

MÁRLON DE VASCONCELOS AZEVEDO

**INDUÇÃO DE MÚLTIPLAS OVULAÇÕES UTILIZANDO BAIXA DOSE DE GnRH
(DESLORELINA) EM ÉGUAS**

RECIFE

2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

MÁRLON DE VASCONCELOS AZEVEDO

INDUÇÃO DE MÚLTIPLAS OVULAÇÕES UTILIZANDO BAIXA DOSE DE GnRH
(DESLORELINA) EM ÉGUAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Ciência Veterinária.

Orientador:
Prof Dr Paulo Fernandes de Lima.

RECIFE
2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

INDUÇÃO DE MÚLTIPLAS OVULAÇÕES UTILIZANDO BAIXA DOSE DE GnRH
(DESLORELINA) EM ÉGUAS

Dissertação de Mestrado elaborada por

MÁRLON DE VASCONCELOS AZEVEDO

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. PAULO FERNANDES DE LIMA
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof Dr. MARCOS ANTONIO LEMOS DE OLIVEIRA
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr^a ADRIANA WANDERLEY TAVEIROS
Dr^a em Ciência Veterinária pela UFRPE

Prof. Dr. CLÁUDIO BARTOLOMEU COUTINHO
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr. FILIPE QUEIROS GOUDIN BEZERRA
Dr. em Ciência Veterinária pela UFRPE

EPIGRAFE:

GRATIDÃO DE CABÔCO

Se eu fôsse dono do mundo,
Eu li dava o mundo intêro.
Li dava um baú chêinho,
Intupidinho de dinhêiro.
Só de patacão de ouro,
De ouro bem brasilêro!

Li dava um Gibão de Couro
De Garapú verdadêro,
Dava um cavalo alazão
Todo arriádo de nôvo
Pró sinhô, no seu sertão,
Nas festa de apartação
Fazê invéja a vaquêro.

Li dava um gálo de raça,
Prá cantá no seu terrêro.
Um Rife Papo-Amarelo,
Um bunito cinturão,
Todo infeitado de bala,
Prô sinhô, nas suas forga
Vadiá de cangacêro!

Mas, cumo eu não tenho nada
A não sê coração,
Li oferêço êsses versinho
Qui uma coisa só traduz

-- A eterna gratidão
Do puéta – Zé da Luz.

Zé da Luz em BRASIL CABOCLO, 6ª EDIÇÃO de 1988.
Meu nobre Conterrâneo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Maestro do universo, que com seu carinho e compaixão nos deu a dádiva da vida.

Aos meus Pais e Familiares que me acompanharam e nos deram força para seguir.

Aos meus orientadores Prof. Paulo e Marcos Antonio, que nos guiam pelos trilhos tortuosos do conhecimento.

A minha Esposa, Natalia, minha fulo de Puxinanã, que me acompanhou em todo o desenvolvimento do projeto a execução e com seus carinhos e beijos me acalenta e apazigua meu coração diariamente.

A Dr. Ilana e Família, que permitiu minha entrada em sua central, possibilitando que esse trabalho fosse realizado.

A Prof. Marcos Alvarenga que nos deu apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, instituição que a qual nos disponibilizou a bolsa de fomento a pesquisa.

Agradecimento bom é curto que só coice de bacuri e ligeiro que só coceira de soco.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho induzir ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de GnRH (deslorelina) em tempo fixo e determinar seu impacto sobre a eficiência reprodutiva e resultados econômicos em um programa comercial de transferência de embriões, no agreste pernambucano. No experimento 01 foram utilizadas quinze éguas doadoras de embrião sendo dez da Raça Quarto de Milha e cinco da raça Mangalarga Machador, com idade entre oito e vinte anos. O grupo 1 (G1) iniciou-se com o monitoramento do ciclo estral, inseminação artificial durante o estro e colheita de embriões no oitavo dia pós ovulação. O Grupo 2 (G2) constituído pelas mesmas éguas do G1, tendo início com a aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina, o monitoramento dos ovários através do ultrassom, duas vezes ao dia até a detecção do maior folículo com diâmetro de 23 a 25 mm e o segundo > 18 mm, momento inicial do tratamento superovulatório, com 100 µg de acetato de deslorelina, com intervalo de 12 h, até quando o maior folículo atingisse o diâmetro de 33 a 35 mm, quando foi realizado a indução da ovulação através da aplicação de 1000 µg de acetato de deslorelina IM associado a 1000 UI de hCG IV. No experimento 02 foram utilizadas sete éguas doadoras, sendo quatro da Raça Quarto de Milha e três da raça Mangalarga Machador, com idade entre oito a vinte anos. Os grupos G1 e G2 são iguais ao experimento 01, sendo acrescido do G3 que se iniciou após a reaplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina após a colheita do G2, 48 h após é iniciado o tratamento com 100 µg (1ml) de acetato de deslorelina, com intervalo de 12h, até que o maior folículo atingisse 34±1 mm de diâmetro ou 6 dias de aplicação, quando foi feita a indução de ovulação com o mesmo protocolo do G2. No experimento 01 o percentual de éguas com múltiplas ovulações no G1 e G2 foi de (2/15) 13,33% e de (13/15) 86,66%, respectivamente (P<0,005). Também foi observado um incremento no número de embriões recuperados, sendo no G1 apenas nove, enquanto no G2 foram de dezesseis embriões (P<0,005), com uma média de recuperação de 0,6±0,48 no G1 e de 1,066±0,497 no G2 (P>0,005); e o percentual de recuperação embrionária foi de 60% G1 e de 80% no G2 (P<0,005). No experimento 02 o percentual de éguas com múltiplas ovulações no G1, G2 e G3 foi de 14,28% (1/7), 100,00% (7/7) e 0% (0/7) respectivamente (P<0,005). Foi observado um incremento no número de embriões recuperados sendo no G1 três, G2 seis e G3 zero (P<0,005), com uma média de recuperação embrionária de 0,43 ± 0,53 no G1, de 0,86 ±

0,38 no G2 e 0 G3 ($P>0,005$); com um percentual de recuperação embrionária de 43% G1, de 85,71% no G2 e 0% no G3 ($P<0,005$). Os resultados obtidos nestes experimentos permitem concluir que a administração de GnRH (deslorelina) em baixa dose em éguas doadoras de embriões, interferiu positivamente no crescimento do folículo dominante e do segundo folículo, aumentando a incidência de ovulações múltiplas. Incrementando a taxa de recuperação embrionária por ciclo, melhorando a eficiência reprodutiva das doadoras tratadas e que o tratamento quando iniciado precocemente (48h), com folículos < 25 mm, apresenta resultados abaixo do esperado, não sendo eficiente para induzir ovulação dupla.

Palavras-chave: Biotecnologias, Reprodução, Equinos, Nordeste, GnRH.

ABSTRACT

This study was aimed to induce multiples ovulations in mares using low doses of GnRH at a fixed time and determinate its impact on reproductive efficiency and economic results in a commercial program for embryo transfer, in northeastern Brazil. In the experiment 01 was used 15 embryo donor mares, 10 were Quarter Horse Breed and 5 were Magalarga Machador Breed, aged between 8 and 20 years. After being monitored and inseminated during estrus and performed the embryo collection constituting the G1, it was applied 7.5mg of dinoprost-tromethamine the G2 consisting of the same mares of G1, experiment was started with examinations twice a day to detect the highest follicle with 23 to 25 mm and the second > 18 mm, ideal moment to start the treatment, with 100 µg of deslorelin acetate, with an interval of 12h, until the largest follicle reaches 33 to 35 mm in diameter, when the ovulation induction was realized with 1mg of deslorelin acetate associated IM to 1000 UI of hCG IV. In the experimente 02 were used 7 donors, 4 were Quarter Horse Breed and 3 were Magalarga Machador Breed, aged between 8 and 20 years. The groups G1 and G2 are equal to the experimente 01, being increased the G3 that begins after the reapplication of 7.5 mg of dinoprost-tromethamine after the G2 collection, after 48h the treatment is started with 100 µg (1ml) of deslorelin acetate, until the largest follicle reaches 34±1 mm in diameter or 6 days of application. In the experiment 01 the mares percentage with multiple ovulations in the control cycle (G1), experimental cycle (G2) were (2/15) 13.33% and (13/15) 86.66%, respectively (P<0.05). It was also observed an increase in the embryos recovered numbers being in the control group only 9 when in the experimental group were 16 embryos (P<0.05), with an embryos/mares average of 0.6±0.48 in the control group and 1.066±0.497 in the experimental group (P>0.05); with an embryo recovery rate of 60% G1 and 80% in G2 (P<0.05). It was observed an increase in the number of recovered embryos being in G1 3, G2 6 and G3 0 (P<0.05), with an embryo/mare recovery average of 0.43±0.53 in G1, 0.86±0.38 in G2 and 0 in G3 (P>0.05); with an embryo recovery rate of 43% G1, 85.71% in G2 and 0% in G3 (P<0.05). It can be concluded from the results that the administration of GnRh low-dose in embryo donors, interfered positively in the growth of the dominant follicle and second dominant follicle, increasing the incidence of multiple ovulations, incrementing the embryo recovery rate per cycle, improving the reproductive efficiency of treated donors and that the treatment

when started early, with follicles < 25 mm, presents below-expected results, it is not efficient to induce double ovulation.

Keywords: Biotechnology, Reproduction, Equine, Northeast, GnRH.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Capítulo 01		Página
Figura 1	Folículos após tratamento superovulatório com baixa dose de GnRH.....	43
Gráfico1	Crescimento folicular de ovulação dupla no grupo experimental (G2).....	43
Gráfico 2	Crescimento folicular de um ciclo do grupo controle G1	44
Capítulo 02		
Gráfico1	Crescimento folicular de ovulação dupla no G2.....	59
Gráfico 2	Crescimento folicular de égua no G3.....	59

LISTA DE TABELAS**Capítulo 01****Página**

Tabela 1 Número de ovulações e produção de embrião do grupo
controle e grupo experimental..... 40

Tabela 2 Número de ovulações e produção de embrião do G1
Quarto de Milha (QM),G1 Mangalarga Machador (MM),G2 QM
e G2 MM..... 42

Capítulo 02

Tabela 1 Número de ovulações e produção de embrião do grupo
controle (G1), grupo dupla (G2) e grupo 48h (G3)..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS

Bid	2 vezes ao dia
CL	Corpo Lúteo
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EPE	Extrato de Pituitária Equina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSH-e	Hormônio Folículo Estimulante Equino
FSH-p	Hormônio Folículo Estimulante Suíno
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IA	Inseminação Artificial
LH	Hormônio Luteinizante
MM	Mangalarga Marchador
PGF _{2α}	Prostaglandina
PSI	Puro Sangue Inglês
QM	Quarto de Milha
TE	Transferência de Embrião
UI	Unidades Internacionais
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO.....	14
2- OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1- <i>Histórico da Transferência de Embriões.....</i>	17
3.2- <i>Dinâmica Folicular e ciclo estral da éguas.....</i>	18
3.3- <i>Frequência de múltiplas ovulações da égua.....</i>	23
3.4- <i>Superovulação.....</i>	24
4- REFERÊNCIAS.....	27
5- CAPÍTULO 1	
Indução de múltiplas ovulações utilizando baixa dose de GnRH (deslorelina) em éguas.....	34
6- CAPÍTULO 2	
Indução de múltiplas ovulações utilizando baixa dose de GnRH (deslorelina) em éguas, em tempo fixo para o início do tratamento.....	50

1- INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos equinos do mundo. Existem várias associações de raça com número expressivo de criadores e animais. Deve-se salientar que as raças nativas estão em fase de formação e assim, qualquer meio capaz de reduzir o intervalo de gerações e aumentar o número de bons reprodutores e matrizes é de grande valia no aprimoramento de nossos animais (CARVALHO, 2000).

A ultrassonografia desde que incorporada à rotina da reprodução equina na década de 80 estabeleceu uma nova dimensão para o controle de diferentes eventos reprodutivos, tais como: acompanhamento da gestação, principalmente durante os primeiros 60 dias, período que ocorrem as maiores perdas embrionárias, evitando assim perda de tempo e dinheiro por parte do criador, além de dar suporte ao profissional para viabilização de técnicas como a inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (TE), acrescidas da sexagem fetal que agrega valores econômicos aos serviços e produtos oferecidos pelo criatório (TAVEIROS, 2008).

Em relação à TE, o Brasil ocupa lugar de destaque na utilização desta técnica ao lado dos Estados Unidos e da Argentina, sendo um dos líderes, realizando em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (CARNEIRO, 2005).

A utilização da TE em equinos tem aumentado rapidamente nas últimas duas décadas. Contudo, algumas características biológicas peculiares, assim como problemas técnicos, têm limitado seu amplo uso na espécie equina quando comparado com a espécie bovina (SQUIRES et al., 1999).

Atualmente, diversas associações de equinos e de criadores de cavalos passaram a se beneficiar da TE, como é o caso das associações brasileiras dos criadores de cavalos da raça Brasileiro de Hipismo (ABCCBH), da raça Mangalarga Marchador (ABCCMM), da raça Mangalarga (ABCCM), da raça Quarto de Milha (ABQM), da raça Árabe (ABCCA), da raça Paint Horse (ABCPaint) e da raça Campolina (ABCCC) (CARMO, 2003).

As maiores candidatas ao programa de TE incluem éguas idosas com histórico reprodutivo insatisfatório, ao não conseguirem produzir um potro seja por monta natural ou por IA, embora as taxas de perdas embrionárias em fêmeas idosas sejam mais elevadas e a fertilidade decresça com a idade da égua (MERKT et al., 2000; LOPES,

2002; SQUIRES et al., 2003;). Segundo Squires et al.(2003), éguas que estão em competição, são também fortes candidatas a esta biotecnologia.

A biotecnologia da TE consiste na colheita de um oócito fecundado (embrião) de uma égua denominada doadora, dotada de carga genética superior, sendo o referido embrião, transferido (inovulado) para o útero de outra égua, denominada receptora, a qual terá a função de levar a gestação adiante até seu final (ANDRADE, 1986).

A fêmea equina por natureza é monovular, o que significa dizer que a cada ciclo estral, geralmente, uma única ovulação irá ocorrer. A possibilidade de se incrementar o número de ovulações no ciclo estral da égua traz consigo benefícios em potencial, como o aumento no número de oócitos disponíveis para aplicação de diferentes técnicas de reprodução assistida e aumento no número de embriões recuperados em uma única colheita, com conseqüente redução dos custos do programa de transferência de embriões (BONIN et al, 2009).

A ocorrência de ovulações duplas espontâneas em éguas é um fator que incrementa a recuperação de embriões. Assim sendo, alguns grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo dos fatores responsáveis pela baixa recuperação embrionária em éguas superovuladas e ao desenvolvimento de protocolos que driblem esses fatores, que produzam menos efeitos adversos e promovam estimulação moderada e não excessiva dos ovários (ALVARENGA et al, 2008).

As taxas de recuperação embrionária após lavagem uterina e de prenhez relatadas no Brasil têm variado entre 45,5% a 83,3% segundo relatos de Farinasso (2004); Meira e Henry (1991);Pastorello,et al (1996).

Pesquisas realizadas por Farinasso (2004), utilizando baixa dose de Extrato de Pituitária Equina (EPE), na superovulação obtiveram bons resultados, no entanto existiu dificuldades na produção e padronização do fármaco. Outra linha de pesquisa é a indução de múltiplas ovulações com baixa dose de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), realizada por Nagao et al. (2010), que obtiveram o percentual de 85% das éguas que responderam ao tratamento com pelo menos duas ovulações por ciclo.

2- OBJETIVOS

2.1 - Geral:

Induzir múltiplas ovulações em éguas utilizando baixas doses de GnRH, em protocolo de TE em tempo fixo para o início do tratamento, e determinar seu impacto sobre a eficiência reprodutiva em um programa comercial de TE, no nordeste brasileiro, bem como confrontar o uso do acetado de deslorelina com o acetado de busereлина, na indução de ovulações múltiplas.

2.2 - Específicos:

- Tornar a técnica de indução de ovulação dupla de fácil aplicação no campo.
- Aumentar a taxa de recuperação embrionária, por lavado.
- Aumentar a taxa de ovulação dupla.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1-Histórico da transferência de embriões

A primeira TE em animais ocorreu em 1890, na Universidade de Cambridge – Inglaterra, onde Walter Heaper realizou o procedimento em animais de laboratório (coelha), com insucesso (GONSALVES et al., 2002).

Na espécie bovina, o primeiro relato foi descrito por Willet et al. em 1951 na universidade de Wiscosin (EUA), resultando no nascimento do primeiro bezerro fruto da biotecnologia. Em 1960, o mesmo grupo de pesquisadores relatou a importância da sincronização do estro entre doadoras e receptoras (GONSALVES et al., 2002).

O primeiro relato de TE na espécie bovina no Brasil foi realizado HAHN (1977), na Universidade Federal de Santa Maria – RS, viabilizando a técnica aos meados dos anos 80 para todo o país (GONSALVES et al. 2002).

Por sua vez, na espécie equina, os estudos envolvendo a TE foram realizados em 1969 por um grupo de pesquisadores japoneses. O mesmo grupo de pesquisadores relatou mais tarde (1972) uma taxa de 45% de sucesso nas colheitas dos embriões, porém nenhuma concepção foi confirmada (OGURI e TSUTSUMI, 1972).

Dois anos depois, os mesmos pesquisadores seguindo a mesma linha de estudo, coletaram 18 embriões em 20 éguas, transferindo 15 destes pelo método não cirúrgico transcervical, para éguas receptoras em sincronismo de -5 há +7 dias, em relação às doadoras, obtendo um percentual de concepção de 40% dos embriões transferidos (OGURI e TSUTSUMI,1974).

Em 1972, na Inglaterra, foi relatado o nascimento do primeiro potro nascido de um programa de TE através da técnica cirúrgica (ANDRADE, 1986).

No Brasil, a TE na espécie equina teve seus primeiros relatos com Fleury et al (1987), pelo método cirúrgico e por Henry e Meira (1987) pelo método não cirúrgico.

O método mais utilizado atualmente é o transcervical, sendo a colheita de embrião realizada entre o 7º ou 8º dia pós ovulação. Mesmo com o aumento considerável da utilização da TE em todo o mundo, são muitas as limitações para o uso desta biotécnica, tais como: custo elevado, algumas raças ainda têm restrições em seu uso, a dificuldade na utilização da superovulação em éguas, quantidade limitada de embriões por ciclo e as perdas embrionárias das receptoras (TAVEIROS, 2008)

3.2 - Dinâmica Folicular e Ciclo estral das éguas:

As fêmeas equinas apresentam atividade sexual durante a fase de maior luminosidade do ano, sendo classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais. Elas atingem a maturidade sexual (puberdade) por volta dos dois anos de idade, podendo ser esta alterada pela influência das condições corporais, peso, níveis de energia, ferormônios, raça e a estação do ano (MCKINNON e VOSS, 1993).

O ciclo reprodutivo da égua é o mais vulnerável às variações climáticas entre as espécies domésticas (GINTHER e BERGFELT,1993). A espécie depende da exposição diária à luminosidade, condição que justifica sua atividade reprodutiva durante todo o ano a baixa latitude, onde não há grandes variações de luminosidade (McKINNON e VOSS, 1993).A maioria das éguas são poliéstricas sazonais e mesmo aquelas com atividade sexual durante todo o ano, nem sempre são capazes de conceber em todos os ciclos (TAVEIROS,2008).

Éguas mantidas sob dias longos (16h de luz/dia) apresentam atividade ovariana cíclica, enquanto que éguas mantidas em dias curtos (8,5h) apresentam ovário sem ciclicidade. Esta variável ocorre, em função de dias curtos, quando se associa ao decréscimo na secreção de gonadotrofinas hipofisárias acarretando uma redução da atividade ovariana (NAGY et al., 2000).

Éguas quando mantidas em climas de alta luminosidade, continuam cíclicas, como pode ser visto no trabalho de Taveiros, (2008); onde as éguas passarão os meses de novembro a abril no Rio de Janeiro e os meses de maio a outubro em Pernambuco, possibilitando a coleta de embriões durante todo o ano.

Éguas quando mantidas em climas de alta luminosidade, continuam cíclicas, como pode ser visto no trabalho de Taveiros, (2008); onde as éguas passarão os meses de novembro a abril no Rio de Janeiro e o mês de maio a outubro em Pernambuco, possibilitando a coleta de embriões durante todo o ano, no entanto o mesmo autor, sugere que a elevação do índice pluviométrico, leva a uma diminuição da atividade reprodutiva de algumas éguas, ocasionando uma queda na produção de embriões e prenhez.

O ciclo estral na espécie equina é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, estro e diestro (ANDRADE, 1986), podendo-se também denominá-las de fase folicular e fase luteal (DIELEMAN et al., 1986), que são

intervaladas entre dois períodos sucessivos de cio (ANDRADE, 1986). A definição de ciclo estral de éguas mais próxima da ideal é a do período entre duas ovulações, no qual existe uma fase onde a égua apresenta evidentes sinais de estro, ou quando esses sinais não são aparentes, onde há uma baixa concentração de progesterona, inferior a 1 ng/mL (HUGHES et al., 1986).

O ciclo estral em éguas apresenta uma duração média de $21,7 \pm 3,5$ dias. A fase folicular ou de estro apresenta uma duração média de $6,5 \pm 2,6$ dias e a fase luteal ou de diestro $14,9 \pm 2,8$ dias durante a estação fisiológica de monta. A duração da fase folicular é primariamente influenciada pela estação do ano, podendo também sofrer variações individuais ou raciais. A duração do estro decresce com o avanço da estação, coincidindo com o auge do verão, época nas quais os dias são mais longos, o fotoperíodo é maior e a foliculogênese é acelerada. A duração média do estro para observações individuais varia de 2 a 12 dias e parece, imparcialmente, ter repetibilidade em cada indivíduo (DAELS, 2008).

A fase de estro ou fase folicular, em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo com mais de 25mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992).

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem não só ao comportamento de estro como também a elevação dos níveis de Hormônio Luteinizante (LH), e ativação dos receptores para LH nas células da granulosa, e conseqüentemente a ovulação e a formação do corpo lúteo (CL) (GINTHER, 1992).

A elevação dos níveis de estrógeno durante a fase estral é também responsável pela formação do edema uterino; o qual tende a ser diminuído nos dois dias que antecedem a ovulação (MCKINNON e CARNEVALE, 1993).

Já a fase de diestro ou luteal é caracterizada pelo término das manifestações dos sinais do cio, que ocorrem entre 24h e 48h após a ovulação, resultado da formação do CL e conseqüente produção de progesterona (HAYES e GINTHER, 1986). Sirois et al. (1989) consideram a ovulação como o início da fase luteal, e a fase final culminando com a luteólise, apresentando níveis plasmáticos de progesterona inferiores a 1ng/ml.

Na fase luteal, o CL produz progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia pós-ovulação. Esta secreção se mantém estável até o décimo segundo dia, quando ocorre uma redução acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona, em conseqüência da luteólise que ocorre entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do

ciclo estral (GINTHER, 1992). A luteólise é desencadeada pelo início da produção de estrógeno pelo folículo dominante que por sua vez aumenta os receptores de ocitocina no endométrio, sendo a ocitocina o gatilho para a síntese de prostaglandina endometrial. O folículo dominante próximo a luteólise também secreta inibina que inibe a produção de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), levando a atresia dos folículos subordinados (GINTHER, 1992).

Alterações fisiológicas podem ser observadas à palpação uterina, via toque retal, sendo usada clinicamente e experimentalmente como uma forma para determinar o estágio do ciclo estral nas éguas (HAYES e GINTHER, 1986).

Durante o estro o tônus uterino é relativamente flácido, tornando-se mais tenso durante o diestro, por volta do 16° ao 25° de gestação, quando o útero apresenta sua tensão máxima. No início da gestação o tônus uterino é de suma importância para a fixação e orientação da vesícula embrionária (HAYES e GINTHER, 1986).

Bonafos et al. (1994) afirmaram que a progesterona é o único fator capaz de promover um aumento do tônus uterino. A partir do 30° dia de gestação o tônus uterino não apresenta diferença entre éguas não prenhas, tratadas desde o dia da ovulação com 100 mg de progesterona e éguas prenhas. No entanto, entre os dias 11° e 29° de gestação as éguas prenhas apresentam um maior tônus devido a uma estimulação local realizada pelo concepto durante o período de mobilidade. Porém, Hayes e Ginther (1986) utilizando éguas ovariectomizadas, constataram que a progesterona é capaz de causar tônus equivalente ao observado no diestro, mas o tônus máximo, semelhante ao tônus encontrado por volta do 16° ao 25° dias pós-ovulação, só é detectado quando a progesterona esta associada ao estrógeno.

Samper (1997) afirmou que o edema uterino é um indicador confiável da competência estrogênica do folículo dominante, mas Watson et al. (2003) demonstraram que o edema uterino pode ocorrer na presença de folículos anovulatórios, até mesmo quando estes folículos produziram baixas concentrações de estradiol.

Com o uso da ultra-sonografia na reprodução equina na década de 80, uma maior precisão da atividade ovariana, no que diz respeito ao recrutamento, crescimento, divergência e atresia folicular, pode ser estudada (PALMER e DRIANCOURT, 1980), tendo sido correlacionada a dinâmica folicular aos mecanismos reguladores hormonais (MAPLETOFT et al., 1994; FORTUNE, 1994).

Em equinos, semelhante aos bovinos e ovinos, durante a fase luteal ocorre o desenvolvimento de ondas de crescimento folicular, diferente do que ocorre em ratos, suínos e primatas, onde o crescimento folicular fica restrito a fase folicular (FORTUNE, 1994).

Com a formação do antro folicular, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas para novo desenvolvimento, o qual é evidente pela expressão de receptores de FSH nas células da granulosa e de receptores de LH nas células da teca interna, ocorrendo o crescimento de vários folículos em sincronia, estabelecendo-se uma onda de crescimento folicular (WEBB et al., 1999).

Segundo Ginther (1992) a definição de onda folicular maior se aplica a um conjunto de folículos que inicialmente exibem crescimento sincronizado, sucedidos pelo crescimento preferencial de apenas um, ocasionalmente dois folículos. A onda folicular maior divide-se em onda primária e onda secundária. A onda folicular primária inicia-se na metade do diestro e da origem ao folículo ovulatório (>35mm). A onda secundária emerge no início do estro e usualmente resulta na formação de grandes folículos anovulatórios (>20 mm) ou, mais raramente, em ovulação durante o diestro. As ondas que não apresentam folículos dominantes são classificadas como ondas menores.

A ocorrência de ovulações durante o diestro, observadas em éguas (ovulações secundárias com incidência de 25%) durante uma fase em que as concentrações de LH encontram-se baixas, com a presença de alta progesterona, sugere que o aumento pré-ovulatório de LH não é um pré-requisito absoluto para o processo de ovulação nesta espécie. Como consequência, essas ovulações secundárias podem levar a uma condição de persistência luteal, já que no momento em que o endométrio está secretando Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), este CL secundário estaria refratário a ação luteolítica do mesmo (DAELS e HUGHES, 1993).

Estudos comparativos da dinâmica folicular entre raças, tem indicado maior predisposição a duas ondas foliculares para as raças PSI (STABENFELDT et al., 1972), Apallosa e Quarto de Milha (GINTHER e BERGFELD, 1993), quando comparadas com as raças Árabe e Pônei (GINTHER, 1992; DIMMICK et al., 1993) na primeira metade da estação reprodutiva.

Meira e Buratini (1998) realizaram um estudo visando a caracterização do desenvolvimento folicular em éguas Mangalarga. Os folículos maiores que 10 mm de diâmetro, no dia 17 do ciclo estral, foram diariamente monitorados individualmente por

ultrassonografia. Uma ou duas ondas foliculares foram detectadas, respectivamente, em 81,25% (13/16) e 18,75% (3/16) dos ciclos.

A ovulação na espécie equina ocorre quando o folículo atinge por volta de 35 a 60 mm, com média em torno de 45 mm (GINTHER, 1990; GINTHER, 1985; SHIRAZI et al., 2004)

O crescimento diário dos folículos recrutados durante as ondas foliculares, pode variar de 2,5 a 3,0mm (GINTHER, 1986). Porém, quando se beneficiam da estimulação ovariana através de preparados hormonais, o crescimento folicular diário pode alcançar 3,0 mm ou mais (MOURA e MERKT, 1996).

A atividade ovariana também tem sido estudada entre éguas jovens, adultas e idosas, apresentando uma maior queda desta atividade a partir dos quinze anos de idade, onde se observa um atraso na emergência das ondas foliculares, no prolongamento do intervalo interovulatório e redução da população de folículos nas ondas foliculares (GINTHER e BERGFELT, 1993; CARNEVALE e GINTHER et al., 1995).

Mckinnon et al,(1988), estudando folículos pré-ovulatórios observaram que a ovulação ocorre num período de 5 a 90 segundos, quando pouco ou nenhum líquido folicular fica interno ao folículo após a ovulação.

Na égua, a secreção do LH não ocorre de maneira abrupta como nos outros mamíferos, mas sim de maneira crescente e essa produção se inicia 6 a 8 dias antes da ovulação (GINTHER, 1979). A produção mais alta de LH irá ocorrer aproximadamente entre o 1° e 3° dia pós-ovulação. O final da maturação do oócito, a ruptura do folículo e a evacuação do fluido folicular tem que ser bastante coordenada para que ocorra um sucesso na ovulação (PIERSON, 1993).

Aspecto relevante relativo à endocrinologia reprodutiva de equinos é que o pico de LH ocorre aproximadamente 2 dias após a ovulação, e a concentração de LH na circulação permanece elevada por um longo período, podendo estender-se por uma semana ou mais pós-ovulação (MILLER et al., 1980). Greaves et al. (2001) sugeriram que a queda na liberação de LH pós-ovulação ocorre devido a um "feedback" negativo entre a progesterona e o GnRH. A progesterona age na hipófise, alterando a responsividade ao GnRH e com isso promove redução da secreção de LH. O GnRH é o regulador mais expressivo da secreção tanto de LH quanto de FSH em éguas em diestro.

3.3 - Frequência de ovulações múltiplas na égua.

Ovulações múltiplas (predominantemente ovulações duplas) podem ocorrer normalmente em éguas, sendo esta característica uma variação individual de cada animal, havendo também um fator hereditário envolvido. A incidência de ovulações múltiplas em um determinado ciclo estral em éguas está entre 4 e 43% . Vários fatores como, raça, predisposição genética, estágio reprodutivo, estação do ano e nutrição, têm influenciado a incidência de ovulação dupla (SQUIRES et al,1987; GINTHER, 1992).

Zúccari et al (2002) ao acompanharem o ciclo estral de 122 éguas da raça pantaneira entre os anos 1995 e 2000, não observaram nenhuma ovulação múltipla, já Pimentel et al (1995) identificaram 7,1% de ovulações múltiplas entre as 3361 éguas, predominantemente da raça Criolo Gaúcho, abatidas em Pelotas – RS entre 1988 e 1989, das quais 6,5% de dupla, 0,5% de tripla e 0,1% de quádrupla, na raça puro-sangue, já em cavalos de tração a incidência de ovulações múltiplas, variou entre 15 e 30%, enquanto que em pôneis apresentou-se menor (2-10%).

Carmo et al, (2003), estudaram a incidência de ovulações duplas em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de TE. De um total de 829 ciclos estrais analisados, 47 % foram de ovulações simples e 53% de ovulações múltiplas (duplas ou triplas), obtendo uma taxa de recuperação embrionária de 59% nos ciclos de ovulação simples e 88% nos ciclos de ovulações múltiplas.

A ocorrência de ovulação dupla aumenta a probabilidade de recuperação embrionária em relação a ovulações únicas. Trabalhos de superovulação têm resultado em aumento no número de embriões coletados, embora a relação número de embriões e número de ovulações seja semelhante à observada quando há ovulação única (DIPPERT et al., 1992; ROSAS et al., 1998).

Squires et al. (1987) estudaram as características reprodutivas de éguas que apresentaram ovulações simples ou duplas espontâneas e de éguas superovuladas com EPE. A recuperação embrionária no sétimo dia pós-ovulação foi de 58,2% para éguas com ovulação simples e de 106% para éguas com ovulação dupla espontânea. Adicionalmente, as éguas superovuladas produziram cerca de 3 vezes mais embriões do que as éguas controle (2,0 vs. 0,65 embrião/égua).

3.4 - Superovulação

Economicamente há uma necessidade de aumentar a taxa de sucesso da TE e isto é possível caso se consiga induzir ovulações múltiplas ou superovulação, na égua doadora, na tentativa de aumentar a taxa de recuperação embrionária por lavado uterino. Não esquecendo, no entanto, que esta melhoria continua a depender do manejo reprodutivo preciso e sincronização das éguas doadoras com as receptoras (RAZ et al., 2006).

O tratamento superovulatório aumenta significativamente a eficiência e diminui potencialmente o custo de um programa de TE. No entanto, a indução de ovulações múltiplas na espécie equina não é um procedimento tão eficaz quando comparado a outras espécies domésticas. De acordo com Scherzer et al. (2008) a superovulação em éguas se encontra com sucesso limitado atualmente, na qual as taxas de recuperação embrionária são inconsistentes e abaixo das expectativas (ALVARENGA et al., 2001, NISWENDER et al., 2003).

De fato, a anatomia do ovário e a ausência de um produto que induza ovulações múltiplas de forma precisa, são as duas principais razões para que a superovulação não seja uma técnica comumente utilizada na reprodução de equinos (SQUIRES, 2006).

Vários hormônios têm sido estudados a fim de melhorar os índices de coleta de embriões, tais como: GnRH, FSH suíno (FSH-p) e equino (FSH-e), gonadotrofina coriônica equina (ECG), imunização contra inibina, E.P.E. (SQUIRES, 1986; MCCUE et al., 1992; GINTHER e BERGFELT, 1993; NISWENDER et al., 2003; SQUIRES e MCCUE 2007). Dentre estes, o FSH-e e o EPE são os que apresentam resultados mais consistentes. Contudo, a baixa taxa de recuperação embrionária ainda é o maior entrave na superovulação em éguas (BONIN et al, 2009).

A partir de 2003, um purificado FSH-e (Bioniche Animal Health Canada) tornou-se disponível comercialmente, conseqüentemente poucos e recentes experimentos foram conduzidos usando este produto na superovulação em éguas . Além disso, este produto não é encontrado no mercado brasileiro, sendo então de custo elevado para aquisição, o que torna incomum seu uso a campo (ALVARENGA et al., 2008).

Os protocolos usualmente utilizados são baseados na administração de 12 mg de FSH-e duas vezes ao dia, resultando em taxas de 3,4 a 5,2 ovulações por égua (NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007).

De 170 éguas tratadas com EPE, foi obtida uma média de 3,2 ovulações e foram recuperados 1,96 embriões por égua, contrastando com o grupo não tratado que recuperou apenas 0,65 embrião por égua (SQUIRES e MCCUE 2007). Alvarenga et al. (2001) utilizando 25 mg de EPE, duas vezes ao dia, demonstraram uma melhora no percentual de ovulações, apresentando uma média de 4 a 7 ovulações por égua, porém com baixa taxa de recuperação embrionária.

Carmo et al. (2005) e Carmo (2007) avaliaram ovitutos quanto à presença e quantidade de oócitos obtidos em éguas superovuladas com EPE, 25 mg, duas vezes ao dia, a partir do dia 7 pós-ovulação e um grupo controle. Constataram a superioridade do número de ovulações das éguas superovuladas ($4,41 \pm 2,90$) ao grupo controle ($1,16 \pm 0,40$), e obtiveram uma taxa de recuperação de oócito/ovulação próximo de 60% no grupo superovulado contra 85% de recuperação no grupo controle, demonstrando que ocorre algum problema na captação dos oócitos para o oviduto em éguas superovuladas, sendo percebido apenas a formação de um grande coágulo que poderia impossibilitar a captação dos oócitos pelas fimbrias. Contudo, no grupo de éguas superovuladas, as que responderam com menos de 3 ovulações apresentaram taxa de recuperação de oócito no oviduto similar à obtida no grupo controle (80%)

Em busca de desenvolver uma terapia que permita uma maior taxa de embriões recuperados por ovulação tem sido proposto baixas doses de EPE (6 mg) ou de FSH-e (5mg), ambos com uma única dose ao dia, demonstrando eficácia de tal procedimento (FARINASSO 2004; ARAUJO et al., 2009).

Farinasso (2004) é responsável por um dos maiores avanços recente na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas, com a utilização de baixas doses de EPE. Utilizando éguas no diestro (6 a 9 dias), as éguas foram induzidas ao cio com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e submetidas ao tratamento diário com EPE, por via intramuscular, até o momento em que um ou mais folículos atingissem 35 mm de diâmetro. Foram testados três doses de EPE 2, 4 e 6mg. Apenas as doses de 4 e 6 mg, duas vezes ao dia, elevaram a taxa de ovulação em relação ao grupo controle e promoveram aumento significativo de ovulações duplas e triplas em 76,9 % dos ciclos tratados. Para o tratamento com 6 mg foi obtida a média de $1,84 \pm 0,75$ embriões/ciclo. Desta forma, o protocolo garantiu um embrião/lavado, o que pode tornar o uso de EPE economicamente viável.

A observação que a taxa de recuperação embrionária por ovulação é mais alta em éguas com 3 ou menos ovulações indica que a utilização de baixa dose de EPE ou de FSH-e, aponta ter uma resposta ovariana menor, o que parece ser o melhor modo para

progredir o número de embriões produzidos em programas de TE (ALVARENGA et al., 2008). Para Araújo et al. (2009) realizando-se um leve ajuste na dose e na frequência de administração do FSH-e, juntamente com a seleção de animais, baseando-se na população folicular, será constantemente possível induzir ovulações duplas e triplas, com recuperação de embrião satisfatória, a um custo inferior aos protocolos superovulatórios convencionais.

O tratamento com hormônio libertadora de gonadotrofina (GnRH) vinha sendo descrito como capaz de induzir ovulação em éguas em anestro, fora da época reprodutiva (JOHNSON, 1986; JOHNSON, 1987 GINTHER e BERGFELT, 1993).

No entanto, quando em estação de monta, este hormônio não apresentava relatos de eficácia na indução de ovulações múltiplas (HARRISON, et al.,1990; HARRISON,et al.,1991). Porém resultados recentes de Nagao et al.(2010), revolucionam as perspectivas do uso deste hormônio, ao relatarem a indução de ovulação dupla, utilizando, baixa dose de GnRH, obtendo um percentual de 85%, de éguas com pelo menos duas ovulações por ciclo, com um número de ovulações por ciclo (26/48) e a porcentagem de embriões recuperados por ciclo (55%/90%), para controle e tratados, respectivamente.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.S. O ciclo estral da egua e o seu controle endócrino. In: **Fisiologia e manejo da reprodução equina**. 2 ed, Recife, 1986, p. 57 – 63.

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

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

ARAUJO G.H.M., ROCHA FILHO A.N., LOPES E.P., MOYA C.F. e ALVARENGA M.A.. Use of a low dose to equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. **Reprod. Dom. Anim.** 44:380-383, 2009.

BONAFOS, L. D.; CARNEVALE, E. M.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. **Theriogenology**, v. 42, p. 1247- 1255, 1994.

BONIN, B. F. e ALVARENGA, M.A Efeito do Tratamento com Extrato de Pituitária Equina na Resposta Ovariana e Eficiência Reprodutiva de Éguas Idosas em Programa de Transferência de Embriões. **Dissertação F.M.V.Z.** UNESP, Botucatu-SP. (2009)

CARVALHO,G.R. **Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões em equinos**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 103p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) 2000.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em equinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUCAO ANIMAL**, 16, 2005, Goiânia. Anais..., 2005.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology Reproduction Monogr.** v.1. p. 209-214. 1995.

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

CARMO, M.T.; LIMA, M.M.; TRINQUE, C.L.N.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Incidência de ovulações múltiplas unilaterais e bilaterais e suas implicações nos índices de recuperação embrionária em éguas da raça brasileiro de hipismo. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Beberibe, 2003. **Acta Sci. Vet.**, v.31 (suplemento), p.282, 2003.

CARMO, M.T. TRINQUE, C.L.N.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Efeito da superovulação com extrato de pituitária equina no transporte de oócitos para o oviduto de éguas. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis, 2005. **Acta Sci. Vet.**, v.33 (suplemento), p.179, 2005.

CARMO, M.T, Disturbs on oocyte transport and maturation of mares superovulated with Equine Pituitary Extract. 156p, **PhD Thesis** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2007.

DAELS,P.F.;HUGHES,JP. The normal estrous cycle. In: McKINNON, A.O.;VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993.p 121-132.

DAELS, P.F. New technics of artificial insemination in the mare. In: 20de Studiedag van de / 21eme **Journee d'etude de la Belgian Equine Practitioners Society** – BEPS. 2002. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 15 mai 2008.

DIPPERT, K.D.; HOFFERER, S.; PALMER, E.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, v.38, p.695-710, 1992.

DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.;VAN TOL, H.T.M.; WILLENSE, A.H. Peripheralplasma concentration of estradiol, progeterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period . **Anim. Reprod. Sci** ., Amsterdam, v. 10, p. 275 – 292, 1986.

DIMMICK M.A, GIMENEZ T, SCHILAGER R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian v.s., Quarter Horse mares. **Anim. Reprod. Sci.** Amsterdam, v. 31, p. 123 – 129, 1993.

FARINASSO, A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas. 2004. 60 f. **Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília**, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; FIGUEIREDO, J.B.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec** . Porto Alegre, v. 39, n.3, p. 485-487, 1987.

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

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects.ed. Wisconsin: **Equiservices**, Cross Plains, Wisconsin, 1979. p. 413.

GINTHER, O. J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 311-320, 1990.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles.**J. Reprod. Fertil** ., London, v. 99, p. 105 – 111, 1993.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., LEITH, G.S. & SCRABA, S.T. (1985). Embryonic loss in mares: incidence and ultrasonic morphology. **Theriogenology**, 24, 73-86.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed, Wisconsin: **Equiservices**, Cross Plains, 1992. 640 p.

GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Sao Paulo: Varela, 2002, p. 340.

GREAVES, H. E.; KALARIOTES, V.; CLEAVER, B. D.; PORTER, M. B.; SHARP, D. C. Effects of ovarian input on GnRH and LH secretion immediately postovulation inpony mares. **Theriogenology**, v. 55, p. 1095-1106, 2001.

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

HARRISON, L.A., SQUIRES, E.L., NETT, T.M. & MCKINNON, A.O. (1991). Comparison of hCG, buserelin and luprostirol for induction of ovulation in cycling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 11, 163-166.

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v. 25, p. 581-590, 1986.

HUGHES, J. P.; COUTO, M. A.; STABENFELD, G. H. Luteal Phase Ovulation : What are the options? **Theriogenology**, v. 26, p. 123-125, 1986.

LOPES, E.P. Desmistificando a transferencia de embriões. **Top 2000 Mangalarga Marchador**. v.1, n.1, p.6, 2002.

LOGAN, N.L., MCCUE, P.M., ALONSO, M.A. & SQUIRES, E.L. (2007). Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. **Animal Reproduction Science**, 102, 48-55.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. et al. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology** 29, 1055-1063, 1988.

MERKT, H.; KLUG, E.; JOCHLE, W. Reproduction management in the german thoroughbred breeding industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, p.231-239, 2000.

MCCUE, P.M., CARNEY, N.J., HUGHES, J.P., RIVIER, J., VALE, W. & LASLEY, B.L. (1992). Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against na inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, 38, 823-831.

MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for superovulation . **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet .**, Princeton Junction, v. 16, p. 127 – 141, 1994.

- MEIRA C. e HENRY M.. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. **J. Reprod. Fertil.** 44(suppl.):712-713, 1991 .
- MEIRA, C.; BURATINI, J. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS.** v. 26, n. 1, p. 125-133, 1998.
- MOURA, A. J.C.; MERKT, H. A ultra-sonografia na reprodução equina. 2. ed. Salvador, BA: **Editora Universitária Americana**, 1996. 162 p.
- MILLER, K. F.; BERG, S. L.; SHARP, D. C.; GINTHER, O. J. Concentrations of circulating gonadotropins during various reproductive states in mares. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 744-750, 1980.
- NISWENDER, K.D., ALVARENGA, M.A, MCCUE, P.M., HARDY, Q.P. & SQUIRES, E.L. (2003). Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, 23, 497-500.
- NAGAO, J.F.; GODOY, T.P.; NETO, JN; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Indução de ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de acetato de delorelina. In: .Anais da XX IV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE- (Porto de Galinhas,Pernambuco), (2010).
- NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-262, 2000.
- OGURI, N., TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and na attempt at nonsurgical egg transfer in horse. **J Reprod. Fertil** . London, v. 31, p. 187, 1972.
- PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic ecography in equine gynecology, **Theriogenology** ., Los Altos, v. 21, p. 471 – 483, 1980.
- PASTORELLO M., MEIRA C., FLEURY J.J. e DUARTE M.C.G. Transferência não cirúrgica de embriões em eqüinos de hipismo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS** 24:212, 1996.
- PIMENTEL, C.A.;TAROUCO,A.K.;HAMMES,A.M. Ovulações múltiplas em éguas abatidas em Pelotas-RS, **Ciência Rural**, Santa Maria,v.25,n2,p.271-275,1995.

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

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

RAZ, T., GREEN, J., CORRIGAN, M. & CARD, C. (2006). Folliculogenesis, embryo parameters, and post-transfer recipient pregnancy rate in eFSH-treated donor mares. In **Proceedings of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, San Antonio, USA, 2-6 December, pp.393-397. USA: AAEP.

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

STABENFELDT, G.H.; HUGHES J.P.; EVANS J.W. Ovarian activity during the estrous cycles of the mare. **Endocrinology** ., Baltimore, v. 90, p. 1379 – 1383, 1972

SCHERZER, J., FAYRER-HOSKEN, R.A., RAY, L., HURLEY, D.J. & HEUSNER, G.L. (2008). Advancements in Large Animal Embryo Transfer and Related Biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, 43(3), 371-376.

SHIRAZI, A.; GHARAGOZLOO, F.; GHASEMZADEH-NAVA, H. Ultrasonic characteristics of preovulatory follicle and ovulation in Caspian mares. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 261-266, 2004.

SIROIS, J.; BALL, B. A.; FORTUNE, J. E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, p. 43-48, 1989. supplement. 8.

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

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

SQUIRES, E.L.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR., G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, n.5, p.661-670, 1986.

SQUIRES E.L. Superovulation in Mares. **Vet. Clin. Equine** 22:819-830, 2006.

SQUIRES, EL ,MCCUE PM - Superovulation in mares. **Animal reproduction science**, 2007 – Elsevier

TAVEIROS, A.W, OLIVEIRA M.A.L., LIMA. P.F. Estratégias de manejo para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas equinas da raça mangalarga machador. **Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária da UFRPE**. 2008

ZÚCCARI, C.E.S.N., D.B. NUNES E R.A.C. CORRÊA FILHO. Eficiência reprodutiva de éguas da raça pantaneira durante as estações de monta 1995/2000. **Arch. Zootec.** 51: 139-148. 2002

WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; NIKOLAKOPOULOS, E. Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. **Theriogenology**, v. 59, p. 1181-1187, 2003.

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 Reproduction Fertility**, Suppl.54, 33-48, 1999.

5. CAPÍTULO 1

**INDUÇÃO DE OVULAÇÕES DUPLAS UTILIZANDO BAIXA DOSE DO
ANÁLOGO DE GNRH (DESLORELINA) EM ÉGUAS.**

INDUÇÃO DE OVULAÇÕES DUPLAS UTILIZANDO BAIXA DOSE DO ANÁLOGO DE GnRH (DESLORELINA) EM ÉGUAS

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho induzir ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de GnRH (deslorelina), determinar seu impacto sobre a eficiência reprodutiva e resultados econômicos em um programa comercial de transferência de embriões, no agreste pernambucano. Foram utilizadas quinze éguas doadoras de embrião sendo dez da Raça Quarto de Milha e cinco da raça Mangalarga Machador, com idade entre oito e vinte anos. O grupo 1 (G1) iniciou-se com o monitoramento do ciclo estral, inseminação artificial durante o estro e colheita de embriões no oitavo dia pós ovulação. O Grupo 2 (G2) constituído pelas mesmas éguas do G1, teve início com a aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina, e o monitoramento dos ovário através de ultrassom duas vezes ao dia, até detecção do maior folículo com 23 a 25 mm e o segundo > 18mm, onde foi iniciado o tratamento, com 100 µg de acetato de deslorelina, com intervalo de 12 h, até que o maior folículo atingisse 33 a 35 mm de diâmetro, quando foi realizada a indução da ovulação através da aplicação 1000 µg de acetato de deslorelina IM associado a 1000 UI de hCG IV. O percentual de éguas com ovulações múltiplas no G1 e G2 foi de (2/15) 13,33% e de (13/15) 86,66%, respectivamente ($P < 0,05$). Também foi observado um incremento no número de embriões recuperados sendo no G1 apenas 9 e 16 embriões no G2 ($P < 0,05$), com uma média de recuperação embrionária de $0,6 \pm 0,48$ no G1 e de $1,066 \pm 0,497$ no G2 ($P > 0,05$); um percentual de recuperação embrionária por lavado de 60% G1 e de 80% no G2 ($P < 0,05$). Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que a administração GnRH (deslorelina) em baixa dose em éguas doadoras de embriões interferiu positivamente no crescimento do folículo dominante e do segundo folículo, aumentando a incidência de ovulações multiplas, incrementando dessa forma a da taxa de recuperação embrionária por ciclo, melhorando a eficiência reprodutiva das éguas doadoras tratadas.

Palavras-chave: Embrião, Baixa dose GnRH, Folículo dominante, co-dominância.

DOUBLE OVULATION INDUCTION USING LOW DOSE OF GnRH ANALOGUE (DESLORELIN) IN MARES

ABSTRACT

This study was aimed to induce multiples ovulations in mares using low doses of GnRH, determine its impact on a reproductive performance and economic results in a commercial program for embryo transfer, in northeastern Brazil. It was used 15 embryo donors mares 10 from Quarter Horse Breed and 5 from Mangalarga Machador Breed, aged between 8 and 20 years. After they were monitored and inseminated during estrus and realized the embryo collection constituting the G1, it was applied 7.5mg dinoprostromethamine and included in the experimental group G2, the G2 consisting of the same mares of G1, experiment was started with started the ultrasound examinations twice a day, to detect the largest follicle with 23 to 25 mm and the second > 18 mm, ideal moment to start the treatment, with 100 µg of deslorelin acetate, with an interval of 12h, until the largest follicle reaches 33 to 35 mm in diameter, level where the ovulation induction will be realized with 1000 µg of deslorelin acetate associated IM to 1000 UI of hCG IV. The mares percentage with multiple ovulations in the control cycle (G1), experimental cycle (G2) were (2/15) 13.33% and (13/15) 86.66%, respectively ($P < 0.05$). It was also observed an increase in the embryos recovered number being in the control group only 9 when in the experimental group were 16 embryos ($P < 0.05$), with an embryos/mares average of 0.6 ± 0.48 in the control group and 1.066 ± 0.497 in the experimental group ($P > 0.05$); with an embryo recovery rate of 60% G1 and 80% in G2 ($P < 0.05$). It can be concluded from the results in this experiment that the administration of low-dose GnRH in embryo donors, interfered positively in the growth of the dominant follicle and the second follicle, increasing the incidence of multiple ovulations, incrementing the embryo recovery rate per cycle, improving the reproductive efficiency of treated donors.

Keywords: Embryo, low-dose GnRH, dominant follicle, ultrasound.

INTRODUÇÃO

A transferência de embrião (TE) em equinos no Brasil ocupa lugar de destaque na utilização desta técnica ao lado dos Estados Unidos e da Argentina, sendo um dos líderes, realizando em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (CARNEIRO, 2005).

A fêmea equina por natureza é monovular, portanto, a possibilidade de se incrementar o número de ovulações no ciclo estral da égua traz consigo potenciais benefícios, como o aumento no número de oócitos disponíveis para aplicação de diferentes técnicas de reprodução assistida e aumento no número de embriões recuperados em uma única colheita, com conseqüente redução dos custos do programa de transferência de embriões.

O tratamento superovulatório aumenta significativamente a eficiência e diminui potencialmente o custo de um programa de TE. No entanto, a indução de ovulações múltiplas na espécie equina não é um procedimento tão eficaz quando comparado a outras espécies domésticas (ALVARENGA et al., 2001, NISWENDER et al., 2003). De acordo com Scherzer et al. (2008) a superovulação em éguas se encontra com limitado sucesso atualmente, na qual as taxas de recuperação embrionária são inconsistentes e abaixo das expectativas.

Vários hormônios têm sido estudados a fim de melhorar os índices de coleta de embriões, tais como: fatores liberadores de gonadotrofinas (GnRH), FSH suíno (FSH-p) e equino (FSH-e), gonadotrofina coriônica equina (ECG), imunização contra inibina, extrato de pituitária equina (E.P.E.) (SQUIRES, 1986; MCCUE et al., 1992; GINTHER & BERGFELT, 1993; NISWENDER et al., 2003; SQUIRES & MCCUE 2007). Dentre estes, o FSH-e e o EPE são os que apresentam resultados mais consistentes. Contudo, a baixa taxa de recuperação embrionária e o custo do tratamento ainda é o maior entrave na superovulação em éguas.

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) vinha sendo descrito como capaz de induzir ovulação em éguas em anestro, fora da época reprodutiva (JOHNSON, 1986; JOHNSON, 1987). No entanto, quando em estação de monta, este hormônio vinha sendo encarado como sem qualquer eficácia na indução de ovulações múltiplas (HARRISON, et al., 1990; HARRISON, et al., 1991), no entanto GINTHER e BERGFELT, (1990); citam a possibilidade desta eficiência, ao tratar éguas fora da

estação de monta, por longos períodos com baixa dose de GnRH-A (análogos de GnRH), demonstrando haver um incremento no número de ovulações duplas em comparação ao grupo controle, no entanto, resultados recentes de Nagao et al, 2010, com baixa dose de GnRH, relatando um percentual de ovulações duplas por ciclo de 85%, ampliando assim as possibilidades de uso deste hormônio.

Portanto objetiva-se com este trabalho induzir ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de GnRH, determinar seu impacto sobre a eficiência reprodutiva e resultados econômicos em um programa comercial de transferência de embriões, no nordeste brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva 2010 e 2011, nos meses de setembro a fevereiro dos anos citados, na Central de Reprodução Ilana Reprodução Equina, localizada no município de Pombos, a uma latitude 08°08'29" sul e a uma longitude 35°23'45" oeste, a uma altitude de 208 metros, situada na região agreste do estado de Pernambuco.

Foram utilizadas quinze éguas doadoras de embrião, sendo dez da raça Quarto de Milha e cinco da raça Mangalarga Machador, com idade entre oito a vinte anos e pesando 450 a 550 Kg. As éguas foram selecionadas por meio de exame clínico ginecológico, comprovando que as éguas utilizadas estavam híidas e em plena atividade reprodutiva e com escore corporal ideal. Os animais foram mantidos em baias com feno de Tifton, água e sal mineral *ad libitum* e quatro kg de ração comercial peletizada própria para equinos, dividida em dois fornecimentos ao dia.

O Grupo controle (G1), consistiu no monitoramento diário do ciclo estral e inseminação durante o estro e a colheita de embrião no oitavo dia pós-ovulação.

O Grupo tratado (G2), consistiu da aplicação de 7,5 mg de dinoprostrometamina, como agente luteolítico, sendo realizados os exames de ultrassom duas vezes ao dia, iniciando no dia da aplicação do agente luteolítico, até detecção do maior folículo com diâmetro de 23 a 25 mm e o segundo folículo \geq a 18mm, quando foi iniciado o tratamento superovulatório, com 100 μ g de acetato de deslorelina, a cada 12 h, até que o maior folículo atingisse o diâmetro de 33 a 35 mm de diâmetro, quando foi realizada a indução da ovulação com 1000 μ g de acetato de deslorelina IM associado a 1000 UI de hCG IV.

Dois ciclos consecutivos foram utilizados, sendo no primeiro o grupo controle (G1) e o segundo experimental (G2). Dessa forma, cada animal utilizado foi o seu próprio controle.

Nos dois ciclos estudados, desde o dia zero, aplicação do agente luteolítico, até a ovulação, as éguas doadoras tiveram a atividade ovariana e condição uterina monitoradas, duas vezes ao dia por ultrassonografia transretal com auxílio de um aparelho Aloka, 500 Japan, equipado com um transdutor linear de 5 MHz. Os diâmetros dos maiores folículos foram determinados por meio da média aritmética das duas maiores distâncias transversais do antro folicular em uma única imagem congelada no monitor do aparelho de ultrassonografia de acordo com Ginther, et al (1995) em todos os grupos.

O GnRH (Acetato de Deslorelina) utilizado no trabalho foi produzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp-Botucatu, SP, Brasil.

A análise estatística seguiu a verificação da tendência de normalidade, verificando se a população seguiu uma distribuição Gaussiana, através do método de Shapiro-Wilks. O qual foi realizado no programa computacional Statistica 6.0 (Copyright[©] StatSoft, Inc., 2001). Dependendo da tendência normalidade os resultados obtidos seguiram para testes paramétricos ou não paramétricos. Os testes estatísticos para verificação de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais, foram realizados no programa computacional InStat (GraphPad Software, Inc., 2000). Os dados considerados normais foi utilizado o teste T-independente ou teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Para os dados que não seguiram uma tendência normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn.. O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de éguas com ovulações múltiplas no grupo controle (G1) foi de 13,33% (2/13) e no grupo experimental (G2) foi de 86,66% (13/15) ($P < 0,05$). A média de ovulação no G1 foi de $1,13 \pm 0,231$ e de $1,86 \pm 0,23$ no G2 ($P < 0,05$). Em nenhum

dos ciclos foi observado falha da ovulação ou mesmo desenvolvimento de folículos hemorrágicos. Nos ciclos com mais de uma ovulação as mesmas ocorreram em intervalo de tempo médio de 24 horas.

O tratamento com GnRH (G2) resultou em um maior número de embriões sendo 9 para o grupo G1 e 16 no G2, com uma média de embriões por ciclo de $1,066 \pm 0,49$ e no G1 $0,6 \pm 0,48$ ($P < 0,05$). O percentual de embriões por ovulação foi de 52,94% no G1 e 57,14% no G2, ($P < 0,05$). Tendo um percentual de lavados positivos de 60% no G1 e G2 foi de 80% ($P < 0,05$).

Tabela 1 – Número de ovulações e produção de embrião do grupo controle e grupo experimental.

Variáveis	G1	G2
Número de Animais	15	15
Número Ovulações	17a	28b
P = 0,0002		
Ovulações por Égua	$1,13 \pm 0,231a$	$1,86 \pm 0,23b$
P = 0,0001		
Éguas com ≥ 2 Ovulações (%)	(2/15) 13,33a	(13/15) 86,66 b
P = 0,0001		
Número de Embriões	9a	16b
P = 0,0018		
Embriões por Égua	$0,6 \pm 0,48a$	$1,066 \pm 0,497b$
P = 0,0464		
embriões por Ovulação (%)	52,94a	57,14b
P = 0,0006		
Embriões por Lavado (%)	60a	80b
P = 0,0001		

Letras iguais, não há diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Letras diferentes há diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Neste experimento o tratamento com análogo de GnRH (G2) foi capaz de estimular com eficiência a indução de ovulações múltiplas, tendo em vista que o percentual de éguas com duas ovulações foi de 86,66% (13/15) enquanto o grupo controle foi de 13,33% (2/15). Apresentando maiores resultados do que os reportados para tratamentos com baixa dose de EPE, como os relatados por Bonin e Alvarenga (2009) com 65% (13/20), Douglas (1979) obteve 75%, Farinasso (2004) demonstrou 76,9% e Carmo (2007) relatou 84% e ainda valores menores como os 30,8% de Rocha

Filho (2004), se aproximando também aos 85% encontrados por Nagao et al (2010) com tratamento com GnRH.

Na tabela 1 é possível observar que houve um incremento no número de ovulações com o uso do GnRH em baixas doses, 17 ovulações no G1 para 28 G2, com uma média de $1,13 \pm 0,231$ no G1 e de $1,86 \pm 0,23$ no G2, ($P < 0,005$) concordando com Ginther e Bergfelt, (1990) e com Nagao et al (2010), que obtiveram um aumento no número de ovulações múltiplas nas éguas submetidas ao tratamento com análogo de GnRH, obtendo 75% e 85% de éguas com ovulações múltiplas respectivamente.

Em nenhum dos ciclos foi observado falha da ovulação, desenvolvimento de folículos anovulatórios ou folículos hemorrágicos o que seria esperado segundo Dippert et. al. (1994); Lapin e Ginther, (1997) para éguas submetidas a tratamento superovulatório.

Este aumento no número de ovulações resultou em um incremento no número de embriões recuperados que no G1 foi de apenas nove, enquanto no G2 foi de 16 embriões, com uma média de $0,6 \pm 0,48$ no grupo controle e de $1,066 \pm 0,497$ no grupo experimental ($P < 0,05$), concordando com Ginther (1992) e Carmo et al, (2003), aos quais relatam que o aumento na taxa de ovulação aumenta o número de embriões recuperados. A média do grupo G2 foi muito próxima aos resultados reportados por Carmo et. al, (2003) (EPE ,25 mg Bid) média 1,1; Bonin et al 2009 (EPE 7,0 mg Bid) média de 1, bem como outros trabalhos com ovulações múltiplas que relatam a recuperação de aproximadamente 1 a 2 embriões por ciclo (DOUGLAS, 1979; WOODS & GUINTER, 1984; McCUE, 1996, MACHADO, 2003; FARINASSO, 2004).

Analisando a média de recuperação embrionária do grupo controle ($0,6 \pm 0,48$) observa-se que foi semelhante a relatos anteriores como (0,6 embriões/ciclo) Alvarenga et al. (2008) e de 0,7 reportada por Hunt et al. (2005).

Analisando o número de embriões recuperados por ovulação obtivemos 52,94% nos grupos controle e 57,14% no grupo tratado, com diferença significativa ($P < 0,005$). Quando comparamos com resultados encontrados em outros trabalhos utilizando EPE observamos que são próximos aos descritos por Woods & Ginther (1984) 60% grupo tratado e 70% grupo controle, mostrando-se superiores aos dados encontrados por Alvarenga, (2001); Scoggin et al, (2002); Carmo et. al., (2003); Machado et. al, (2003), onde obtiveram 49%, 43,2%, 30,2% e 26%, respectivamente.

A taxa de recuperação embrionária por lavado foi de 60% no grupo controle e de 80% no grupo experimental, dado do G2 que foi penalizado por 2 éguas que não

responderam ao tratamento, porém a média de embrião por égua atingiu $1,066 \pm 0,497$, pois outras três éguas produziram dois embriões por lavado, tendo resultados melhores aos reportados por Taveiros, et al. (1999), os 53,0% sem tratamento superovulatório, os 63,4% de Jacob et al. (2002) e os 72,7% de Guimaraes et al (2007) com tratamentos com EPE em baixa dose e inferior aos 86,3% reportados por Taveiros et al (2008) sem tratamento superovulatório.

Houve também um incremento na taxa de recuperação embrionária quando comparado com o número de ovulações, que no grupo controle foi de 52,94% enquanto no grupo experimental foi de 57,14%, ($P < 0,05$).

Os Resultados comprovam o ação do GnRH, como dito por Greaves et al. (2001) que este hormônio, é o regulador mais expressivo da secreção tanto de LH quanto de FSH em éguas. Sua ação provavelmente aumentou os níveis de FSH e LH, possibilitando a co-dominância folicular, culminando com ovulações múltiplas nas éguas tratadas com baixas doses dessa substância.

Tabela 2 – Número de ovulações e produção de embrião do G1 Quarto de Milha (QM), G1 Mangalarga (MM), G2QM E G2MM.

Variáveis	G1 QM	G1 MM	G2QM	G2MM
Número de animais	10	5	10	5
Número Ovulações	12 b	5 a	18 b	10 b
P = 0,0010				
Ovulações por Égua	$1,2 \pm 0,42$ ac	$1,0 \pm 0,0$ ca	$1,8 \pm 0,42$ b	$2,0 \pm 0,0$ b
P=0,0001				
Éguas com ≥ 2 Ovulações (%)	(2/8) 20 a	(0/5) 0 c	(8/10) 80 b	(5/5) 100 b
P = 0,001				
Número de Embriões	6 a	3 c	10 b	6 a
P = 0,0213				
Embriões por Égua	$0,6 \pm 0,52$	$0,6 \pm 0,55$	$1,0 \pm 0,82$	$1,2 \pm 0,45$
P = 0,2452				
Embriões por Ovulação (%)	50,00 a	60,00 bc	56,00 bd	60,00 bc
P = 0,0001				
Embriões por Lavado (%)	60 ac	60 ac	100 bd	120 b
P = 0,0001				

Letras iguais, não há diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Letras diferentes há diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Na Tabela 2 podemos observar os resultados por raças estudadas e percebemos que as duas raças responderam de forma semelhante ao tratamento com GnRH, tendo uma taxa de ovulação média de $1,8 \pm 0,42$ para o G2 Quarto de Milha (G2 QM) e $2,0 \pm 0,0$ para o G2 Mangalarga Machador (G2 MM), resultados que diferem pelo número de indivíduos estudados por grupo G1MM tem apenas cinco e o G1QM 10 animais, e duas éguas do G1 QM que não responderam ao tratamento.

O mesmo pode ser observado quanto à produção média de embriões por raça que obtivemos resultados semelhantes, $1,0 \pm 0,82$ G2 QM e $1,2 \pm 0,45$ G2 MM, superando a média encontrado no Grupo G1 $0,6 \pm 0,48$ e $0,6 \pm 0,55$ QM e MM, respectivamente..

Outro dado importante a ser observado é que as raças também apresentam grande similaridade na percentagem de embriões recuperados, sendo 60% para G1 MM e QM , no G2 100% para QM e 120% para MM, resultado que eleva muito a rentabilidade da produção da transferência de embriões na espécie equina.

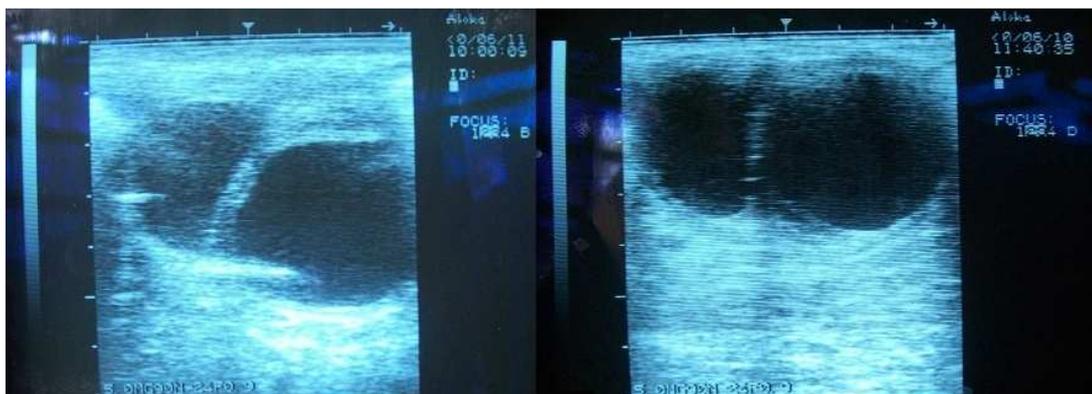
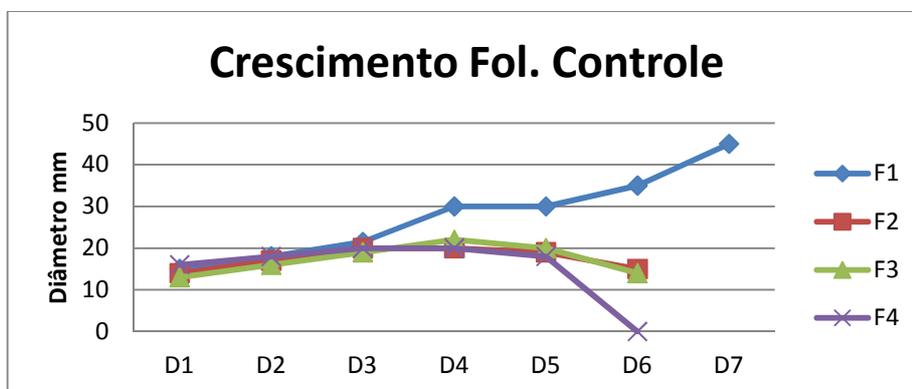
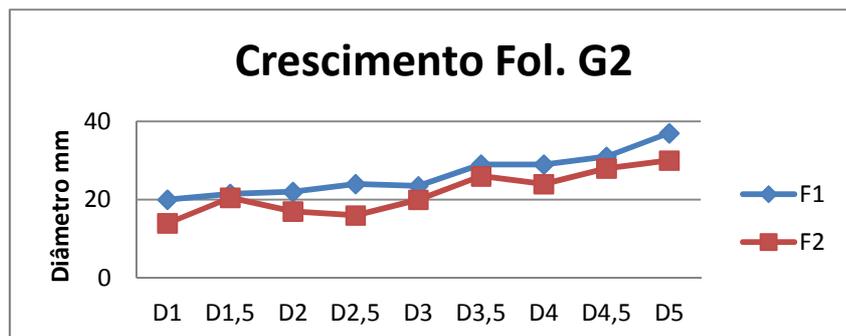


Figura 1 – Folículos após tratamento superovulatório com baixa dose de GnRH.



O D1 é referente ao dia da aplicação do agente luteolítico.

Gráfico1- Crescimento folicular de um ciclo do grupo controle G1



O D1 é referente ao dia da aplicação do agente luteolítico e D3 dia do início do tratamento superovulatório.

Gráfico2- Crescimento folicular de um ciclo no grupo experimental G2

A taxa de crescimento do folículo dominante no G2 (Gráfico 2), ocorre de forma semelhante a do G1 (Gráfico 1) seguindo a mesma média, 2,5 a 3,0 mm por dia, corroborando Ginther, (1990), demonstrando que o desenvolvimento do folículo dominante não é alterado pelo uso do GnRH.

Ao compararmos o Gráfico 1 com o Gráfico 2, é possível observar no G1 (Gráfico1), que após o maior folículo atingir a dominância (>25 mm), os demais folículos entram em atresia, diminuindo de diâmetro, o que ocorre entre o D3 e o D4, enquanto no Gráfico 2 correspondente ao G2, o folículo co-dominante mantém o crescimento, até os dois folículos chegarem a ovulação, mantendo-se na mesma média de crescimento do folículo dominante.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que a utilização do GnRH (deslorelina) em baixa dose tem efeito positivo sobre a taxa de ovulação aumentando o índice de éguas com dupla ovulação (86,66%) e da taxa de recuperação embrionária (80%) e na média de embriões por égua $1,066 \pm 0,497$, melhorando assim a eficiência da transferência de embriões em equino no agreste pernambucano, melhorando também os resultados econômicos do programa comercial de transferência de embriões.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

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

ALVARENGA, M.A; CARMO, M.T; LANDIM-ALVARENGA,F.C, Superovulation in mares: Limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde** ,v.24, p.88-91, 2008. BONIN, B. F. et al. Efeito do Tratamento com Extrato de Pituitária Equina na Resposta Ovariana e Eficiência Reprodutiva de Éguas Idosas em Programa de Transferência de Embriões. **Dissertação F.M.V.Z.** UNESP, Botucatu-SP. 2009.

BONIN, B. F. et al. Efeito do Tratamento com Extrato de Pituitária Equina na Resposta Ovariana e Eficiência Reprodutiva de Éguas Idosas em Programa de Transferência de Embriões. **Dissertação F.M.V.Z.** UNESP, Botucatu-SP, 2011.

CARMO, M.T, Disturbs on oocyte transport and maturation of mares superovulated with Equine Pituitary Extract. 156p, **PhD Thesis** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2007.

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

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em equinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUCAO ANIMAL**, 16, Goiânia. Anais, 2005.

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

DOUGLAS, RH, Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine, **Theriogenology**, v.11, p.33-46, 1979.

FARINASSO, A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas. 60 f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2004.

GINTHER, O. J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 311-320, 1990.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**; basic and applied aspects. 2. ed., Equiservices, 642 p.1993.

GINTHER, O.J. e 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**, 88, 119-126, 1990.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. (2.ed.) Cross Plains, WI, Equiservices, p 299-300, 499-545 e 642, 1992.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare. Equiservices, **Cross Plains**, Wisconsin, 378 pp. 1986.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 99, p. 105 – 111, 1993.

GREAVES, H. E.; KALARIOTES, V.; CLEAVER, B. D.; PORTER, M. B.; SHARP, D. C. Effects of ovarian input on GnRH and LH secretion immediately postovulation inpony mares. **Theriogenology**, v. 55, p. 1095-1106, 2001.

GUIMARÃES, J.D et al. Taxas de recuperação embrionária em programa comercial de transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Machador. *Acta Scientiae Veterinariae*: **SBTE**, UFRGS, Porto Alegre, V35. Supl.3, p.1220, 2007.

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

HARRISON, L.A., SQUIRES, E.L., NETT, T.M. & MCKINNON, A.O. Comparison of hCG, buserelin and luprostitol for induction of ovulation in cycling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 11, 163-166, 1991.

HUNT, C.; AGUILAR, J.; SPORLEDER, C.; LOSINNO, L.; The Effect of donor mare age on efficiency of a large scale embryo transfer programme. **Ann Meet Eur Soc Embryo Transfer**, 2005.

JACOB et al. **Theriogenology**, v. 57, p.545-0, 2002.

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

JOHNSON, A.L. Induction of ovulation in anestrous mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, n.5, p.983-986, 1986.

LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. **J. Anim. Sci.**, v.44, n.5, p.834-842, 1977.

LOPES, E.P. Desmistificando a transferência de embriões I. Top 2000 Mangalarga Machador. v.1, n.1, p.6, 2002a.

MACHADO, M.S. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório, utilizando-se extrato de pituitária equina e FSH equino purificado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.27, n.3, p.506, 2003.

MCCUE, P.M. Superovulation. In: SQUIRES, E.L. (Ed). **The veterinary clinics of north america – equine practice: diagnostic techniques and assisted reproductive technology**. Philadelphia: W. B. Saunders, p.1-11, 1996.

MCCUE, P.M., CARNEY, N.J., HUGHES, J.P., RIVIER, J., VALE, W. & LASLEY, B.L. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against na inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, 38, 823-831, 1992.

NAGAO, J.F.; GODOY, T.P.; NETO, JN; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Indução de ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de acetato de delorelina. In: .Anais da XX IV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE- (Porto de Galinhas,Pernambuco), (2010).

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**, 23, 497-500, 2003.

REILAS et al. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40 p. 383-91,2000.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSOA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A. Uso de progesterona de longa ação na preparação de éguas não ciclantes como receptoras de embrião. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Barra Bonita, **Acta Scientiae**, v.32, P.89, 2004.

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.151-164, 2002.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR., G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, n.5, p.661-670, 1986.

SQUIRES, EL ,MCCUE PM - Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, 2007.

TAVEIROS, A.W, OLIVEIRA M.A.L., LIMA. P.F. Estratégias de manejo para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas equinas da raça mangalarga machador. **Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária da UFRPE**. 2008

TAVEIROS,A.W; OLIVEIRA,M.A.L ; LIMA, P.F. Diferentes receptoras na transferência de embriões em equinos Mangalarga Machador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23,p.391-393, 1999.

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.21, n.3, 1984.

6. CAPÍTULO 02

**INDUÇÃO DE OVULAÇÕES DUPLAS UTILIZANDO BAIXA DOSE DE GNRH
(DESLORELINA) EM ÉGUAS, EM TEMPO FIXO PARA O INÍCIO DO
TRATAMENTO.**

**INDUÇÃO DE OVULAÇÕES DUPLAS UTILIZANDO BAIXA DOSE DE GNRH
(DESLORELINA) EM ÉGUAS, EM TEMPO FIXO PARA O INÍCIO DO
TRATAMENTO.**

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho induzir múltiplas ovulações em éguas utilizando baixas doses de GnRH (deslorelina) em tempo fixo e determinar seu impacto sobre a eficiência reprodutiva e resultados econômicos em um programa comercial de transferência de embriões, no agreste pernambucano. Foram utilizadas sete doadoras, sendo quatro da Raça Quarto de Milha e três da raça Mangalarga Machador, com idade entre oito e vinte anos. O grupo 1 (G1) iniciou-se com o monitoramento do ciclo estral, inseminação durante o estro e colheita de embriões no oitavo dia pós ovulação. O Grupo 2 (G2), teve início com a aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina e o monitoramento dos ovários através de ultrassom, duas vezes ao dia até a detecção do maior folículo com diâmetro de 23 a 25 mm e o segundo > 18mm, quando foi iniciado o tratamento, com 100 µg de acetato de deslorelina, com intervalo de 12h, até que o maior folículo atingisse a 34±1 mm de diâmetro, a indução de ovulação, através da aplicação de 1000 µg de acetato de deslorelina IM associado a 1000 UI de hCG IV. O Grupo 3 (G3) se inicia com a aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina após a colheita de embriões do G2 e 48 h após a aplicação do agente luteolítico foi iniciado o tratamento com 100 µg de acetato de deslorelina, com intervalo de 12h, até que o maior folículo atingisse 34±1 mm de diâmetro ou 6 dias de aplicação. O percentual de éguas com ovulações múltiplas no G1, G2 e do G3 de 14,28% (1/7), de 100,00% (7/7) e 0% (0/7) respectivamente (P<0,05). Foi observado um incremento no número de embriões recuperados sendo G1 três, G2 seis e no G3 zero (P<0,05), média de recuperação embrionária de 0,43 ± 0,53 no G1, de 0,86 ± 0,38 no G2 e 0 no G3 (P>0,05); Percentagem de recuperação embrionária de 43% G1, de 85,71% no G2 e 0% no G3 (P<0,05). Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que a administração de GnRH (deslorelina) em baixa dose em doadoras de embrião interferiu positivamente no crescimento do segundo folículo, aumentando a incidência de múltiplas ovulações, como a taxa de recuperação embrionária por ciclo. O tratamento quando iniciado precocemente, com folículos < 25 mm, 48h após a aplicação do agente luteolítico, não é eficiente para induzir ovulação dupla.

Palavras-chave: Múltiplas Ovulações, GnRH, éguas, folículo.

**DOUBLE OVULATION INDUCTION USING LOW DOSE OF GnRH
(DESLORELIN) IN MARES, FIXED IN TIME FOR THE START OF
TREATMENT.**

ABSTRACT

This study was aimed to induce multiples ovulations in mares using low doses of GnRH, at a fixed time and determine its impact on reproductive efficiency and economic results in a commercial program for embryo transfer, in northeastern Brazil. It was used seven donors, it was four from Quarter Horse Breed and three from Mangalarga Machador Breed, aged between 8 and 20 years. After being monitored and inseminated during estrus and performed the embryo collection constituting the G1, it was applied 7.5mg of dinoprost-tromethamine and included in group G2, level where they started the ultrasound examinations twice a day to detect the highest follicle with 23 to 25 mm and the second > 18 mm, level where starts the treatment, with 100 µg of deslorelin acetate, bid, until the largest follicle reaches 33 to 35 mm in diameter, the ovulation induction was realized with 1000 µg of deslorelin acetate associated IM to 1000 UI of hCG IV, after G2 embryo collection it was reapplied 7.5 mg dinoprost-tromethamine and after 48h the treatment began with 100 µg of deslorelin acetate, bid, until the largest follicle reaches 34±1 mm diameter or 6 days of application. The mares percentage with multiple ovulations in G1, G2 and G3 were 14.28% (1/7), 100.00% (7/7) and 0% (0/7) respectively (P<0.005), with an embryo/mares average of 0.43 ± 0.53 in G1, 0.86 ± 0.38 in G2 and 0 in G3 (P<0.05); with an embryo recovery rate of 43% G1, 85.71% in G2 and 0 in G3 (p<0.05). It can be concluded from the obtained results in this experiment that the administration of low-dose GnRH in embryo donors interfered positively in the growth of the dominant follicle and the second follicle, increasing the incidence of multiple ovulations, increasing the embryo recovery rate per cycle and, improving the reproductive efficiency of treated donors. Moreover it was observed that when the treatment is started early, with follicle < 25 mm, presents results below of the expected, not going efficient to induce double ovulation.

KEY-WORDS: multiples ovulations, GnRH, Mares, Second Follicle.

INTRODUÇÃO

A criação de cavalos destinados ao segmento esportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas (VIANNA, 2000). Devido à importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer, e não mais apenas no transporte ou tração animal, sendo incontestável o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008).

As éguas obtêm seu maior valor econômico quando sua progênie se destaca, isto ocorre quando já se tem passado sua vida média reprodutiva, coincidindo com declínio dos índices de fertilidade, a partir de quinze anos de idade. Essas reprodutoras com idade avançada representam de 10 a 25% das éguas que estão em programa de reprodução. Alguns índices reprodutivos diferem entre éguas velhas e jovens quanto a prenhez/ciclo (32 e 65%), nascimentos (54 e 82%) e perda embrionária (29 e 7%). A morte embrionária pode alcançar 62% em éguas velhas, com mais de 15 anos e chegar a somente 11% naquelas com idade entre 5 e 7 anos. Esta redução da eficiência reprodutiva pode estar relacionada a disfunções neuro- endócrinas, perda gestacional causada por doenças infecciosas ou uma combinação delas, para permitir que o mérito genético seja percebido precocemente, se faz necessário um maior número de produtos em menor tempo (BALL,2000).

A transferência de embriões (TE) vem como uma ferramenta para acelerar esse processo, porém, apresenta limitações, principalmente quanto a superovulação, devido a particularidades anatômicas e a baixa sensibilidade a hormônios comumente usados em outra espécies, sendo necessário 2 a 3 ciclos para obter uma gestação

Ginther & Bergfelt,(1990) vislumbrou a possibilidade de utilizar o GnRH para indução de múltiplas ovulações em éguas em anestro, porém sem uso em animais cíclicos, estudos recentes de Nagao et al, (2010), relataram a indução de múltiplas ovulações com baixa dose de análogo de GnRH, obtendo um percentual de éguas com dupla ovulação por ciclo de 85%, com uma porcentagem de embriões recuperados por ciclo (55% x 90%), para controle e tratados, respectivamente.

Portanto objetiva-se com este trabalho induzir múltiplas ovulações em éguas utilizando baixas doses de GnRH em tempo fixo para o início do tratamento, e determinar seu impacto sobre a eficiência reprodutiva e resultados econômicos em um programa comercial de transferência de embriões, no agreste de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS:

O trabalho foi realizado durante a estação reprodutiva 2010 e 2011, durante os meses de setembro a fevereiro dos anos citados, na Central de Reprodução Ilana Reprodução Equina, localizada no município de Pombos, a uma latitude 08°08'29" sul e a uma longitude 35°23'45" oeste, a uma altitude de 208 metros, situada na região agreste do estado de Pernambuco.

Foram utilizadas sete éguas doadoras de embriões, sendo quatro da raça Quarto de Milha e três da raça Mangalarga Machador, com idade entre oito e vinte anos e pesando 450 a 550 Kg, devidamente selecionadas através de exame clínico ginecológico minucioso de todos os órgãos do aparelho reprodutivo da fêmea. Todas as éguas utilizadas estavam em plena atividade reprodutiva. Todas as éguas doadoras foram mantidas em baias com feno de Tifton, água e sal mineral *ad libitum* e 4 kg de ração comercial peletizada própria para equinos, dividida em dois fornecimentos ao dia.

O Grupo 1 G1 iniciou-se com o monitoramento e inseminação das doadoras, durante o estro, sendo submetidas ao procedimento de colheita de embrião no oitavo dia pós-ovulação. Nesse mesmo dia, ou em dias seguintes a depender da sincronização com as receptoras, as mesmas receberam, por via intramuscular, 7,5 mg de dinoprost-trometamina como agente luteolítico e foram incluídas no grupo experimental G2, onde foi iniciado o tratamento para indução de ovulações múltiplas a base de análogo de GnRH (acetato de deslorelina) em baixa dose.

No Grupo G2, os exames de ultrassom foram realizados duas vezes ao dia, do dia da aplicação do agente luteolítico, até detecção do maior folículo com diâmetro de 23 a 25 mm e o segundo \geq a 18mm, momento que se iniciou o tratamento superovulatório, com 100 μ g de acetato de deslorelina, com intervalo de 12 h, até que o maior folículo chegasse de 33 a 35 mm de diâmetro, quando foi realizado a indução da ovulação com 1000 μ g de acetato de deslorelina IM associado a 1000 UI de hCG IV (Vetercor®, Laboratórios Hertape Calier, Brasil).

O Grupo 3 (G3) teve início após a coleta de embrião do G2 e a aplicação, de 7,5 mg de dinoprost-trometamina, via intramuscular, como agente luteolítico e 48h depois foi realizada a primeira aplicação do análogo de GnRH, na dose de 100 μ g, por via intramuscular, desde que não houvesse um folículo dominante (>25 mm). O tratamento persistiu até que o maior folículo atingisse 33 a 35 mm ou 6 dias consecutivos (12 aplicações).

Três ciclos consecutivos foram utilizados, sendo no primeiro o grupo controle (G1), no segundo o GnRH com controle da dinâmica folicular (G2) e o terceiro o 48h (G3), sem controle da dinâmica folicular. Dessa forma, cada animal utilizado foi o seu próprio controle.

Nos três ciclos estudados, desde o dia zero, ou seja, a aplicação do agente luteolítico, até a ovulação, as éguas doadoras tiveram a atividade ovariana e condição uterina monitoradas diariamente, a cada 12h, através de ultrassonografia transretal com auxílio de um aparelho de ultrassom, Aloka, 500 Japan, equipado com um transdutor linear de 5 MHz. Os diâmetros dos maiores folículos foram determinados por meio da média aritmética das duas maiores distâncias transversais do antro folicular em uma única imagem congelada no monitor do aparelho de ultra-sonografia de acordo com Ginther (1995) em todos os grupos.

O GnRH (Acetato de Deslorelina) utilizado no trabalho foi produzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp-Botucatu, SP, Brasil.

A análise estatística seguiu a verificação da tendência de normalidade, verificando se a população seguiu uma distribuição Gaussiana, através do método de Shapiro-Wilks. O qual foi realizado no programa computacional Statistica 6.0 (Copyright[©] StatSoft, Inc., 2001). Dependendo da tendência normalidade os resultados obtidos seguiram para testes paramétricos ou não paramétricos. Os testes estatísticos para verificação de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais, foram realizados no programa computacional InStat (GraphPad Software, Inc., 2000). Os dados considerados normais foi utilizado o teste T-independente ou teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Para os dados que não seguiram uma tendência normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn.. O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de éguas com ovulações múltiplas no G1 foi de 14,28% (1/7), G2 foi de 100,00% (7/7) e no G3 foi de 0% (0/7), ($P < 0,005$). A média de ovulações no G1 foi de $1,14 \pm 0,38$, de $2,00 \pm 0,0$ no G2 e G3 $0,57 \pm 0,53$ ($P < 0,005$). Em um ciclo do G3 foi observado falha da ovulação, onde uma égua chegou a folículos de 50mm sem ovular por 10 dias. Nos ciclos com mais de uma ovulação as mesmas aconteceram com intervalo de tempo médio de 24 horas.

O tratamento com GnRH(G2) resultou em um maior número de embriões com seis no G2, três para o grupo G1 e zero para o G3, com média de embriões por ciclo de $0,43 \pm 0,53$ no G1, no G2 $0,86 \pm 0,38$ e no G3 0,0 ($P < 0,05$). O percentual de embrião por ovulação foi de 37,50% no G1, 42,85% G2 e 0% no G3, ($P < 0,05$), tendo um percentual de lavados positivos de 43% no G1, G2 foi de 85,71% e no G3 0% ($P < 0,005$).

Tabela 1 – Número de ovulações e produção de embrião do grupo controle (G1), grupo dupla (G2) e grupo 48h (G3).

Variáveis	G1	G2	G3
Número de animais	7	7	7
Número Ovulações	8 ^a	14 ^{bc}	4 ^b
P = 0,0001			
Ovulações por Égua	$1,14 \pm 0,38$ ^a	$2,00 \pm 0,0$ ^b	$0,57 \pm 0,53$ ^c
P = 0,0001			
Éguas com ≥ 2 Ovulações (%)	14,28 (1/7) ^a	100,00 ^b (7/7)	0 ^c (0/7)
P = 0,0001			
Número de Embriões	3 ^a	6 ^b	0 ^c
P = 0,0007			
Embriões por Égua	$0,43 \pm 0,53$	$0,86 \pm 0,38$	0,0
P = 0,0464			
Embriões por Ovulação (%)	37,50 ^a	42,85 ^b	0 ^c
P = 0,0002			
Embriões por Lavado (%)	43 ^a	85,71 ^b	0 ^c
P = 0,0001			

Letras iguais, não há diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Letras diferentes há diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Neste experimento o tratamento com análogo de GnRH G2 foi capaz de estimular com eficiência a indução de ovulações múltiplas, tendo em vista que o percentual de éguas com duas ovulações foi de 100% (7/7) dos ciclos tratados, enquanto o grupo controle G1 apresentou apenas 14,28% (1/7), o G3 0%, resultados do G2 superaram os encontrados em tratamento com baixa dose de EPE como os reportados por Bonin et al. (2011) com 65% (13/20), Douglas (1979) 75%, Farinasso (2004) 76,9% e Carmo (2007) 84% e ainda valores menores como os 30,8% de Rocha Filho (2004), e ainda superiores aos 85% reportados por Nagao et al (2010) com GnRH.

Já o baixo resultado obtido no G3 acredito que se deve a precocidade do início do tratamento, pois as éguas no início do tratamento apresentavam folículos de 15 a 20 mm e com população folicular superior a três folículos, concordando com os dados encontrados por Ginther e Bergfelt (1990), que obtiveram baixo resultado na indução de múltiplas ovulações com GnRH em éguas no período anovulatório, quando os folículos se encontravam < 25 mm. É possível que nesta fase de desenvolvimento folicular os folículos apresentem um menor número de receptores para FSH, dificultando a resposta desta população folicular, contudo o protocolo utilizado no G3 interferiu no desenvolvimento folicular, diminuindo o seu crescimento.

Em um dos ciclos do G3 foi observado uma falha da ovulação, onde um indivíduo manteve-se com um folículo de 50 mm por 10 dias sem ovular, como citado por Dippert et al. (1994); Lapin e Ginther (1997) para éguas submetidas a tratamento superovulatório.

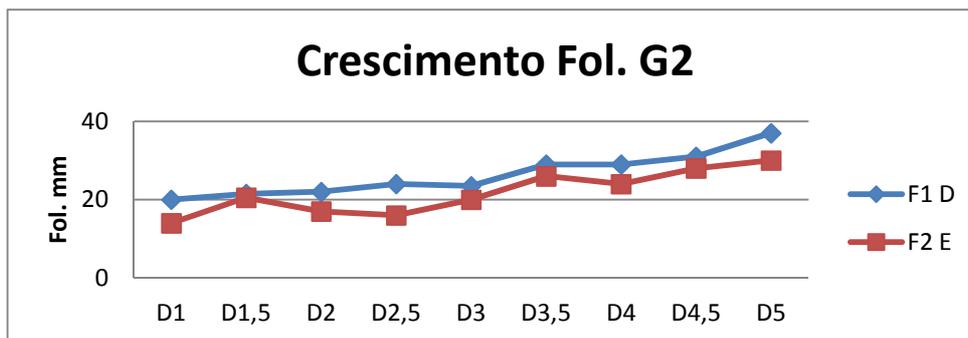
A média de embrião por ciclo foi de $0,43 \pm 0,53$ no G1, $0,86 \pm 0,38$ e de 0 no G3. O grupo G2 obteve uma média muito próxima ao obtido no experimento desenvolvido por Carmo et al. (2003) com EPE 25 mg Bid, média 1,1; Bonin et al (2009) com EPE 7,0 mg Bid.

Ao analisarmos a não produção de embriões no G3 é notório que trata-se de uma falha na ovulação dos indivíduos tratados. Durante o tratamento foi possível perceber que há um crescimento inicial de três ou quatro folículos, fato até animador, porém no decorrer do 3º dia estes folículos param de crescer ou regridem, o que nos leva a pensar, que pela égua ser naturalmente um indivíduo monovulatório, podendo ovular em alguns casos dois folículos, sua produção de FSH não seria suficiente para levar o crescimento de três, quatro ou cinco folículos, já que neste tratamento utilizamos apenas GnRH, hormônio responsável pela estimulação da liberação de FSH e LH endógeno.

Analisando o número de embriões recuperados por ovulação, obtivemos 37,50% no G1, 42,85% no G2 e 0% no G3, ($P < 0,05$). Quando comparamos os resultados encontrados no G2 com outros trabalhos utilizando EPE observamos que são abaixo dos descritos por Woods & Ginther (1984) 60% grupo tratado e 70% grupo controle, mostrando-se próximo aos dados encontrados por Alvarenga (2001); Scoggin et al. (2002); Carmo et al. (2003); Machado et al. (2003), onde obtiveram 49%, 43,2%, 30,2% e 26%, respectivamente, tendo um resultado muito abaixo do esperado no G3 0% mostrando claramente a interferência do tratamento com GnRH, quando iniciado precocemente.

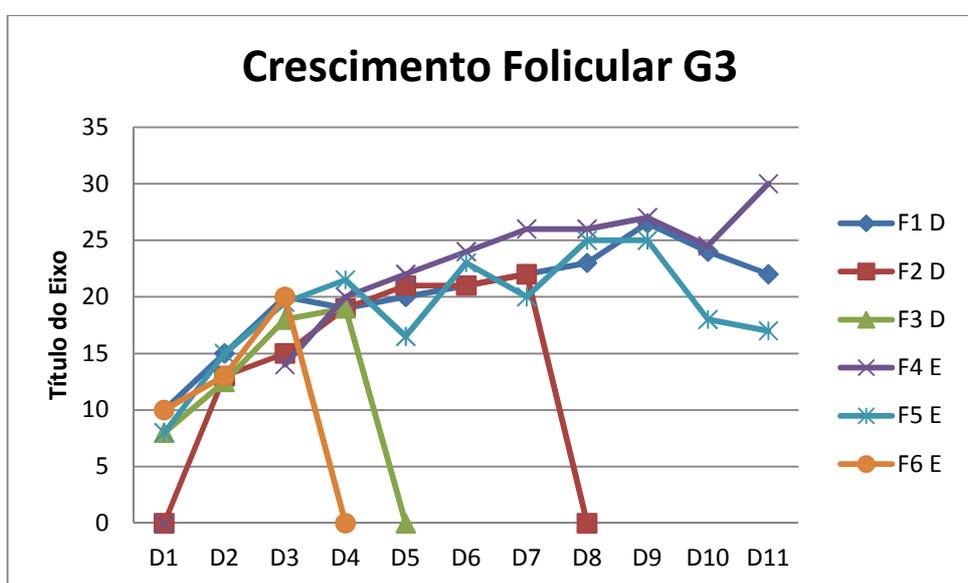
Na tabela 1 é possível observar que houve um incremento no número de ovulações com o uso do GnRH em baixas doses no G2 com 14 ovulações para oito ovulações no G1, no G3 apenas quatro ovulações, com uma média de ovulações por égua de $1,14 \pm 0,38$ no G1, de $2,00 \pm 0,0$ no G2 e de apenas $0,57 \pm 0,53$ no G3, ($P < 0,05$) concordando com Ginther e Bergfelt, (1990) e Nagao et al. (2010) que obtiveram um aumento no número de ovulações múltiplas nas éguas submetidas ao tratamento com análogo de GnRH. A queda no número de ovulações do G3 encontra respaldo também no trabalho do Ginther e Bergfelt (1990) que demonstra baixo resultado na indução de múltiplas quando o tratamento foi iniciado com folículos < 25 mm.

O aumento no número de ovulações resultou em um incremento no número de embriões recuperados sendo no G1 apenas 3, enquanto no G2 foi de 6 e no G3 foi 0 embriões, com uma média de recuperação embrionária de $0,43 \pm 0,53$ no G1, de $0,86 \pm 0,38$ no G2 e de 0 no G3, ($P < 0,05$), concordando com Ginther (1992) e Carmo et al. (2003), que falam que o aumento na taxa de ovulação aumenta o número de embriões recuperados. A taxa de recuperação embrionária por lavado foi de 43 % no G1, de 85,71% no G2 e de 0% no G3, os dados no grupo G2 superam os dados reportados por Taveiros et al. (1999), com 53,2% ,sem tratamento superovulatório, dos 53% de Reilas et al.(2000), 63,4% de Jacob et al. (2002) e aos 72,7% de Guimaraes et al (2007) com tratamentos com EPE em baixa dose, sendo próximo dos 86,3%, reportados por Taveiros et al (2008) sem tratamento superovulatório.



O D1 é referente ao dia da aplicação do agente luteolítico e D3 dia do início do tratamento superovulatório.

Gráfico1- Crescimento folicular de ovulação dupla no G2



O D1 é referente ao dia da aplicação do agente luteolítico e D2 dia do início do tratamento superovulatório.

Gráfico 2 – Crescimento Folicular de égua no G3.

A taxa de crescimento folicular representada no Gráfico 1 referente ao G2, ocorre da mesma forma que no grupo controle seguindo o mesmo índice de crescimento médio de 2,5 a 3,0mm como relatado por Ginther, (1986), demonstrando que o desenvolvimento folicular não é alterado pelo uso do GnRH.

No Gráfico 2 observar-se o desenvolvimento folicular da égua com início do tratamento 48h após a aplicação do agente luteolítico, sendo possível observar um crescimento inicial de quatro folículos crescendo numa média de 0,5mm por dia, bem abaixo dos 2,5 a 3 mm relatados por Ginther (1986), além de demonstrar que alguns folículos crescem e regridem, mostrando uma total irregularidade no crescimento dos folículos do G3.

O início do tratamento após a aplicação do agente luteolítico no G2 teve uma média de $72 \pm 37,94$ horas, tempo superior as 48h do grupo G3, em virtude da grande variação entre os indivíduos, que apresentaram maior desenvolvimento folicular 12h com os que apresentaram menor desenvolvimento 120h. Este fato deve-se a variabilidade da aplicação do agente luteolítico em relação ao dia do ciclo estral, e também por algumas éguas apresentarem ovulações de anestro, o que torna indispensável o monitoramento folicular, para o início do tratamento superovulatório.

Pode-se diminuir esta variabilidade, instituindo um protocolo de duas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$, com intervalo de 16 dias e iniciando a superovulação três a quatro dias depois da segunda aplicação do agente luteolítico.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que a administração de GnRH (deslorelinina) em baixa dose em éguas doadoras de embriões, interferiu positivamente no crescimento do folículo dominante e do co-dominante, aumentando a incidência de ovulações múltiplas, incrementando a taxa de recuperação embrionária por ciclo e melhorando a eficiência reprodutiva das éguas doadoras. O tratamento quando iniciado precocemente, com folículos < 25 mm, não é eficiente para induzir dupla ovulação, sendo necessário o monitoramento do ciclo estral para iniciar o tratamento superovulatório.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

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

ARRUDA R.P., VISINTIN J.A., FLEURY J.J., GARCIA A.R., MADUREIRAE.H., CELEGHINI E.C.C. & NEVES NETO J.R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 38:233-239, 2001.

BALL BA. Reduce reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. In: **Recent Advance in Equine Theriogenology**; Ithaca. Ithaca: International Veterinary Information Service; 2000.

BONIN, B. F. et al. Efeito do Tratamento com Extrato de Pituitária Equina na Resposta Ovariana e Eficiência Reprodutiva de Éguas Idosas em Programa de Transferência de Embriões. **Dissertação F.M.V.Z.** UNESP, Botucatu-SP, 2009.

CARMO, M.T, Disturbs on oocyte transport and maturation of mares superovulated with Equine Pituitary Extract. 156p, **PhD Thesis** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2007.

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

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em equinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUCAO ANIMAL**, 16, 2005, Goiânia. Anais, 2005.

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

DOUGLAS, RH, Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine, **Theriogenology**, v.11, p.33-46, 1979.

FARINASSO, A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária eqüina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas. 60 f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2004.

GINTHER, O. J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 311-320, 1990.

GINTHER, O.J. e 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**, 88, 119-126, 1990.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. (2.ed.) Cross Plains, WI, Equiservices, p 299-300, 499-545 e 642, 1992.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare. Equiservices, **Cross Plains**, Wisconsin, 378 pp,1986.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **J. Reprod. Fertil.**, London, v. 99, p. 105 – 111, 1993.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses. **Book 2. Cross Plains, WI**: Equiservices Publishing, 394p, 1995.

GUIMARÃES, J.D et al. Taxas de recuperação embrionária em programa comercial de transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Machador. **Acta Scientiae Veterinariae: SBTE, UFRGS, Porto Alegre**, V35. Supl.3., p.1220, 2007.

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**, 68, 690-699, 1990.

HARRISON, L.A., SQUIRES, E.L., NETT, T.M. & MCKINNON, A.O. Comparison of hCG, buserelin and luproliol for induction of ovulation in cycling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 11, 163-166, 1991.

HINRICHS K. & CHOI Y.H. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clin. Tech. Equine Pract.** 4:210-218, 2005.

HUNT, C; AGUILAR, J.; SPORLEDER, C.; LOSINNO, L.; The Effect of donor mare age on efficiency of a large scale embryo transfer programme. **Ann Meet Eur Soc Embryo Transfer**, 2005.

JACOB et al. **Theriogenology**, v. 57, p.545-0, 2002.

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

JOHNSON, A.L. Induction of ovulation in anestrous mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, n.5, p.983-986, 1986.

KUMAR D., JHAMB D., KUMAR N. & BADIAL D. Foals Born through fresh embryo transfer in India. **Proceedings 10th International Congress of World Equine Veterinary Association**, Moscow, Russia. p.567-568, 2008.

LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. **J. Anim.**

MACHADO, M.S. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório, utilizando-se extrato de pituitária eqüina e FSH eqüino purificado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.27, n.3, p.506, 2003.

MARIZ T.M.A., ANJOS A.G., FLOR J.M., FLOR L.M.A.M., LIMA C.B., GIVISIEZ Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, n.5, p.661-670, 1986.

MCCUE, P.M. Superovulation. In: SQUIRES, E.L. (Ed). **The veterinary clinics of north america – equine practice: diagnostic techniques and assisted reproductive technology**. Philadelphia: W. B. Saunders, p.1-11, 1996.

MCCUE, P.M., CARNEY, N.J., HUGHES, J.P., RIVIER, J., VALE, W. & LASLEY, B.L. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against the inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, 38, 823-831, 1992.

NAGAO, J.F.; GODOY, T.P.; NETO, JN; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Indução de ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de acetato de delorelina. **In: Anais da XX IV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões –SBTE- Acta Scientiae Veterinariae** (Porto de Galinhas,Pernambuco), (2010).

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**, 23, 497-500, 2003.

REILAS et al. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40 p. 383-91,2000.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSOA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A. Uso de progesterona de longa ação na preparação de éguas não ciclantes como receptoras de embrião. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Barra Bonita, **Acta Scientiae**, v.32, P.89, 2004.

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.151-164, 2002.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR., G.E. P.E.N. & AZEVEDO P.S. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasilica** 2:39-43, 2008.

SQUIRES, EL ,MCCUE PM - **Superovulation in mares**. Animal reproduction science, Elsevier, 2007.

TAVEIROS,A.W; OLIVEIRA,M.A.L ; LIMA, P.F. Diferentes receptoras na transferência de embriões em equinos Mangalarga Machador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23,p.391-393, 1999.

TAVEIROS, A.W, OLIVEIRA M.A.L., LIMA. P.F. Estratégias de manejo para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas equinas da raça mangalarga machador. **Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária da UFRPE**. 2008

VIANNA B.C. Inseminação artificial em éguas com sêmen congelado, “in natura” e diluído. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Paraná, PR, 82p, 2000.

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v.21, n.3, 1984.

A Derradeira:

AS FLÔ DE PUXINANÃ

Três muié, ou três irmã,
Três cachorra da mulesta,
Eu ví, num día de festa,
No lugá Puxinanã.

A mais véia, amais ribusta,
Era mêrmo uma tentação!
Mimosa flô dos sertão,
Qui o pôvo chamava Ogusta.

A sigunda, a Guilémina,
Tinha uns ói qui ô! Mardição!
Matava quarqué cristão
Os oiá déssa minina!

Os ói delá, parecia
Duas istrêla tremendo,
Se apagando e se acendendo
Im noite de ventania!

A tercêira, era Maroca.
Cum um côipo muito má feito.
Mas porém, tinha, nos peito
Dois cuscús de mandioca!

Dois cuscús, qui, prú capricho,
Quando éla passou prú eu,
Minhas venta se acendeu,
Cum o chêro vindo dos bichos!

Eu inté, mi atrapaiáva,
Sem sabê das três irmã
Qui eu vi im puxinanã,
Que éra a qui me agradáva...

Isquiendo a minha cruz
Prá saí dêsse imbaráço,
Desejei, morrê nos braços,
Da Dona dos dois cuscús!!!