hCG, deslorelina ou cipationato de estradiol, associado ou não, nas doses preconizadas ou
11 em sub-doses, foi capaz de alterar a taxa de desenvolvimento folicular.

12 O G7 e GC obtiveram os maiores diâmetros foliculares médios pré-ovulatórios em
13 comparação aos grupos G1 a G5, um dia antes da ocorrência de uma ovulação. Os
14 diâmetros médios no G6 e G8 tenderam a serem inferiores ($P < 0,09$) aos obtidos no G7 e
15 GC, não atingindo significância, possivelmente, devido a seu pequeno número de
16 animais e ciclos estrais. No presente estudo, observou-se um menor diâmetro folicular
17 pré-ovulatório quando da indução com hCG e deslorelina, associados ou não, nas doses
18 preconizadas ou sub-doses, mesmo quando se aplicou este análogo de GnRH em éguas
19 pré-tratadas com o ECP. Isto já foi demonstrado com as doses preconizadas de hCG
20 (23,31) ou de deslorelina (31).

21

22 **CONCLUSÕES**

23

24 O uso do hCG e do acetato de deslorelina, associado ou não, seja nas doses
25 preconizadas ou em sub-doses, induz e sincroniza a ovulação de maneira eficaz. Foi
26 observado um efeito sinérgico quando estes indutores foram utilizados em conjunto. Por
27 outro lado, o ECP não foi capaz de induzir ou sincronizar as ovulações. Não houve
28 benefício do pré-tratamento com ECP em éguas induzidas com 1,0mg de acetato de
29 deslorelina.

30 No dia da ovulação, observa-se redução no grau de edema endometrial em
31 comparação ao momento da indução. Verifica-se um maior grau de edema endometrial
32 em relação ao controle no dia da ovulação de éguas induzidas com hCG ou acetato de
33 deslorelina.

1 Nenhum protocolo utilizado neste experimento foi capaz de interferir na taxa de
2 desenvolvimento folicular nas primeiras 24 horas após a indução, as quais foram
3 similares. O diâmetro folicular pré-ovulatório é menor nos protocolos em que se
4 emprega o hCG ou o acetato de deslorelina, mesmo que em conjunto com o ECP.
5 Observa-se nos animais não tratados um aumento progressivo no diâmetro folicular até
6 dois dias antes da ovulação.

7

8 **REFERÊNCIAS**

9

10 1. Woods J, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effect of time of insemination relative to
11 ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Veterinary*
12 *Journal*. 1990; 22:410-5.

13

14 2. McCue PM. Induction of ovulation. In: Robinson NE. *Current therapy in equine*
15 *medicine 5*. Philadelphia: Saunders, 2003, p.240-242.

16

17 3. Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies
18 to horse breeding. *Reproduction of Domestic Animals*. 2005; 40:310-29.

19

20 4. Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL. Factors
21 affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares.
22 *Theriogenology*. 2005; 64:519-27.

23

24 5. Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. Retrospective study on the
25 efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen.
26 *Equine Veterinary Education*. 2000; 2:404-10.

27

28 6. McCue PM, Hudson JJ, Bruemmer JE, Squires EL. Efficacy of hCG at inducing
29 ovulation: a new look at an old issue. *Lexington*; 2004 [cited 2010 Jul 10]. Available
30 from <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2004/McCue/chapter.asp?LA=1>>.

31

32 7. Wilson CG, Downie CR, Hughes JP, Roser JF. Effects of repeated hCG injections on
33 reproductive efficiency in mares. *Equine Veterinary Science*. 1990; 10:301-8.

- 1 8. Voss JL, Sullivan JJ, Picket BW, Parker WG, Burwash LD, Larson LL. The effect of
2 hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. *Journal of*
3 *Reproduction and Fertility Supplement*. 1975; 23:297-301.
4
- 5 9. Samper JC, Jensen S, Sergeant J, Estrada A. Timing of induction of ovulation in
6 mares treated with Ovuplant or Chorulon. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2002;
7 22:320-3.
8
- 9 10. Sullivan JJ, Parker WG, Larson LL. Duration of estrus and ovulation time in
10 nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous
11 periods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1973; 162:895-8.
12
- 13 11. Siddiqui MAR, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Effect of hCG in the
14 presence of hCG antibodies on the follicle, hormone concentrations and oocyte in
15 mares. *Reproduction of Domestic Animals*. 2009; 44:474-9.
16
- 17 12. Karten MJ, Rivier JE. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-
18 function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and
19 perspective. *Endocrine Reviews*, 1986; 7:44-6.
20
- 21 13. Barrier-Battut I, Le Poutre N, Trocherie E, Hecht S, Grandchamp des Raux A,
22 Nicaise JL, et al. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare.
23 *Theriogenology*. 2001; 55:1679-95.
24
- 25 14. Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal Reproduction*
26 *Science*. 2005; 88:115-26.
27
- 28 15. Fleury PDC, Alonso MA, Alvarenga MA, Douglas RH. Intervals to ovulation after
29 treatment with oestradiol cypionate (ECP) or biorelease deslorelin (BRT-DES).
30 *Havemeyer Foundation Monograph Series*. 2004; 14:89.
31
- 32 16. Melo CM, Papa FO, Medeiros ASL, Dell'Aqua Jr. JÁ, Carmo MT, Araujo, GHM, et
33 al. Efeito da deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em
34 éguas. *Acta Scientiae Veterinariae Supplement*. 2005; 33:193.

- 1 17. Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol cypionate (ECP) on
2 ovarian dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based fixed-time AI
3 programs in beef heifers. *Theriogenology*. 2003; 60:855-65.
4
- 5 18. Segismundo R, Alvarenga MA, Gomes GM. Avaliação do cipionato e benzoato de
6 estradiol na indução e sincronização de ovulações em éguas. *Acta Scientiae Veterinariae*
7 *Supplement*. 2003; 31:562.
8
- 9 19. Samper JC. Induction of estrous and ovulation: Why some mares respond and others
10 do not. *Theriogenology*. 2008; 70:445-7.
11
- 12 20. Beal J. Indução da ovulação em éguas Crioulas com diferentes doses de
13 gonadotropina coriônica humana [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de
14 Santa Maria, 2008.
15
- 16 21. Davies Morel MCG, Newcombe JR. The efficacy of different hCG dose rates and
17 the effect of hCG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation,
18 pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Animal*
19 *Reproduction Science*. 2008; 109:189-99.
20
- 21 22. Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Cooper DA. Treatment with human
22 chorionic gonadotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate
23 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Animal Reproduction*
24 *Science*. 2009; 114:311-7.
25
- 26 23. Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture
27 and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in
28 systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in
29 mares. *Reproduction*. 2006; 131:699-709.
30
- 31 24. Nogueira MFG, Buratini Jr. J, Price CA, Castilho ACS, Pinto MGL, Barros CM.
32 Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes
33 with follicle size and regulation by FSH *In Vitro*. *Molecular Reproduction and*
34 *Development*. 2007; 74:680-6.

- 1 25. Müller T, Gromoll J, Simoni, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing
2 hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action.
3 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2003; 88:2242-9.
4
- 5 26. Garcia MC, Ginther OJ. Regulation of plasma LH by estradiol and progesterone in
6 ovariectomized mares. Biology of Reproduction. 1978; 19:477-53.
7
- 8 27. Miller PA, Wesson JA, Ginther OJ. Interaction of estradiol and a nonsteroidal
9 follicular fluid substance in the regulation of gonadotropin secretion in the mare.
10 Biology of Reproduction. 1981; 24:354-8.
11
- 12 28. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Regulation of circulating
13 gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. Biology of
14 Reproduction, 2005; 73:315-23.
15
- 16 29. Ginther OJ, Utt MD, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO. Negative effect of estradiol
17 on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares.
18 Biology of Reproduction. 2007; 77:543-50.
19
- 20 30. Machado MS, Roser JF, Greco GM, Araujo GHM, Alvarenga MA. Effect of
21 superovulatory treatment with equine pituitary extract and equine FSH on endocrine
22 profiles in mares. In: Abstract book of the 7th International Symposium on Equine
23 Embryo Transfer; 2008, Cambridge, Newmarket: R & W Communications; 2008. p. 59-
24 60.
25
- 26 31. Cuervo-arango J, Newcombe JR. Repeatability of preovulatory follicular diameter
27 and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are
28 influenced by ovulation inductors. Theriogenology. 2008; 69:681-7.
29
- 30 32. Koskinen E, Kuntsi H, Lindeberg H, Katila T. Predicting ovulation in the mare on
31 the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels.
32 Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A. 1989; 36:299-304.

- 1 33. Silva LA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Relationship between
- 2 vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares.
- 3 Animal Reproduction. 2006; 3:339-46.