



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SULPIRIDA AO PROTOCOLO DE  
INDUÇÃO DE DUPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS**

Ariel Cunhasque Bertoldi

Botucatu - SP

Abril/2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SULPIRIDA AO PROTOCOLO DE  
INDUÇÃO DE DUPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS**

Ariel Cunhasque Bertoldi

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu - SP

Abril/2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bertoldi, Ariel Cunhasque.

Efeito da adição de sulpirida ao protocolo de indução de duplas ovulações em éguas / Ariel Cunhasque Bertoldi. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Égua. 2. Acetatos. 3. Sulpirida. 4. Ovulação - Indução.

Palavras-chave: acetato de deslorelina; dupla ovulação; égua; sulpirida.

Nome do autor: Ariel Cunhasque Bertoldi

Título: EFEITO DA ADIÇÃO DE SULPIRIDA AO PROTOCOLO DE INDUÇÃO  
DE DUPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP  
- Botucatu /SP

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Jr.

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP  
- Botucatu /SP

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Haras LUB Breeding – Cesário Lange/SP

Data da defesa: 25 de abril de 2018.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Dados médios e erro padrão das variáveis entre o grupo tratado com deslorelina ou com deslorelina + sulpirida para obtenção de duplas ovulações.

..... 28

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Fisiologia do ciclo estral em éguas .....	4
2.2 Indução de múltiplas ovulações em éguas .....	6
2.3 Fatores que influenciam a resposta superovulatória .....	7
2.3.1 Momento do ciclo para início do tratamento.....	7
2.3.2 Doses e frequência de aplicação .....	7
2.3.3 Resposta ovariana .....	8
2.3.4 Agentes estimulantes da atividade ovariana .....	8
2.3.4.1 Extrato de Pituitária Equina (EPE) .....	9
2.3.4.2 Hormônio Folículo Estimulante Equino (FSH-e) .....	9
2.3.4.3 Hormônio Folículo Estimulante Equino Recombinante (FSH-re) .....	10
2.3.4.4 Hormônio liberador de Gonadotrofinas (GnRH).....	11
2.3.5 Estratégias para melhorar a resposta superovulatória .....	12
2.3.5.1 Hormônio do Crescimento ou Somatotrofina (ST) .....	12
2.3.5.2 Sulpirida .....	13
3. REFERÊNCIAS .....	15
HIPÓTESE .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
CAPÍTULO 2 .....	22
ARTIGO .....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
2.1 Animais.....	25
2.2 Controle ultrassonográfico .....	25
2.3 Grupos experimentais.....	25
2.4 Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS .....	27
4. DISCUSSÃO.....	29
5. REFERÊNCIAS .....	31

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por permitir que tudo isso fosse possível.

Aos meus pais, por todos os ensinamentos, pelas oportunidades que me proporcionaram e pelo incentivo de seguir em frente, por todo apoio, amor, carinho e confiança depositados em mim,

A minha esposa Larissa, por todo amor, companheirismo e por estar ao meu lado em todos os momentos,

Aos meus irmãos e toda minha família, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, professor Marco Antônio Alvarenga, pela orientação, exemplo e apoio. Obrigado pelo incentivo e por todos os ensinamentos.

Ao professor José Antônio Dell'Aqua Jr. pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho, além de todos os outros professores responsáveis pela minha formação, por todo apoio, ensinamentos, ajuda e por disponibilizarem todos os recursos necessários para os nossos estudos.

Ao Lorenzo e todos os amigos que fiz durante esse tempo de UNESP Botucatu.

A CER – Central Equina de Reprodução, na pessoa do Dr. Orpheu Ávila Jr., que gentilmente ofereceu toda a estrutura, bem como os animais para que fosse realizado este experimento.

Muito obrigado!!!

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

TE	Transferência de embriões
EPE	Extrato de pituitária equina
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSH-e	FSH equino
FSH-p	FSH suíno
FSH-re	FSH recombinante equino
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
LH	Hormônio luteinizante
P4	Progesterona
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
ST	Somatotrofina
rbST	Somatotrofina recombinante bovina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
Mm	Milímetros
Kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligramas
$\mu$ g	Microgramas
UI	Unidade internacional
IV	Intravenoso
IM	Intramuscular
VO	Via oral
MHz	Megahertz
%	Porcentagem



## RESUMO

BERTOLDI, A.C. EFEITO DA ADIÇÃO DE SULPIRIDA AO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE DUPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS. Botucatu - SP. 2018, p.33. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A elevação do número de ovulações por ciclo tem sido uma alternativa na tentativa de melhorar a eficiência reprodutiva de éguas em programas de transferência de embriões. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da associação de deslorelina e sulpirida para indução de duplas ovulações em éguas. Dez éguas foram utilizadas em dois grupos experimentais, acompanhados de dois ciclos controles. Após a indução da luteólise no oitavo dia pós ovulação, os animais foram submetidos a avaliação ultrassonográfica diária até a observação de ao menos dois folículos medindo entre 20 e 25mm de diâmetro, momento em que foram direcionados para os grupos de tratamento, aleatoriamente, seguindo modelo *cross over*. No grupo DES (deslorelina) os animais receberam aplicações de 150 µg de deslorelina, IM, a cada 12 horas, até que o segundo maior folículo atingisse ao menos 33mm de diâmetro, momento em que era realizada a indução das ovulações com 1.500 UI de hCG (IV). Já no grupo DES+SULP (deslorelina + sulpirida) o tratamento foi realizado da mesma forma que no grupo DES, porém associado com a administração de 1g de sulpirida, VO, uma vez ao dia, até o momento da indução das ovulações. Em ambos os grupos, os exames ultrassonográficos foram realizados diariamente, a fim de avaliar o desenvolvimento folicular, bem como a detecção das ovulações. Duplas ovulações foram observadas em 70% (7/10) dos animais do grupo DES e 50% (5/10) dos animais no grupo DES+SULP. A porcentagem de ovulações correspondentes ao número de folículos desenvolvidos foi de 81,8% (18/22) para o grupo DES e 79% (15/19) para o grupo DES+SULP, não sendo observada diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ). Concluímos que a associação da sulpirida ao tratamento com acetato de deslorelina não contribuiu para o aumento nas taxas de duplas ovulações em éguas.

**Palavras chave:** égua, acetato de deslorelina, sulpirida, dupla ovulação.

## ABSTRACT

BERTOLDI, A.C. EFFECT OF ADDITION OF SULPIRIDE TO THE PROTOCOL OF INDUCTION OF DOUBLE OVULATIONS IN MARES. Botucatu - SP. 2018, p.33. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The increase in the number of ovulations per cycle has been an alternative to improve the reproductive efficiency of mares in embryo transfer programs. In this context, the objective of the present study was to verify the effect of the association of deslorelin and sulpiride for induction of double ovulations in mares. Ten mares were used in two experimental groups, accompanied by two control cycles. After the induction of luteolysis eight days after ovulation, the animals were submitted to daily ultrasonographic evaluation until the observation of at least two follicles measuring between 20 and 25mm in diameter, at which point they were randomly assigned to the treatment groups, following crossover model. In the DES group (deslorelin) the animals received 150 µg deslorelin, IM, every 12 hours, until the second largest follicle reached at least 33 mm in diameter, at which time ovulation induction was performed with 1.500 IU of hCG, IV. In the DES + SULP (deslorelin + sulpiride) group, the treatment was performed in the same manner as in the DES group, associated with the administration of 1g of sulpiride, VO, once daily until the time of induction of ovulations. In both groups, ultrasound examinations were performed daily in order to evaluate follicular development as well as the detection of ovulations. Double ovulations were observed in 70% (7/10) of the animals of the DES group and 50% (5/10) of the animals in the DES + SULP group. The percentage of ovulations corresponding to the number of follicles developed was 81.8% (18/22) for the DES group and 79% (15/19) for the DES + SULP group, and no difference was observed between the groups ( $p > 0.05$ ). We conclude that the association of sulpiride with deslorelin acetate did not contribute to the increase in rates of double ovulation in mares.

**Key words:** mare, deslorelin acetate, sulpiride, double ovulation.

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio do cavalo no Brasil é responsável por uma parcela importante da economia, empregando mais de 3 milhões de pessoas de forma direta e indireta, movimentando mais de R\$ 16 bilhões a cada ano (BRASIL, 2016). Desta forma, é perceptível o crescimento do interesse pela utilização de biotécnicas da reprodução equina por parte de proprietários de cavalos, principalmente a transferência de embriões (TE), cujo seu maior objetivo é suprir a demanda existente em relação a produtos com elevado potencial genético.

O principal desafio do profissional que trabalha em programas de TE em equinos é elevar a eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico (Farinasso et. al., 2005). Variações consideráveis sobre os índices de fertilidade em equinos são observados, pois, diferentemente dos animais de produção, os equinos são submetidos a seleção a partir do desempenho atlético e morfológico, não levando em consideração características reprodutivas. De acordo com Alvarenga et. al. (2008), são necessários em média três ciclos estrais para que se obtenha uma gestação, considerando taxa média de recuperação embrionária em torno de 60% e índice médio de gestação após transferência de 60%.

Para se melhorar a eficiência reprodutiva em éguas, uma das alternativas apresentadas é elevar o número de ovulações por ciclo, o que levaria ao aumento das taxas de recuperação embrionária e conseqüentemente reduziria os custos envolvidos com a TE (ALVARENGA, et. al. 2008).

Quanto aos tratamentos de superovulação, os mesmos consistem em recrutar um maior número de folículos de uma determinada onda de crescimento folicular, estimulando seu crescimento e desenvolvimento até a ovulação (GINTHER, 1992). Em estudos realizados por Squires, et. al. (2003), Farinasso, et. al. (2005) e Alonso et. al. (2006), foi possível destacar a eficiência dos protocolos de superovulação em promover múltiplas ovulações em éguas, porém, apresentam eficiência reduzida, visto que as taxas de recuperação embrionária por ciclo decrescem a medida que o número de ovulações aumenta (ALVARENGA, et. al. 2001). Dentre os hormônios utilizados para este fim, o extrato de pituitária equina (EPE) e o hormônio folículo estimulante equino purificado (FSH-e) são as drogas com mais estudos até o momento. Porém, a

dificuldade de aquisição, aliada ao custo elevado e resultados inconstantes destes preparados hormonais limitam a difusão da superovulação na espécie equina (NAGAO, et. al. 2012).

Desta forma, a utilização de hormônio sintético, de baixo custo e alta disponibilidade como o acetato de deslorelina tem sido estudado a fim de promover duplas ovulações em éguas, sendo observadas taxas de duplas ovulações em aproximadamente 70% das éguas submetidas ao tratamento (NAGAO, et. al. 2012; CARMO et. al., 2013; STEIGLEDER, et. al. 2014; AZEVEDO et. al., 2015; SEGABINAZZI et. al., 2015).

A sulpirida promove a produção de prolactina que age diretamente nos ovários, regulando a população de receptores de FSH e LH dos folículos (Tibary, 2011). Diante disso, a sulpirida surge como uma possível estratégia para elevar o percentual de éguas que respondem ao protocolo de indução de duplas ovulações com deslorelina. Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da adição da sulpirida ao protocolo de indução de duplas ovulações em éguas, na tentativa de se elevar o percentual dos animais que respondem com duplas ovulações.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fisiologia do ciclo estral em éguas

As éguas são consideradas poliéstricas estacionais de dia longo, ou seja, desenvolvem diversos ciclos estrais durante um determinado período do ano, o que ocorre entre setembro e março no hemisfério sul, período quando a luminosidade durante o dia é maior (HAFEZ, 2004).

Durante o ciclo estral, hormônios envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-ovários-útero se inter-relacionam e exercem papel fundamental na ciclicidade, determinando fases específicas do ciclo (GINTHER, 1992).

O ciclo estral é regulado pela interação entre a glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio. Durante o período com maior luminosidade, a produção de melatonina pela glândula pineal é reduzida, favorecendo assim a secreção de GnRH pelo hipotálamo (GINTHER, 1992). O GnRH por sua vez, atua diretamente na hipófise desencadeando a liberação de gonadotrofinas como FSH e LH, que irão atuar basicamente nos ovários promovendo o desenvolvimento folicular e posterior ovulação.

A duração média do ciclo estral na égua é de 21 dias, sendo 7 dias de estro (fase estrogênica) e 14 dias de diestro (fase progesterônica). O estro é caracterizado por elevadas concentrações de estrógeno, produzido principalmente pelas células da granulosa dos folículos, que conferem a égua sinais característicos de estro, tais como receptividade ao macho, relaxamento e abertura da cérvix, presença de um ou mais folículos pré-ovulatórios e edema endometrial. Cerca de 24 a 48 horas antes do final do estro ocorre a ovulação, fenômeno que culmina com a liberação do ovócito e o início da formação do corpo lúteo, dando início a fase progesterônica. Nesta fase, evidenciamos concentrações altas de progesterona produzida pelo corpo lúteo no ovário, fechamento da cérvix e aumento do tônus uterino, período em que a égua não mostra sinais de receptividade ao macho (GINTHER, 1992).

Por volta do sexto dia pós ovulação, ocorre um aumento da secreção de FSH pela hipófise, culminando com o início do desenvolvimento de uma onda folicular. O pico de FSH ocorre quando os folículos atingem 13mm e diminui significativamente após a dominância folicular. Durante a fase de crescimento, o

futuro folículo dominante, bem como os folículos subordinados apresentam a mesma taxa de crescimento, aproximadamente 2-3 mm/dia. Quando o folículo dominante atinge aproximadamente 23mm, ocorre a divergência folicular, culminando com a dominância do maior folículo e a regressão dos demais folículos subordinados (GINTHER, 2004). Além da secreção de estrógeno, o folículo dominante secreta também inibina, hormônio responsável pela regressão dos folículos subordinados. Por este motivo, na maioria das vezes, temos ondas foliculares com somente um folículo dominante. O mecanismo associado a seleção folicular em éguas não é totalmente conhecido, mas acredita-se que o futuro folículo dominante possua vantagem sobre os demais folículos devido a sua maior capacidade para a produção de estradiol, bem como maior sensibilidade ao FSH e especificidade para responder ao LH através da maior quantidade de receptores de FSH e LH nas células da granulosa. Já os folículos subordinados não apresentam sensibilidade à baixas concentrações sistêmicas de FSH e LH observadas próximo a dominância folicular, visto que não possuem receptores em abundância para estes hormônios nas células da granulosa. Desta forma, acabam regredindo devido a insuficiente habilidade de resposta frente a baixas concentrações de gonadotrofinas circulantes (BERGFELT & ADAMS, 2007). Estudos demonstram que as concentrações intrafoliculares de estradiol, IGF-1, inibina-A e ativina-A aumentam de forma diferente entre o futuro folículo dominante e folículos subordinados antes do início da divergência (GINTHER et. al. 2004).

Quando o folículo dominante se torna pré-ovulatório ocorre a liberação de LH pela hipófise, fazendo com que ocorra a maturação final do oócito e ovulação (GINTHER, 1992). De acordo com Bergfelt e Adams (2007), a ovulação é um processo complexo que envolve uma sequência de eventos que leva a ruptura da parede folicular na fossa de ovulação, possibilitando assim a evacuação do fluido folicular juntamente com as células da granulosa e o complexo cumulus/oócito. A ovulação ocorre cerca de 24 horas antes do final do estro, quando o folículo pré-ovulatório atinge entre 40 e 45mm. Porém, algumas éguas podem ovular folículos menores e de consistência firme, e outras não ovularão até que o folículo atinja 50mm (SAMPER, 1997).

Apesar da espécie equina ser considerada monovulatória, em algumas éguas podem ser observadas ovulações múltiplas espontâneas, com maior

predisposição em algumas raças, tais como Puro Sangue Inglês (15 a 30%), Polo Argentino (38%), Quarto de Milha (9%) e Apaloosa (8%) (LOSINO, et. al. 2000), além da raça Brasileiro de Hipismo (53%) (Carmo et. al., 2002).

Após a ovulação, a concentração plasmática de P4 aumenta gradativamente atingindo níveis máximos por volta do 5° ou 6° dia pós ovulação, permanecendo elevados durante toda a fase progesterônica, até por volta do 15° dia pós ovulação, quando o endométrio secreta PGF2 $\alpha$ , desencadeando o início da luteólise e o retorno a fase estrogênica (HAFEZ, 2004).

## **2.2 Indução de múltiplas ovulações em éguas**

A indução de múltiplas ovulações em éguas tem sido relatada por diversos autores, com o objetivo de melhorar os índices de recuperação embrionária por ciclo, além de aumentar as taxas de coleta de oócitos para fecundação “in vitro” (SQUIRES, et. al. 2003). Atualmente, os índices de recuperação embrionária proveniente de ovulações únicas e induzidas giram em torno de 65% (ORLANDI, 2008). Os tratamentos de superovulação em éguas, como em outras espécies, consistem em recrutar o maior número de folículos de uma onda de crescimento folicular, promovendo o crescimento e a manutenção destes folículos até a ovulação (GINTHER, 1990).

Os índices de recuperação embrionária por ciclo podem ser otimizados através do aumento do número de ovulações, reduzindo substancialmente os custos envolvidos com a TE, principalmente relacionados com o envio de sêmen e preparação das receptoras que muitas vezes não são utilizadas. Além disso, é possível elevar as taxas de gestação em éguas subférteis, bem como otimizar a utilização de sêmen congelado e sêmen de garanhões com baixa fertilidade (SQUIRES et. al, 2003).



## **2.3 Fatores que influenciam a resposta superovulatória**

### **2.3.1 Momento do ciclo para início do tratamento**

A resposta de éguas cíclicas frente a protocolos de superovulação depende da população ovariana de folículos ao início do tratamento, sendo que o momento ideal é antes da divergência folicular (MEIRA E BURATINI, 1998).

Os melhores índices de ovulação por égua foram observados por Carmo (2003) com a utilização de EPE, onde o início do tratamento se deu a partir da observação de folículos entre 10 e 20mm. Já Orlandi (2008) e Nagao et. al. (2012) obtiveram melhores resultados iniciando o tratamento após a observação de folículos entre 20 e 23mm.

### **2.3.2 Doses e frequência de aplicação**

De acordo com Squires et. al. (2003), aplicações a cada 12 horas são mais efetivas na obtenção de múltiplas ovulações quando comparado a aplicações únicas diárias. Em estudos realizados por Alvarenga, et. al. (2001) e Scoggin, et. al. (2002), utilizando aplicações de 25mg de EPE a cada 12 horas, foram observadas 7,1 e 4,7 ovulações por égua, respectivamente.

Em estudo realizado por Alonso et. al. (2006) utilizando EPE, foram comparadas as doses de 6mg a cada 12 horas e 12mg uma vez ao dia. Melhores resultados foram obtidos utilizando 12mg uma vez ao dia, onde observou-se maior taxa de ovulação/égua e maior índice de recuperação embrionária.

Gimenes et.al. (2010) avaliaram a taxa de resposta superovulatória utilizando EPE nas doses de 6 ou 8mg, a cada 12 horas. Neste estudo, o tratamento foi iniciado quando os folículos mediam entre 20 e 23mm ou no oitavo dia pós ovulação, independentemente do diâmetro folicular. Melhores taxas de ovulação foram obtidas quando se utilizou 8mg a cada 12 horas, observando média de 2 ovulações por égua e um período menor de tratamento (4 a 6 dias).

### 2.3.3 Resposta ovariana

Devido a inversão anatômica entre as camadas cortical e medular no ovário da égua, uma particularidade que a diferencia das demais espécies domésticas, a ovulação nesta espécie só é possível através da fossa de ovulação (HIRANO et. al., 2009).

Ao avaliar o transporte de oócitos através do oviduto em éguas submetidas ao tratamento superovulatório com EPE duas vezes ao dia, Carmo et. al. (2006) obtiveram taxas de ovulação superiores ao grupo controle, porém as taxas de recuperação de oócito/ovulação foi de 60% em éguas superovuladas contra 85% em éguas com ovulação única, sugerindo que ocorre uma falha na captação e transporte dos oócitos em éguas com mais de 3 ovulações por ovário. Após avaliar os ovários das éguas submetidas ao protocolo de superovulação utilizando EPE e posteriormente abatidas, Carmo (2007) verificou a presença de um grande coágulo na fossa de ovulação em éguas com mais de 3 ovulações por ovário, atribuindo a este fato as taxas reduzidas de recuperação embrionária em éguas com múltiplas ovulações.

Diante disso, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de induzir duplas ovulações, o que elevaria a taxa de recuperação embrionária por ciclo. Em estudo realizado por Nagao et. al. (2012) utilizando baixas doses de acetato de deslorelina a cada 12 horas, foi possível a obtenção de duplas ovulações por ciclo em 82% das éguas.

### 2.3.4 Agentes estimulantes da atividade ovariana

Diversos hormônios já foram estudados com a finalidade de promover a estimulação da atividade ovariana em éguas e elevar as taxas de ovulação por ciclo, porém, ainda sem um consenso entre os autores em relação a um protocolo eficiente (SQUIRES; MCCUE, 2006).

Os protocolos de superovulação em éguas baseiam-se em manter os níveis séricos de FSH elevados, evitando assim a atresia de folículos menores e conseqüentemente selecionando um maior número de folículos para o crescimento e posterior ovulação (MEIRA E BURATINI, 1998).

Dentre os hormônios já utilizados para a indução de múltiplas ovulações em éguas, os que apresentaram melhores resultados foram o EPE, FSH-e, FSH-re e GnRH.

#### 2.3.4.1 Extrato de Pituitária Equina (EPE)

O EPE foi um dos primeiros preparados hormonais utilizados com o intuito de promover múltiplas ovulações em éguas (DOUGLAS, et. al., 1974). É preparado a partir de glândulas pituitárias proveniente de animais de abatedouro, contendo aproximadamente 60% de LH e 40% de FSH. Esta variação na concentração hormonal do EPE é relacionada a época do ano, estágio reprodutivo, idade e sexo dos animais utilizados (CARMO, 2003).

O EPE vem sendo utilizado há muitos anos, apresentando resultados satisfatórios nas taxas de ovulação e recuperação embrionária por ciclo (ALVARENGA et. al. 2001; SCOGGIN et. al. 2002; ORLANDI, 2008).

O número de ovulações em éguas após a utilização de EPE varia entre 1,7 e 3,8 ovulações por ciclo, onde cerca de 75% das éguas submetidas a protocolos utilizando EPE apresentam múltiplas ovulações (McCue, 1996).

Alvarenga et. al. (2001) relataram número médio de 7 ovulações por égua, bem como Scoggin et. al. (2002) que obtiveram 4 ovulações por ciclo quando utilizaram o EPE na dose de 25mg, duas vezes ao dia.

#### 2.3.4.2 Hormônio Folículo Estimulante Equino (FSH-e)

O FSH-e, assim como o EPE, também é um preparado hormonal a partir de glândulas pituitárias, porém seu processo de purificação faz com que a concentração de LH seja reduzida consideravelmente, resultando na proporção de FSH:LH em torno de 10:1 (SQUIRES; MCCUE, 2011).

Ao iniciar o tratamento com FSH-e no oitavo dia pós ovulação, na dose de 12mg a cada 12 horas, seguido de aplicação de PGF2 $\alpha$ , Niswender et. al. (2003) observaram média de 3,9 ovulações por égua, resultando em média de 1,9 embriões recuperados.

De acordo com Squires & McCue (2011), após a realização de diversos estudos utilizando o FSH-e (ALVARENGA et. al. 2003; MACHADO et. al. 2004;

LOGAN et. al. 2007), optaram por preconizar um protocolo padrão para a obtenção de múltiplas ovulações. Consiste em realizar um exame ultrassonográfico entre os dias 5 e 7 pós ovulação, a fim de determinar o momento em que se observam vários folículos medindo entre 20 e 23mm de diâmetro. A partir daí se iniciam as aplicações de FSH-e, 12,5mg, IM, a cada 12 horas. Uma aplicação de PGF2 $\alpha$  se faz necessária no dia seguinte ao início do tratamento. O tratamento com FSH-e persiste até a observação do desenvolvimento da maioria dos folículos entre 32-35mm. Neste momento se interrompem as aplicações de FSH-e e uma aplicação de hCG é realizada entre 24-36 horas após a última aplicação de FSH-e. Com esse tratamento, na maioria das vezes, é possível observar número médio de 4 ovulações por égua e recuperação de 2 embriões por coleta.

#### 2.3.4.3 Hormônio Folículo Estimulante Equino Recombinante (FSH-re)

O FSH-re é um hormônio sintético utilizado para a estimulação do desenvolvimento folicular em éguas (JENNINGS et. al. 2009).

Ao avaliar o desenvolvimento folicular em éguas utilizando FSH-re em diferentes doses (850 $\mu$ g a cada 12 horas; 850 $\mu$ g a cada 24 horas e 500 $\mu$ g a cada 12 horas), Niswender et. al. (2008) verificaram número médio entre 3,2 e 5,4 ovulações por égua e tempo médio de tratamento de 7 dias.

Com o mesmo propósito, porém também avaliando as taxas de recuperação embrionária em éguas, Meyers-Brown et. al. (2010) realizaram a associação de FSH-re e LH-re, a fim de minimizar a ocorrência de falhas no processo de maturação dos oócitos. O tratamento com FSH-re era iniciado, quando detectados folículos entre 22 e 25mm de diâmetro, na dose de 850 $\mu$ g a cada 12 horas e perdurava por três dias consecutivos. A partir do quarto dia, as aplicações de FSH-re eram realizadas a cada 24 horas até que um ou mais folículos atingissem 29mm. Neste momento, eram iniciadas as aplicações de LH-re a cada 12 horas até que folículos atingissem cerca de 32mm, quando o tratamento com FSH-re era interrompido e a frequência das aplicações de LH-re se elevou para três vezes ao dia, até que os folículos atingissem 35-38mm, momento em que era realizada a indução da ovulação com 2500 UI de hCG.

Com isso, a taxa média de recuperação embrionária por coleta foi de  $3,9\pm 0,87$ , comparado com  $2,0\pm 0,53$  no grupo controle. Não houve diferença significativa na taxa de recuperação embrionária/ovulação.

#### 2.3.4.4 Hormônio liberador de Gonadotrofinas (GnRH)

O GnRH e seus análogos tem como principal objetivo estimular a secreção de gonadotrofinas, tais como FSH e LH (HAFEZ, 2004). Diversos estudos foram realizados utilizando GnRH em éguas em anestro a fim de estimular o desenvolvimento folicular, bem como antecipar a primeira ovulação da estação reprodutiva (MCKINNON e VOSS, 1992).

Em estudo realizado por Nagao et. al. (2012), verificou-se que a utilização de baixas doses de acetato de deslorelina foi capaz de induzir duplas ovulações em éguas cíclicas. Neste estudo, foram realizadas aplicações de  $100\mu\text{g}$  a cada 12 horas, tendo início a partir da identificação de pelo menos dois folículos entre 21 e 25mm de diâmetro. As aplicações foram realizadas até que os dois folículos atingissem diâmetro mínimo de 33mm, momento em que foi realizada a indução da ovulação com hCG, seguido de inseminação artificial 24 horas após a indução e coleta de embrião oito dias após a identificação da primeira ovulação. Desta forma, obteve-se média de 1,82 ovulações por ciclo comparado com 1,0 no grupo controle. As taxas de recuperação embrionária por ovulação não foram diferentes do grupo controle, porém, o número de embriões recuperados por ciclo foi de 1,12 para o grupo tratado e 0,57 para o controle, possibilitando assim a obtenção de ao menos 1 embrião por ciclo quando se observam duplas ovulações em um mesmo ciclo. Outros estudos também demonstraram a eficiência do protocolo de indução de duplas ovulações em éguas (CARMO et. al., 2013; STEIGLEDER, et. al. 2014; CAMPOS et. al., 2014; AZEVEDO et. al., 2015; SEGABINAZZI et. al., 2015).

Conforme descrito por Irvine (1983), a administração contínua e em doses elevadas de GnRH provoca uma hipersecreção de LH e FSH, podendo levar a uma dessensibilização da hipófise e posterior diminuição da liberação de gonadotrofinas. Este fenômeno é conhecido por “down regulation”. Embora a administração contínua de GnRH possa induzir “down regulation” em muitas

espécies, estudos sugerem que doses extremamente altas são necessárias para que este fenômeno ocorra na égua (GINTHER; BERGFELDT, 1990).

Nagao et. al. (2012) verificaram que este fenômeno pode ser minimizado iniciando o tratamento logo antes da divergência folicular, desta forma, necessitando um menor período de tratamento até que os folículos atinjam tamanho suficiente para que seja realizada a indução das ovulações.

### 2.3.5 Estratégias para melhorar a resposta superovulatória

#### 2.3.5.1 Hormônio do Crescimento ou Somatotrofina (ST)

A melhoria da resposta ovariana e taxa de produção de embriões em vacas submetidas a tratamentos de superovulação tem sido descrita a partir da utilização da somatotrofina recombinante bovina (rbST). Pesquisas em humanos e vacas sugerem que a somatotrofina (ST) tem ação direta na atividade ovariana baseada na identificação de receptores de ST e proteínas ligadoras encontradas nos ovários (GOMES, 2007).

As gonadotrofinas produzidas pela hipófise, esteroides e fatores de crescimento como a ST são os responsáveis pelo controle do desenvolvimento folicular nas diferentes espécies de animais domésticos (GOMES, 2007).

O uso de rbST em equinos teve efeito semelhante ao ST equino, aumentando a concentração de fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e de insulina circulante, sem efeitos colaterais para o animal. Possivelmente fatores de crescimento como o ST e IGF-1 participam da seleção de folículos dominantes, como sugerido em humanos e vacas, devido ao aumento das concentrações de IGF-1 encontrado nos folículos maiores destas espécies (SPICER; ENRIGHT, 1991).

Estudos realizados em fêmeas domésticas têm demonstrado que a ST, quando administrada associada aos protocolos comumente utilizados para superovulação, promove melhora na resposta superovulatória. Esta associação em vacas tem apresentado aumento na população de folículos antrais, melhora da maturação ovocitária, bem como aumento no número de embriões transferíveis, além de auxiliar o desenvolvimento embrionário nos estágios

iniciais (GONG et al., 1993; HERRLER et al., 1994; GONG et al., 1996; MOREIRA et al., 2002).

Ao estudar os efeitos da ST equina sobre a dinâmica ovariana em éguas, Cochran et al. (1999) não observaram aumento do número de folículos maiores ou igual a 8 mm, além de não ter sido observada influência nos folículos médios e grandes.

Hofferer et al. (1991) foram os únicos autores a estudar o efeito do uso da somatotrofina suína em éguas superovuladas com EPE. Estes autores concluíram que a adição do hormônio de crescimento suíno não levou a nenhum aumento aparente da efetividade do tratamento com EPE.

Ao administrar ST em vacas superovuladas antes de aspirar os folículos, Ramos et. al. (2007) observaram uma melhora no desenvolvimento dos ovócitos de grau 1 (20,67% *versus* 32,37%), havendo também um aumento nas taxas de clivagem (46,11% *versus* 60,47%) e de produção de blastocistos (7,78% *versus* 19,38%).

Ao estudar a ação da rbST juntamente com o EPE a fim de induzir múltiplas ovulações em éguas, Gomes (2007) observou que a rbST foi capaz de elevar os níveis séricos de insulina em éguas, porém não foi observado efeito na dinâmica folicular nas éguas submetidas ao tratamento.

#### 2.3.5.2 Sulpirida

A sulpirida é uma droga estimulante de prolactina de forma antagonista a dopamina, utilizada em mulheres com objetivo de induzir e manter a lactação (CHAVES; LAMOUNIER, 2004). A dopamina exerce efeito negativo sobre a secreção de GnRH e estradiol, prejudicando assim a secreção de LH e FSH (CIECHANOWSKA, et. al. 2008). Receptores para dopamina foram observados nas células da teca e granulosa dos folículos, além de níveis elevados de prolactina em folículos maiores que 20mm de diâmetro (KING, et. al. 2002).

Conforme observado por Tibary (2011), a sulpirida promove a produção de prolactina que age diretamente nos receptores de FSH e LH dos folículos. Ao realizar um estudo visando antecipar a ciclicidade em éguas em anestro profundo, Mari et. al. (2009) observam um aumento significativo no diâmetro dos folículos em éguas tratadas com domperidona comparadas com o grupo

controle. Assim como a sulpirida, a domperidona também é um antagonista da dopamina geralmente utilizada para induzir e manter a lactação em éguas.

A sulpirida tem sido utilizada a fim de antecipar a ciclicidade em éguas em anestro (DALES, et. al. 2000). Panzani et. al. (2011) obtiveram sucesso ao antecipar a primeira ovulação da estação reprodutiva utilizando sulpirida em éguas em período de transição. Os mesmos autores relatam também que o tempo entre o início do tratamento e a primeira ovulação pode ser reduzido iniciando as aplicações de sulpirida quando já se observam folículos em torno de 25mm de diâmetro.

Ao avaliar o desenvolvimento folicular e a ocorrência de múltiplas ovulações em éguas cíclicas submetidas ao tratamento com sulpirida na dose de 1mg/kg, IM, a cada 12 horas, com início próximo a dominância folicular, Cruz (2014) observou que a administração de sulpirida foi capaz de estimular a atividade ovariana, porém não contribuiu significativamente para o aumento nos índices de múltiplas ovulações.

Em estudo realizado por Martínez-Bovi, et. al. (2014) a fim de avaliar o efeito do tratamento com sulpirida no período periovulatório após a indução da ovulação com hCG em éguas, foi possível observar o aumento dos níveis séricos de prolactina, porém sem efeito na taxa de ovulação ou formação de folículos anovulatórios hemorrágicos.



### 3. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

AZEVEDO MV, SOUZA NM, FERREIRA-SILVA JC, BATISTA IO, MOURA MT, OLIVEIRA MAL, ALVARENGA MA, LIMA PF. Induction of multiple ovulations in mares using low doses of GnRH agonist Deslorelin Acetate at 48 hours after luteolysis. **Pferdeheilkunde**, v.31, p. 160-164, 2015

BRASIL. **Ministério da Agricultura. Equídeos.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>. Acessado em 05/12/2016.

BERGFELT, D. R.; ADAMS, G. P. **Ovulation and Corpus Luteum Development.** In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. Current Therapy in Equine Reproduction, p. 1-13, 2007.

CARMO, M. T., TRINQUE, C. L. N., LIMA, M. M., ALVARENGA, M.A. Estudos da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça brasileiro de hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 252-254, 2002.

CARMO M. T. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas. 2003. **(Dissertação)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2003.

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

CARMO, M.T. Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária equina. 2007. **Tese**

(doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

CARMO, M.T., SALES J.N.S., BASTOS M.R., MAIO J.R.G. Efeito do acetato de deslorelina no desenvolvimento folicular e obtenção de múltiplos embriões em éguas cíclicas. 2013. Disponível em <http://www.ourofinosaudeanimal.com>. Acesso em 05/10/2017.

CHAVES R. G., LAMOUNIER J. A. Uso de medicamentos durante a lactação. **Jornal de Pediatria**, v.80, p.189-198, 2004.

CIECHANOWSKA M., LAPOT M., MALEWSKI T., MATEUSIAK K., MISZTAL T., PRZEKOP F. Implication of dopaminergic systems on GnRH and GnRHR genes expression in the hypothalamus and GnRH-R gene expression in the anterior pituitary gland of anestrus ewes. **Exp Clin Endocrinol Diab** 2008;116(6):357–62.

COCHRAN, A. A. et al. The effects of equine somatotropin (eST) on follicular development and circulating plasma hormone profiles in cyclic mares treated during different stages of the estrus cycle. **Domest. Anim. Endocr.**, v.16, p.57-67, 1999.

CRUZ F. A. S. M. Efeito da administração da sulpirida no desenvolvimento folicular em éguas. 2014. (**Dissertação**). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2014.

DALES P. F.; FATONE S.; HANSEN B. S.; CONCANNON P. W. Dopamine antagonist-induced reproductive function in anoestrous mares: gonadotrophin secretion and effects of environmental cues. **J Reprod. Fertil.** 2000;56:173–83.

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

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

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

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

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

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

GOMES, G. M. Efeito da somatotrofina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatória e recuperação embrionária em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE). Botucatu, 2007. **Tese** (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

GONG, J.G.; et al. The effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnancy mare serum gonadotropin in heifers. **Biol. Reprod.**, v.48, p.1141-1149, 1993.

GONG, J.G.; et al. Pretreatment with recombinant somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v.45, p.611-622, 1996.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. In: **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Editora Manole, p.513, 2004.

HERRLER, et al. Effect of rBST on follicular IGF-I contests and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. **Theriogenology**, v.41, p.601-611, 1994.

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

HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.44, p.341-349, 1991.

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

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

KING S.S., JONES K.L., ROSER J.F., NEQUIN L.G., MURPHY L.L., CAMPBELL A.G. Evidence for a local dopamine driven ovarian regulatory system in the mare. **Theriogenology** v. 58, p.619–22, 2002.

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

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

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

MARI, G.; MORGANTI, M.; MERLO, B.; CASTAGNETTI, C.; PARMEGGIANI, F.; GOVONI, N.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. **Theriogenology**, v.71 p. 959-965, 2009.

MARTÍNEZ-BOVI, R.; ZAGRAJCZUK, A.; DOMINGO-ORTIZ, R.; CUERVO-ARANGO, J. The effect of sulpiride treatment during the periovulatory period on prolactin concentration and ovulation in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34 p. 1170-1174, 2014.

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

McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 5<sup>a</sup> Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

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

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

MOREIRA, F. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, p.1371-87, 2002.

NAGAO, J.F.; NEVES, J.R.; PAPA, F.O; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69-73, 2012.

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

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

ORLANDI, C. M. B. Resposta ovariana e concentração plasmática de FSH em éguas cíclica, submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária equina (EPE). **Tese** (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu/SP, 2008.

PANZANI D., ZICCHINO, L.; TARAS, A.; MARMORINI, P.; CRISCI, A.; ROTA, A.; CAMILLO, F. Clinical use of dopamine antagonist sulpiride to advance first ovulation in transitional mares. **Theriogenology**, v.75, p.138–143, 2011.

RAMOS, A.A., et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas Gir. **Rev. Bras. Zoot.**, v.36; n.2; p.380-386, 2007.

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

SEGABINAZZI LG, STEIGLEDER LF, KAIPPER R, RODRIGUES TS, ARAGÃO O, DELL`AQUA JR. JA, ALVARENGA MA. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de acetato de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n 22, p 1488-1494, 2015.

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.

SPICER, L.J.; ENRIGHT, W.J. Concentrations of IGF-I and esteroïds in follicular fluid of preovulatory bovine follicles: effect of daily injections of a growth hormone 70 releasing factor analog and /or thyrotropin-releasing hormone. **J. Anim. Sci**, v.69, p.1133-9, 1991.

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

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

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation. In: McKinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1836 – 1844, 2011.

STEIGLEDER, L. F.; RODRIGUES, R.; OLIVEIRA, O. G. A.; KAIPPER, R. R.; REI, J. M.; RODRIGUES, T. S.; GONÇALVES, L. M.; SEGABINAZZI, L.; NETO, C. R.; ALVARENGA, M. A. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio ao início do tratamento. In: **ANAIS XV CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ**, 2014, Campos do Jordão, São Paulo.

TIBARY, A. Dopamine antagonists. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1788–1793, 2011.

## **HIPÓTESE**

A Sulpirida pode melhorar a resposta ovariana em éguas submetidas a indução de duplas ovulações com baixas doses de acetato de deslorelina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a o efeito da adição de sulpirida ao protocolo de indução de duplas ovulações em éguas utilizando acetato de deslorelina;
- Verificar a influência do tratamento com sulpirida e deslorelina sobre o ciclo estral posterior aos tratamentos.

# CAPÍTULO 2



## ARTIGO

Artigo redigido segundo as normas da Journal of Equine Veterinary Science, <http://www.j-evs.com> ISSN: 0737-0806, fator de impacto 0,882, ranqueada como B2 pelo QUALIS – CAPES de 2016.

### ASSOCIAÇÃO DE DESLORELINA E SULPIRIDA NA INDUÇÃO DE DUPLAS OVULAÇÕES EM ÉGUAS

A elevação do número de ovulações por ciclo tem sido uma alternativa para melhorar a eficiência reprodutiva de éguas em programas de transferência de embriões. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da associação de deslorelina e sulpirida para indução de duplas ovulações em éguas. Dez éguas foram utilizadas em dois grupos experimentais, acompanhados de dois ciclos controles. Após a indução da luteólise no oitavo dia pós ovulação, os animais foram submetidos a avaliação ultrassonográfica diária até a observação de ao menos dois folículos medindo entre 20 e 25mm de diâmetro, momento em que foram direcionados para os grupos de tratamento, aleatoriamente, seguindo modelo *cross over*. No grupo DES (deslorelina) os animais receberam aplicações de 150 µg de deslorelina, IM, a cada 12 horas, até que o segundo maior folículo atingisse ao menos 33mm de diâmetro, momento em que era realizada a indução das ovulações com 1.500 UI de hCG (IV). Já no grupo DES+SULP (deslorelina + sulpirida) o tratamento foi realizado da mesma forma que no grupo DES, porém associado com a administração de 1g de sulpirida, VO, uma vez ao dia, até o momento da indução das ovulações. Em ambos os grupos, os exames ultrassonográficos foram realizados diariamente, a fim de avaliar o desenvolvimento folicular, bem como a detecção das ovulações. Duplas ovulações foram observadas em 70% (7/10) dos animais do grupo DES e 50% (5/10) dos animais no grupo DES+SULP. A porcentagem de ovulações correspondentes ao número de folículos desenvolvidos foi de 81,8% (18/22) para o grupo DES e 79% (15/19) para o grupo DES+SULP, não sendo observada diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ). Concluímos que a associação da sulpirida ao tratamento com acetato de deslorelina não contribuiu para o aumento nas taxas de duplas ovulações em éguas.

**Palavras chave:** égua, acetato de deslorelina, sulpirida, dupla ovulação.

## 1. INTRODUÇÃO

Para se melhorar a eficiência reprodutiva em éguas, uma das alternativas apresentadas é elevar o número de ovulações por ciclo, o que levaria ao aumento das taxas de recuperação embrionária, conseqüentemente reduzindo os custos envolvidos com a TE [1].

Tratamentos para indução de múltiplas ovulações em éguas têm sido descritos por diversos autores, porém, seguidas de reduzidas taxas de recuperação embrionária, visto que estas decrescem a medida que o número de ovulações aumenta [2-6], fato este relacionado à formação de um grande coágulo na fossa de ovulação, o que prejudica o transporte dos oócitos para o oviduto após a ovulação [6]. Assim, taxas de recuperação embrionária podem ser elevadas se o número de ovulações por ovário for limitado a duas ou três [6].

Dentre os hormônios utilizados para este fim, o extrato de pituitária equina (EPE) e o hormônio folículo estimulante equino purificado (FSH-e) são as drogas com mais estudos até o momento. Porém, a dificuldade de aquisição, aliada ao custo elevado e resultados inconstantes destes preparados hormonais limitam a difusão da superovulação na espécie equina [7]. Com isso, a utilização de hormônio sintético, de baixo custo e alta disponibilidade como o acetato de deslorelina tem sido estudado a fim de induzir duplas ovulações em éguas, sendo observadas taxas de duplas ovulações em cerca de 70% das éguas submetidas ao tratamento [7-11].

A sulpirida promove a produção de prolactina que age diretamente nos receptores de FSH e LH dos folículos [12]. Estudos demonstram a eficiência da sulpirida em antecipar a ciclicidade em éguas em anestro [13] e em fase de transição [14]. Levando em consideração que o futuro folículo dominante possua vantagem sobre o segundo maior folículo devido a sua maior capacidade para a produção de estradiol, bem como maior sensibilidade ao FSH e ao LH em função da maior quantidade de receptores de FSH e LH nas células da granulosas [15], a sulpirida surge como uma possível estratégia para melhorar a expressão de receptores no segundo maior folículo, elevando o percentual de éguas que respondem ao tratamento de indução de duplas ovulações. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da associação de sulpirida e deslorelina para indução de duplas ovulações em éguas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética e uso animal (CEUA), com número de protocolo 0177/2017, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Botucatu, SP, Brasil.

### 2.1 Animais

Foram utilizadas 10 éguas sem raça definida, com idade variando entre 3 e 20 anos e pesando entre 350 e 450 Kg, pertencentes a Central Equina de Reprodução - CER, localizada no município de Boituva/SP, onde o estudo foi realizado. Os animais foram mantidos em piquetes formados por capim coast-cross (*Cynodondactylon*), com livre acesso a água e sal mineral, além do fornecimento de 4 Kg de ração comercial para equinos, divididos em duas vezes ao dia.

### 2.2 Controle ultrassonográfico

A avaliação ultrassonográfica foi realizada diariamente utilizando transdutor linear de 5 MHz (Mindray DP2200Vet, Shenzhen, China) a fim de identificar o desenvolvimento folicular e as ovulações durante o tempo do experimento. O diâmetro folicular foi obtido considerando a média das duas medidas lineares do antro tomadas em ângulos retos.

### 2.3 Grupos experimentais

O experimento foi realizado entre os meses de janeiro e março de 2017. Foram acompanhados quatro ciclos estrais de cada animal, sendo o primeiro ciclo com o objetivo de avaliar o desenvolvimento folicular e ovulação, servindo como controle pré-tratamento. Animais que apresentaram duplas ovulações espontâneas, bem como falhas de ovulação, não foram utilizados neste estudo. O último ciclo foi acompanhado com o objetivo de verificar possíveis alterações na dinâmica folicular em função dos tratamentos realizados. Entre os ciclos

controles pré e pós tratamento, foram utilizados dois ciclos de cada animal para a realização do experimento.

No oitavo dia pós ovulação foi realizado o exame ultrassonográfico a fim de confirmar a presença de corpo lúteo, bem como avaliar a população folicular nos ovários. Não havendo folículos maiores que 15mm, foi realizada a aplicação de 5mg de dinoprost-trometamina (Lutalyse®; Pfizer, Nova Iorque, EUA), por via intramuscular (IM) e os exames ultrassonográficos passaram a ser realizados diariamente. Quando observados ao menos dois folículos medindo entre 20 e 25mm, os animais eram direcionados para um dos dois grupos de tratamento (grupo DES ou grupo DES+SULP), aleatoriamente. No ciclo subsequente as éguas foram trocadas de grupo, de forma que todos os animais passassem por todos os tratamentos, seguindo o modelo *cross over*.

No grupo DES (Deslorelina), foram realizadas aplicações de acetato de deslorelina, na dose de 150 microgramas ( $\mu\text{g}$ ), por via IM, a cada 12 horas, até que o segundo maior folículo atingisse ao menos 33mm acompanhado de edema uterino grau 2 [16], momento em que era realizada a indução das ovulações com 1500 UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana – Vetecor Laboratório Calier, São Paulo, Brasil), por via intravenosa (IV). Os exames ultrassonográficos continuavam a ser realizados diariamente até a observação das ovulações. Nos animais em que não era observado crescimento folicular após três dias de tratamento, o mesmo era interrompido a fim de evitar *down regulation*, conforme observado em estudo recente [7].

No grupo DES+SULP (Deslorelina+Sulpirida), as aplicações de acetato de deslorelina eram realizadas da mesma forma como no grupo DES, concomitantemente com a administração de 1g de Sulpirida (Drogavet – Farmácia de manipulação veterinária – Curitiba, Paraná, Brasil), VO, a cada 24 horas, até o momento da indução das ovulações. Os exames ultrassonográficos continuavam a ser realizados diariamente até a observação das ovulações.

#### 2.4 Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 6.0. Primeiramente realizou-se uma análise descritiva dos parâmetros (média e erro padrão) de acordo com as condições experimentais e

avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (K-S). Como todos os dados foram considerados não paramétricos, foi utilizado teste de Mann-Whitney. As porcentagens foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Significância estatística foi considerada quando  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

O intervalo entre a aplicação de PGF2 $\alpha$  e o início do tratamento foi de 3,6 ( $\pm 0.4$ ) e 4 ( $\pm 0.2$ ) dias para os grupos DES e DES+SULP, respectivamente. O número médio de folículos entre 20 e 25mm ao início do tratamento foi similar entre os grupos. O diâmetro do maior folículo e segundo maior folículo ao início do tratamento não diferiu entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O período médio de tratamento para que fosse possível a indução da ovulação foi de 3,3 ( $\pm 0.2$ ) e 4 ( $\pm 0.3$ ) dias para os grupos DES e DES+SULP, respectivamente (Tabela 1).

O número de éguas que desenvolveram ao menos dois folículos  $\geq 33$ mm não diferiu entre os grupos, bem como o número médio de folículos  $\geq 33$ mm por égua no momento da indução da ovulação ( $p > 0,05$ ). O diâmetro do maior folículo no momento da indução não diferiu entre os grupos, porém foi observada diferença no diâmetro do segundo maior folículo no mesmo momento ( $p < 0,05$ ), conforme demonstrado na tabela 01.

O número médio de ovulações não apresentou diferença entre os grupos, considerando 1,8 e 1,5 ovulações para os grupos DES e DES+SULP, respectivamente. A maioria das éguas ovularam em sincronia de até 24 horas, sendo 71,4% (5/7) para o grupo DES e 80% (4/5) para o grupo DES+SULP. Ovulações assincrônicas foram observadas em 2 éguas (28,5%) no grupo DES e uma égua (20%) no grupo DES+SULP. O número de éguas que ovularam 2 folículos não apresentou diferença entre os grupos. Quando avaliamos o número de ovulações correspondentes ao número de folículos desenvolvidos acima de 33mm de diâmetro, observamos 18/22 (81,8%) para o grupo DES e 15/19 (79%) para o grupo DES+SULP, não sendo observada diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O intervalo entre a aplicação de PGF2 $\alpha$  e a próxima ovulação não diferiu entre os grupos (Tabela 01).

**Tabela 1** - Dados médios e erro padrão das variáveis entre o grupo tratado com deslorelina ou com deslorelina + sulpirida para obtenção de duplas ovulações.

VARIÁVEL	DES	DES+SULP
Número de ciclos utilizados	10	10
Intervalo entre aplicação de PGF2 $\alpha$ e início do tratamento (dias)	3.6 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.2
Número de folículos $\geq$ 20mm ao início do tratamento	28	29
Número médio de folículos $\geq$ 20mm ao início do tratamento por égua	2.8 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.3
Diâmetro do maior folículo ao início do tratamento (mm)	24.1 $\pm$ 0.3	23.8 $\pm$ 0.3
Diâmetro do segundo maior folículo ao início do tratamento (mm)	22.4 $\pm$ 0.4	22.5 $\pm$ 0.2
Tempo de tratamento até a indução da ovulação (dias)	3.3 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3
Diâmetro do maior folículo no momento da indução (mm)	36.7 $\pm$ 0.6	35.9 $\pm$ 0.2
Diâmetro do segundo maior folículo no momento da indução (mm)	35.1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	33.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Número (%) de éguas com ao menos dois folículos $\geq$ 33mm no momento da indução	90% (9/10)	70 % (7/10)
Número (%) de éguas que não desenvolveram folículos $\geq$ 33mm	0% (0/0)	10% (1/10)
Número de folículos $\geq$ 33mm no momento da indução	22	19
Número médio de folículos $\geq$ 33mm no momento da indução por égua	2.2 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.3
Número (%) de éguas com 2 ou mais ovulações	70% (7/10)	50% (5/10)
Número (%) de éguas com 1 ovulação	30% (3/10)	40% (4/10)
Número (%) de éguas que ovularam em sincronia de até 24h	71.4% (5/7)	80% (4/5)
Número (%) de éguas que ovularam em assincronia >24h	28.5% (2/7)	20% (1/5)
Número de ovulações	18	15
Número médio de ovulações por ciclo	1.8 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2
Número (%) de folículos $\geq$ 33mm que não ovularam	18.1% (4/22)	21% (4/19)
Número (%) de ovulações frente aos folículos submetidos a indução da ovulação	81.8% (18/22)	79% (15/19)
Intervalo entre PGF2 $\alpha$ e ovulação (dias)	9.6 $\pm$ 0.6	8.8 $\pm$ 0.5

Letras diferentes significam p <0.05.

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos sobre a indução de duplas ovulações em éguas utilizando acetato de deslorelina têm sido descritos recentemente com resultados satisfatórios [7, 9-11, 17]. Por ser um análogo de GnRH, o acetato de deslorelina estimula a secreção de gonadotrofinas pela hipófise promovendo crescimento folicular [18]. Além de ser um hormônio sintético e não apresentar variação entre as partidas, o acetato de deslorelina possui baixo custo e alta disponibilidade comercial [7].

O período de tratamento com deslorelina no presente experimento foi de aproximadamente 4 dias, tempo suficiente para que os folículos atingissem diâmetro adequado para a indução das ovulações. Conforme descrito por Irvine [19], o tratamento prolongado com GnRH em várias espécies pode induzir uma dessensibilização da hipófise, fazendo com que ocorra a diminuição da secreção de gonadotrofinas e conseqüentemente diminuição da atividade ovariana, fenômeno conhecido como *down regulation*. Este fenômeno também pôde ser observado em trabalho realizado por Nagao et al [7]. No presente estudo não foi observado *down regulation* em nenhum dos animais tratados. Uma das éguas do grupo DES+SULP não apresentou crescimento folicular após 3 dias de tratamento, sendo o mesmo interrompido imediatamente.

Por se tratar de uma droga antagonista da dopamina, a sulpirida tem sido relacionada com o aumento dos níveis séricos de prolactina, que por sua vez regulam a população de receptores para FSH e LH nos ovários [12]. Levando em consideração a menor condição do segundo maior folículo atingir a dominância devido a sua menor expressão de receptores de FSH e LH, conforme observado por Bergfelt e Adams [15], optou-se por associar a sulpirida ao tratamento com deslorelina na tentativa de elevar a população de receptores para FSH e LH no folículo co-dominante, possibilitando assim seu crescimento até a ovulação. Estudo recente realizado na tentativa de estimular múltiplas ovulações em éguas cíclicas utilizando a sulpirida próximo ao momento da dominância folicular demonstrou a eficácia do tratamento em estimular a atividade ovariana, porém não contribuiu para um aumento significativo nas taxas de múltiplas ovulações [20].

Quando administrada via oral em equinos, a absorção da sulpirida é considerada relativamente baixa, em torno de 20% [21]. Levando este fato em

consideração, a dose escolhida foi maior que a utilizada em outros estudos onde foi possível verificar a elevação de prolactina sérica após administração de sulpirida por via intramuscular em éguas em fase de transição [13, 22]. Além disso, também foi possível demonstrar a eficiência da sulpirida em elevar os níveis séricos de prolactina após a administração de 2mg/Kg, VO, em éguas pós-parto [23] e na dose de 1,5 mg/Kg, IM, em éguas no período periovulatório [24].

Considerando as taxas de desenvolvimento folicular e ovulação, os resultados observados no presente estudo foram similares aos obtidos em trabalhos recentes onde a deslorelina foi utilizada para indução de duplas ovulações em éguas [7-11]. Ao avaliarmos a taxa de duplas ovulações, 70% (7/10) das éguas obtiveram ao menos duas ovulações quando tratadas com deslorelina, já que uma delas ovulou três folículos. Este resultado foi similar aos relatados em outros estudos onde a deslorelina foi utilizada, variando entre 70% (7/10) [9], 79% (39/43) [8], 82% (46/56) [7] e 86,6% [10]. Resultados superiores foram descritos em outro experimento, onde todas as éguas ovularam dois folículos (10/10) [17]. Já em estudo realizado por Lima et al [25], somente 25% (3/12) das éguas responderam com dupla ovulação.

A associação da sulpirida ao tratamento com deslorelina na indução de duplas ovulações se deu na intenção de elevar a porcentagem de éguas que respondem ao tratamento com deslorelina, fato este que não foi possível ser observado, já que no grupo onde a sulpirida foi adicionada ao tratamento, somente 50% (5/10) dos animais ovularam ao menos dois folículos, sendo que uma égua apresentou ovulação tripla. O diâmetro médio do segundo maior folículo nas éguas do grupo DES + SULP foi menor comparado às éguas que receberam somente deslorelina ( $p < 0.05$ ). Em estudo realizado por Campos et al [17] onde folículos a partir de 33mm foram submetidos a indução da ovulação com 1.500 UI de hCG, 100% (10/10) das éguas apresentaram ovulação dupla. Da mesma forma, Nagao et al [7] e Carmo et al [8] obtiveram taxas satisfatórias de duplas ovulações quando a indução foi realizada em folículos  $\geq 33$ mm, porém na dose de 2.500 UI de hCG. Embora estes autores relatem eficácia na indução da ovulação de folículos a partir de 33mm de diâmetro, outros recomendam que a indução das ovulações com hCG seja realizada a partir da observação de folículos  $\geq 35$ mm [11, 26, 27]. Diante disso, talvez a espera de mais um dia para a indução das ovulações nas éguas do grupo DES+SULP, momento em que o



segundo maior folículo provavelmente atingiria diâmetro  $\geq 35\text{mm}$ , pudesse ter elevado o número de éguas com ovulação dupla neste grupo.

A maioria das ovulações ocorreram de forma sincrônica em ambos os grupos, o que se torna de extrema importância quando se utiliza sêmen refrigerado ou congelado, possibilitando assim a elevação das taxas de recuperação embrionária a partir de uma única inseminação por ciclo.

O intervalo médio entre a aplicação de PGF2 $\alpha$  e a próxima ovulação foi similar entre os grupos tratados, bem como nos ciclos controle pré e pós tratamentos, demonstrando que a estimulação ovariana não interferiu no intervalo entre luteólise e ovulação no ciclo posterior aos tratamentos.

Não foi observada melhora na resposta ovariana nos animais tratados com a associação de deslorelina e sulpirida quando comparado ao grupo tratado somente com deslorelina. Concluímos que a adição de sulpirida ao tratamento com acetato de deslorelina não contribuiu para o aumento nas taxas de duplas ovulações em éguas.

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] ALVARENGA MA, CARMO MT, LANDIM-ALVARENGA FC. Superovulations in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, v.24,p.88-91,2008.
- [2] ALVARENGA MA, MCCUE PM, BRUEMMER J, NEVES NETO JR, SQUIRES EL. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-887, 2001.
- [3] SQUIRES EL, CARNEVALE EM, MCCUE PM, BRUEMMER JE. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.
- [4] FARINASSO A, BRANQUINHO JA, RUMPF R, ALVARENGA MA. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina para indução de ovulações múltiplas em éguas. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33, p135-38,2005.
- [5] ALONSO MA, FLEURY PDC, ALVARENGA MA. Efeito da frequência do tratamento com baixas doses do extrato de pituitária equina na indução de múltiplas ovulações em éguas. **ActaScientiaeVeterinarie**, v.34, Supl2, p.532,2006.
- [6] CARMO TM. Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária equina. 2007. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

[7] NAGAO JF, NEVES JR, PAPA FO, ALVARENGA MA, DELL'AQUA CPF, DELL'AQUA JA. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69-73, 2012.

[8] CARMO MT, SALES JNS, BASTOS MR, MAIO JRG. Efeito do acetato de deslorelina no desenvolvimento folicular e obtenção de múltiplos embriões em éguas cíclicas. 2013. Disponível em <http://www.ourofinosaudeanimal.com>. Acesso em 05/10/2017.

[9] STEIGLEDER LF, RODRIGUES R, OLIVEIRA OGA, KAIPPER RR, REI JM, RODRIGUES TS, GONÇALVES LM, SEGABINAZZI L, NETO CR, ALVARENGA MA. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio ao início do tratamento. In: **ANAIS XV CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ, 2014**, Campos do Jordão, São Paulo.

[10] AZEVEDO MV, SOUZA NM, FERREIRA-SILVA JC, BATISTA IO, MOURA MT, OLIVEIRA MAL, ALVARENGA MA, LIMA PF. Induction of multiple ovulations in mares using low doses of GnRH agonist Deslorelin Acetate at 48 hours after luteolysis. **Pferdeheilkunde**, v.31, p. 160-164, 2015.

[11] SEGABINAZZI LG, STEIGLEDER LF, KAIPPER R, RODRIGUES TS, ARAGÃO O, DELL'AQUA JR. JA, ALVARENGA MA. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de acetato de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n 22, p 1488-1494, 2015.

[12] TIBARY A. Dopamine antagonists. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1788–1793, 2011.

[13] DALES PF, FATONE S, HANSEN BS, CONCANNON PW. Dopamine antagonist-induced reproductive function in anoestrous mares: gonadotrophin secretion and effects of environmental cues. **J Reprod. Fertil.** 2000;56:173–83.

[14] PANZANI D, ZICCHINO L, TARAS A, MARMORINI P, CRISCI A, ROTA A, CAMILLO F. Clinical use of dopamine antagonist sulpiride to advance first ovulation in transitional mares. **Theriogenology**, v.75, p.138–143, 2011.

[15] BERGFELT DR, ADAMS GP. **Ovulation and Corpus Luteum Development**. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. Current Therapy in Equine Reproduction, p. 1-13, 2007.

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

[17] CAMPOS DG, SÁ PV, SOUZA PNC, STRAUUCH MA, CARVALHO CFM, MARTINS AV, DELL 'AQUA JRJA, PINNA AE. Indução de dupla ovulação em éguas utilizando acetato de deslorelina. In: **ANAIS XV CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ, 2014**, Campos do Jordão, São Paulo.

- [18] GINTHER OJ, BERGFELDT DR. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development during the existing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88: 119- 126, 1990.
- [19] IRVINE CHG. Gonadotropin-releasing hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.3:168-170,1983.
- [20] CRUZ FASM. Efeito da administração da sulpirida no desenvolvimento folicular em éguas. 2014. (Dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2014.
- [21] GIORGI M, MEHMET O, CAMILO F, PANZANI D. Pharmacokinetics of sulpiride after intravenous, intramuscular, and oral single-dose administration in nurse mares. **J Equine Vet Sci** 2013; 33, 533–538.
- [22] MARI G, MORGANTI M, MERLO B, CASTAGNETTI C, PARMEGGIANI F, GOVONI N, GALEATI G, TAMANINI C. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. **Theriogenology**, v.71 p. 959-965, 2009.
- [23] MIGDAL A, MIGDAL L, ZAGRAJCZUK A, KOCHAN J, NOWAK A, OKLÓSKI A. Influence of sulpiridetreatment on the level of prolactin and immunoglobulins in the peripheral blood of mares during the postpartum period. **Acta Veterinaria Hungarica**, 65. p. 417-428, 2017.
- [24] MARTÍNEZ-BOVI, R.; ZAGRAJCZUK, A.; DOMINGO-ORTIZ, R.; CUERVO-ARANGO, J. The effect of sulpiride treatment during the periovulatory period on prolactin concentration and ovulation in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34 p. 1170-1174, 2014.
- [25] LIMA LGF, KOZICKI LE, DELL`AQUA JR, JA, CAMARGO CE, POLO G, SANTOS IP, MACAN RC, LARA P, ALBERINI V. Uso de acetato de deslorelina para estímulo e indução de duplas ovulações em éguas. In: **ANAIS XVI CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ, 2015**, Águas de Lindóia, São Paulo.
- [26] GASTAL EL, SILVA LA, GASTAL MO, EVANS MJ. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and Interval to ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p. 186-190, 2006.
- [27] Newcombe JR. Human chorionic gonadotropin. In: McKinnon, AO, Squires, EL, Vaala, WE, Varner, DV. **Equine Reproduction**. 2Ed. Wiley-Blackwell, p.1858-1869, 2011.