

**DEISE KELI FARIAS**

**PROTOCOLO SUPEROVULATÓRIO COM EXTRATO DE  
PITUITÁRIA EQUINA (EPE) EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA  
E QUARTO DE MILHA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Fabrício Desconsi Mozzaquatro

**Lages – SC**

**2013**

**DEISE KELI FARIAS**

**PROTOCOLO SUPEROVULATÓRIO COM EXTRATO DE  
PITUITÁRIA EQUINA (EPE) EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOLA  
E QUARTO DE MILHA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora**

**Orientador (a):**

---

Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro  
Universidade do Estado de Santa Catarina

**Membros:**

---

Prof. Dr. Alceu Mezzalira  
Universidade do Estado de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Guenther Kluge  
Universidade do Estado de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira  
Universidade de Brasília

**Lages, 25 de outubro de 2013**

## RESUMO

A indústria equina tem crescido consideravelmente no Brasil nos últimos anos. Neste aspecto, a raça Crioula tem se destacado como uma das maiores criações em número e qualidade genética de animais. Devido a isso existe uma maior procura por biotecnologias aplicadas a reprodução de equinos. Os protocolos convencionais superovulatórios, com altas doses hormonais, tem se mostrado menos eficientes quando se avalia a relação entre o número de ovulações e a recuperação embrionária. A redução da dose de extrato de pituitária equina (EPE) pode ser uma alternativa para garantir que um ou mais embriões possam ser recuperados em cada procedimento de coleta. Existem poucas informações sobre a fisiologia reprodutiva da égua Crioula, e praticamente não há relatos de como esta categoria de animais responde a técnica de superovulação e transferência de embriões. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo comparar a resposta superovulatória de éguas doadoras de embriões das raças Quarto de Milha (QM) e da raça Crioula utilizando um protocolo com baixa dose de extrato de pituitária equina (EPE). Para realização deste experimento foram utilizadas 8 éguas da raça QM e 6 éguas da raça Crioula, em perfeitas condições sanitárias e reprodutivas, nas estações de 2011/2012 e 2012/2013. Os animais foram submetidos a um controle folicular diário com o auxílio do ultrassom, sendo acompanhados 3 ciclos estrais consecutivos em que todas as éguas passavam por todos os tratamentos. Todas as éguas doadoras receberam uma dose de PGF2 $\alpha$  antes de iniciarem os protocolos. Grupo Controle – monitoramento do crescimento folicular até o momento da ovulação; Grupo EPE – monitoramento do crescimento folicular, e a partir da presença de folículos com cerca de 20 mm de diâmetro foi realizada a administração de 7 mg de EPE, duas vezes ao dia com intervalo de 12hs até o momento da indução da ovulação. Quando a maioria dos folículos atingiram um diâmetro igual ou superior a 35 mm foi induzida a ovulação através da administração de 2500UI de hCG; Grupo Pós-EPE – mesmo procedimento do grupo controle. As doadoras foram inseminadas a cada 48h até o momento da ovulação. No oitavo dia pós-ovulação foi realizada a coleta de embriões. Os dados foram analisados utilizando o PROC GLM do pacote estatístico SAS. As variáveis foram submetidas ao teste de Tukey e as médias dos quadrados mínimos ajustados para comparação múltipla utilizando o teste de Tukey-Kramer, com nível de significância de 5%. Os valores estão sendo apresentados como médias  $\pm$  SD. Um dos

parâmetros avaliados foi a taxa de crescimento folicular nas diferentes raças trabalhadas, apresentando uma média de desenvolvimento de 10,1 e 7,7 dias para as Crioulas e QM, respectivamente ( $p < 0,01$ ). Houve diferença entre as raças ( $p = 0,005$ ) no número de dias em tratamento com EPE com média de 6,6 e 4,7 dias para a raça Crioula e QM. Nas éguas tratadas com EPE, houve um incremento no número de ovulações ( $p < 0,01$ ), com média de  $2,00 \pm 0,53$  e  $3,33 \pm 2,06$  para éguas QM e Crioulas, respectivamente, quando comparados ao grupo controle e pós-EPE (QM – controle  $1,12 \pm 0,35$ ; pós-EPE  $1,42 \pm 0,53$ ; Crioula – controle e pós-EPE  $1,16 \pm 0,40$ ). A taxa de recuperação embrionária por ovulação nas éguas tratadas com EPE foi de 75% (27/36) contra 56,25% (9/16) do grupo controle ( $n = 14$ ) e 88,23% (15/17) no grupo pós EPE ( $n = 13$ ). O tratamento com EPE resultou na recuperação de  $1,1 \pm 0,8$  embrião para as éguas QM e  $3,0 \pm 2,0$  embriões para as éguas Crioulas, enquanto o grupo controle  $0,5 \pm 0,5$  e  $0,8 \pm 0,4$  (QM e Crioula, respectivamente). O tratamento com EPE na dose de 7 mg b.i.d mostrou-se efetivo, aumentando a incidência de ovulações múltiplas em éguas e foi capaz de elevar o número de embriões recuperados por lavado comparado ao grupo controle. As éguas Crioulas apresentaram melhor resposta superovulatória e taxa de recuperação embrionária comparado com as éguas da raça Quarto de Milha.

**Palavras-chave:** Equinos. Embrião. Superovulação. Transferência de embriões.

## ABSTRACT

The equine industry has grown considerably in recent years in Brazil. In this aspect, the Crioula breed has emerged as one of the greatest creations in number and genetic quality of animals. Because of this, there is a greater demand for biotechnology for breeding horses. The conventional superovulatory protocols with high hormonal doses, has shown less efficient when evaluating the relation between the number of ovulations and embryo recovery rates. Dose reduction of equine pituitary extract (EPE) could be an alternative to ensure that one or more embryos can be recovered at each collection procedure. There is few information about reproductive physiology of the Crioula mare, and practically there is no data of how that category of animal responds to superovulation and embryo transfer. Thus, this study aimed to compare the superovulatory response of embryos donor mares of Quarter Horse (QH) and Crioula breed using a protocol with low dose of equine pituitary extract (EPE). Eight QH mares and 6 Crioula mares were used in the 2011/2012 and 2012/2013 seasons. These mares were in perfect health and reproductive conditions. The mare follicular control was performed daily with the aid of ultrasound. Were monitored 3 consecutive estrous cycles in each mare, being where all mares have passed for all the treatments. Every donor mare received a dose of PGF2a before beginning each protocol. Control Group - monitoring of follicle growth up to the time of ovulation; EPE group - monitoring of follicular growth. When the follicles reached 20 mm in diameter was administrated 7 mg EPE twice daily with an interval of 12h until the moment of ovulation induction. When most of the follicles achieved a diameter 35 mm, the ovulation was induced by administration of 2500UI hCG; Post EPE Group - same procedure as the control group. Donors were inseminated every 48 hours until the time of ovulation. On the eighth day post-ovulation embryo collection was performed. Data were analyzed using PROC GLM of the SAS statistical package. The variables were submitted by the Tukey test and means of least squares adjusted for multiple comparisons using the Tukey-Kramer test, with significance level of 5%. Values are presented as mean  $\pm$  SD. The rate of follicular growth in different breeds, showing a mean of 10.1 and 7.7 days for Crioulas and QH mares, respectively ( $p < 0.01$ ). Difference was observed between breeds ( $p = 0.005$ ) in the number of days on treatment with EPE with mean 6.6 and 4.7 days for the Crioula and QH breed. In the mares treated with EPE, there was an increase in the number of

ovulations ( $p < 0.01$ ) with a mean of  $2.00 \pm 0.53$  and  $3.33 \pm 2.06$  for Crioulas and QH mares respectively, when compared to the control and post-EPE groups (QH - control  $1.12 \pm 0.35$ , post-EPE  $1.42 \pm 0.53$ ; Crioula - control and post-EPE  $1.16 \pm 0.40$ ). The embryo recovery rate per ovulation in mares treated with EPE was 75% (27/36) versus 56.25% (9/16) in the control group ( $n = 14$ ) and 88.23% (15/17) in post EPE ( $n = 13$ ) group. Treatment with EPE resulted in the recovery of  $1.1 \pm 0.8$  embryo for QH mares and  $3.0 \pm 2.0$  embryos for the Crioula mares, while the control group  $0.5 \pm 0.5$  and  $0.8 \pm 0.4$  (QH and Crioula, respectively). The therapy with EPE in the dose of 7 mg bid proved effective, increasing the incidence of multiple ovulations in mares and was able to increase the number of embryos recovered by washed compared to the control group. The Crioula mares showed better superovulatory response and embryo recovery rate compared with mares of Quarter Horse.

**Keywords:** Equine. Embryo. Superovulation. Embryo transfer

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do protocolo do grupo controle .....	27
Figura 2 – Esquema do protocolo do grupo EPE .....	28
Figura 3 – Esquema do protocolo do grupo pós- EPE.....	28
Tabela 1 – Período de crescimento folicular a partir do momento da aplicação do luteolítico até a ovulação no grupo controle, EPE e pós –EPE na raça Quarto de Milha e Crioula.....	31
Tabela 2 – Duração tratamento superovulatório (dias) no Grupo EPE das raças Crioula e Quarto de Milha.....	32
Tabela 3 – Número de ovulações no grupo controle, EPE e pós-EPE na raça Crioula, Quarto de Milha e dados agrupados(Quarto de Milha + Crioula).....	32
Tabela 4 – Taxa de recuperação embrionária no grupo controle, EPE e pós-EPE com dados agrupados (Quarto de Milha + Crioula).....	33
Tabela 5 – Número de embriões recuperados no grupo controle, EPE e pós-EPE raça Quarto de Milha e Crioula.....	34
Figura 3 – Embriões recuperados de égua Crioula submetida ao tratamento com EPE.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCCC – Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos  
b.i.d – Duas vezes ao dia  
BPPr – Proteases de ligação proteica  
E<sub>2</sub> – Estradiol  
eFSH – Hormônio folículo estimulante equino  
EPE – Extrato de pituitária equina  
EUA – Estados Unidos da América  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
FSH-p – Hormônio folículo estimulante suíno  
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas  
hCG – Gonadotrofina coriônica humana  
IA – Inseminação artificial  
IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões  
IGF – Fator de crescimento ligado à insulina  
IGFBP – Proteína ligadora do fator de crescimento ligado a insulina  
IM – Intramuscular  
LH – Hormônio luteinizante  
PGF<sub>2</sub> $\alpha$  – Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$   
QM – Quarto de milha  
TE – Transferência de embriões



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
2.1	FOTOPERÍODO.....	12
2.2	ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL .....	12
2.3	DIVERGÊNCIA FOLICULAR.....	13
2.4	OVULAÇÃO.....	14
2.5	SUPEROVULAÇÃO.....	16
2.6	EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE).....	17
2.7	DOSES HORMONAIS.....	19
2.8	INÍCIO DA SUPEROVULAÇÃO.....	20
2.9	RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	21
2.10	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO NO BRASIL.....	22
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO ÚNICO: PROTOCOLO SUPEROVULATÓRIO COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE) EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOLA E QUARTO DE MILHA (QM).....</b>	<b>24</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	24
3.2	METODOLOGIA.....	25
3.2.1	Local .....	25
3.2.2	Animais.....	26
3.2.3	Extrato de pituitária equina (EPE).....	26
3.2.4	Delineamento Experimental .....	26
3.2.5	Monitoramento do Crescimento Folicular.....	28
3.2.6	Inseminação Artificial.....	29
3.2.7	Coleta de Embriões .....	29
3.2.8	Busca e Seleção dos Embriões .....	30
3.2.9	Análise Estatística .....	30
3.3	RESULTADOS .....	30
3.3.1	Crescimento Folicular .....	30
3.3.2	Dose de EPE vs Dias em tratamento .....	31
3.3.3	Número de Ovulações .....	32
3.3.4	Taxa de Recuperação Embrionária.....	32
3.3.5	Estágio e Qualidade dos Embriões.....	34
3.4	DISCUSSÃO.....	34
3.5	CONCLUSÃO .....	40
	REFERÊNCIAS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento superovulatório pela administração exógena de gonadotrofinas permite que um maior número de folículos de uma onda chegue à dominância e posteriormente à ovulação. Já é possível encontrar o FSH equino purificado e, recentemente, pesquisas estão sendo desenvolvidas com o FSH recombinante (MEYERS-BROWN et al., 2010). Porém no Brasil, não existem produtos comerciais que possam ser utilizados com esta finalidade. Além disso, diferente do que acontece na espécie bovina, onde os protocolos superovulatórios estão bem estabelecidos, na espécie equina os protocolos ainda são inconsistentes e não há um consenso entre os pesquisadores.

A equinocultura no país está em expansão onde a intensificação e tecnificação das criações estão sendo cada vez mais requeridas. A utilização de biotécnicas reprodutiva como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) estão sendo utilizadas para melhorar a produção.

As éguas são classificadas como animais mono-ovulatórios, ocorrendo, normalmente, a fertilização de apenas um ovócito por ciclo estral. Esta característica é intrínseca da espécie, sendo extremamente indesejável gestação gemelar na égua, pois acarretam, geralmente, em morte embrionária e aborto.

Os esforços de manipulação do ciclo estral de éguas a fim de se produzir ovulações múltiplas já duram décadas. A utilização de produtos comumente utilizados para superovular vacas não apresentaram o sucesso esperado (IGNÁCIO, 2009). Vários trabalhos (SCOGGIN et al., 2002; NISWENDER et al., 2003) demonstraram que o eFSH e o EPE são as melhores opções para estimular múltiplas ovulações na égua. Entretanto, as observações de dados clínicos e de estudos na área revelam que a recuperação embrionária é muito inferior ao número de ovulações obtidas em éguas superovuladas (ROCHA FILHO, 2005).

No Brasil, alguns grupos de pesquisa, de modo experimental, confeccionam um preparado oriundo da hipófise de éguas que são enviadas a matadouros. O preparado denomina-se extrato de pituitária equina (EPE) e tem sido utilizado em éguas com o intuito de provocar múltiplas ovulações. Há vários relatos na literatura (ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002; FARINASSO, 2004; BONIN et al., 2010) que utilizaram EPE nos protocolos

superovulatórios de equinos, porém os resultados são ainda muito variáveis.

O extrato de pituitária equina é comumente utilizado para a superovulação de éguas nas doses de 12,5 ou 25 mg duas vezes ao dia (SCOGGIN et al., 2002), enquanto o FSH purificado eqüino é geralmente utilizado na dose de 12,5 mg duas vezes ao dia (NISWENDER et al., 2003). Bonin et al. (2010) e Farinasso (2004) utilizaram doses de EPE menores do que as convencionais e obtiveram aumento no número médio de duplas e triplas ovulações, o que proporcionou uma maior taxa de recuperação embrionária por coleta.

A possibilidade de se incrementar o número de ovulações no ciclo estral 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 coleta, com consequente redução dos custos do programa de transferência de embriões (BONIN et al., 2010). O desenvolvimento de um protocolo consistente para aumentar a taxa de ovulação e a recuperação embrionária em éguas teria um impacto extremamente positivo em programas comerciais de transferência de embriões, transferência de ovócitos e no tratamento de alguns casos de subfertilidade (SQUIRES et al., 2003).

A maioria dos trabalhos utilizou equinos da raça Mangalarga, Quarto de Milha, ou ainda animais sem raça definida para realizar os experimentos. Recentemente a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos da Raça Crioula (ABCCC) autorizou a utilização de biotecnologias da reprodução; como a inseminação artificial, congelamento e comercialização de sêmen criopreservado e também a coleta e transferência de embriões. Dessa forma, existe uma enorme demanda por protocolos que possam ser empregados na superovulação de éguas Crioulas, pois ainda não se sabe como os animais dessa raça se comportam ao procedimento de transferência de embriões e tão pouco a superovulação. O presente estudo teve como objetivo verificar a taxa de crescimento folicular mediante a aplicação de EPE em éguas da raça Crioula. Além disso, estabelecer um protocolo de superestimulação utilizando doses reduzidas de EPE que permita a ovulação de vários folículos e viabilize a coleta de embriões.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FOTOPERÍODO

Nos equinos, o período anovulatório e ovulatório, estão em associação com a duração dos dias (dias curtos e longos, respectivamente) (GINTHER et al., 2005). Além do fotoperíodo, fatores exógenos, tais como idade, estado reprodutivo, nutrição, condição corporal e temperatura ambiente afetam a atividade reprodutiva sazonal da égua. Entretanto, uma proporção de éguas continua o ciclo ao longo do ano (McKINNON & VOSS, 1993; AURICH, 2011).

A luz é um estímulo externo que pode afetar os ovários por meio de mecanismos neuroendócrinos. A retina atua nestes mecanismos através da exposição à luz, iniciando estímulos nervosos que são transmitidos via nervo óptico, porém separados das fibras comuns à visão. Este estímulo nervoso atravessa o gânglio cervical superior e chega à glândula pineal. O sinal enviado a partir da glândula pineal envolve a secreção de melatonina (NEELY et al., 1988; McKINNON & VOSS, 1993). A taxa de síntese ou liberação de melatonina parece estar relacionada de forma inversa com a duração das horas de luz. A secreção da melatonina aumenta durante o período noturno. Quando os dias são curtos, a melatonina liberada pela glândula pineal suprime a síntese e liberação de GnRH. Quando a duração do dia é maior, a secreção de melatonina diminui e reduz a influência inibitória sobre a síntese e liberação do GnRH (BLANCHARD et al., 2003).

### 2.2 ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL

A espécie equina apresenta similaridades e diferenças, com relação à espécie bovina, na regulação endócrina do ciclo estral. A égua apresenta um cio longo com um aumento gradual e prolongado da concentração de LH pré-ovulatório, uma divergência acentuada na liberação de FSH e o desenvolvimento de apenas uma a duas ondas foliculares que são classificadas como ondas maiores e menores. Além disso, apresentam uma atividade reprodutiva sazonal que influencia estas características (AURICH, 2011).

O GnRH proveniente do hipotálamo controla a liberação de FSH e LH da pituitária anterior (SAMPER, 2000). O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH)

são coletivamente chamados de gonadotrofinas, devido seu papel de estimular as células no interior das gônadas. O FSH e o LH são hormônios secretados pelas células da pituitária anterior, ambos classificados quimicamente como glicoproteínas (REECE, 1996). O crescimento, maturação, ovulação e luteinização de folículos dependem de padrões apropriados de secreção de LH, FSH e outros hormônios (SAMPER, 2000; BLANCHARD et al., 2003). As concentrações de FSH e LH existentes no plasma estão a níveis tônicos ou basais. Esses níveis são controlados por um mecanismo de retroalimentação negativa das gônadas (REECE, 1996; SAMPER, 2000). A concentração de estrógeno e progesterona também influencia na quantidade de secreção destes hormônios. Geralmente, uma elevação na concentração de estrógeno causa um aumento na sensibilidade da pituitária anterior ao GnRH, que resulta no aumento da liberação de gonadotrofinas. Já a progesterona diminui esta sensibilidade, e consequentemente diminui também a liberação de FSH e LH (REECE, 1996; BLANCHARD et al., 2003).

Os padrões divergentes de liberação de LH e FSH são mais pronunciados na égua do que em outras espécies de animais domésticos. A secreção do FSH durante o ciclo estral é bifásica com picos de 10 a 12 dias de intervalo. Altas concentrações são alcançadas no final do estro, logo após a ovulação e aproximadamente 10 dias antes da próxima ovulação (McKINNON & VOSS, 1993). A concentração máxima de FSH pode ser observada quando o maior folículo em desenvolvimento alcança um diâmetro médio de 10mm. Após o pico, as concentrações de FSH diminuem apresentando um intervalo de 3 ou 4 dias entre o pico de FSH e o início da divergência folicular. O declínio do FSH é necessário para o estabelecimento da divergência (GINTHER et al., 2004).

## 2.3 DIVERGÊNCIA FOLICULAR

O início da divergência folicular é caracterizado pelo crescimento contínuo do folículo de maior diâmetro (em média na égua 23mm), enquanto que os demais folículos apresentam uma taxa reduzida no seu crescimento (DONADEU & GINTHER, 2002; SQUIRES, 2006). Em associação com o fim da fase de crescimento comum, ou o início da divergência, ocorrem mudanças na relação FSH: folículo, onde ocorria o desenvolvimento de vários folículos, agora ocorre apenas o desenvolvimento do folículo dominante. A capacidade para a

dominância é similar entre os quatro maiores folículos no início da divergência, mas a dominância de um folículo menor é bloqueada quando um maior folículo está presente (GINTHER et al., 2004).

A divergência folicular é dependente de mecanismos inibitórios produzidos pelo folículo dominante que envolve mudanças importantes no padrão endócrino (BEG & GINTHER, 2006). Quando a onda de FSH está em declínio e o futuro folículo dominante está próximo do início da divergência desenvolvem-se várias reações bioquímicas e moleculares dentro da cavidade intrafolicular. Atualmente acredita-se que o gatilho para tais eventos esteja relacionado a família dos Fatores de Crescimento Ligados a Insulina (IGF's). Os folículos que estão emergindo na onda de crescimento folicular apresentam as IGF's ligadas a proteínas estabilizadoras (IGFBP). No folículo que está pré-determinado a ser o dominante, as IGFBPs serão degradadas por proteases de ligação proteica (BPPr), aumentando as concentrações de IGF-1 livre. A IGF-1 livre estimula a produção de inibina A, activina-A, mas não têm um efeito imediato no estradiol (E2). O efeito global destas alterações é uma maior responsividade do folículo dominante às concentrações de LH e FSH. Estes eventos asseguram que o folículo dominante seja o único folículo da onda capaz de continuar a crescer, mesmo em baixas concentrações de FSH circulantes (GINTHER et al., 2004). Simultaneamente, a inibina produzida pelo folículo dominante suprime as concentrações circulantes de FSH (BERGFELT et al., 1991; McKINNON & VOSS, 1993; DAVIES MOREL, 2003). Estes eventos moleculares propiciam uma maior atividade esteroidogênica (maior produção de estradiol) e expressão de receptores para o LH nas células da granulosa à medida que o folículo continua a crescer (McKINNON & VOSS, 1993; SAMPER et al., 2007).

## 2.4 OVULAÇÃO

O LH sistêmico não está envolvido na divergência folicular, mas é necessário para posterior crescimento do folículo dominante após o início da divergência (GINTHER, 2000). Algumas espécies de animais domésticos apresentam uma curta e pronunciada elevação das concentrações de LH pré-ovulatório. Esta elevação é chamada de pico pré-ovulatório de LH e pode ser observado nos bovinos. Esta elevação abrupta de LH não existe na égua. Nesta espécie, as concentrações de LH permanecem elevadas por vários dias após a ovulação, atingindo seu máximo 1 dia após a ovulação (GINTHER et

al., 2004; GINTHER et al., 2010). Os níveis de LH declinam progressivamente durante os próximos 4 a 5 dias. As concentrações do LH são baixas do dia 5 a 16 do ciclo mantendo um nível de concentração basal (McKINNON & VOSS, 1993).

A ovulação é um complexo processo envolvendo uma sequência de eventos que levam a ruptura do folículo dominante (> 30 mm) na fossa de ovulação (SAMPER et al., 2007). Durante a ovulação, o ócito e a corona radiata entram no oviduto, enquanto a maioria do líquido folicular passa para a cavidade peritoneal. Hormônios deste fluido são rapidamente absorvidos na circulação e ocorre um pronunciado aumento nas concentrações de inibina no dia da ovulação (BERGFELT et al., 1991; McKINNON & VOSS, 1993).

A literatura relata que a ocorrência de dupla ovulação varia de 2% em pôneis e 25% em puros-sangues (DAVIES MOREL, 2003; GINTHER et al., 2008). A incidência de tripla ovulação é pequena (menor que 1%). Vários fatores estão envolvidos tais como, raça, predisposição genética e condição reprodutiva (McKINNON & VOSS, 1993).

A média de duração do estro durante o período ovulatório é de 5 a 7 dias, mas a maioria das ovulações (69% a 78%) ocorre durante os dois últimos dias do estro, e 10% a 14% depois do final do estro. E a fase luteal, ou diestro dura 14 a 16 dias (SAMPER et al., 2007).

A fase de diestro ou luteal é caracterizada pela formação do corpo lúteo (NEELY et al., 1988). Na égua, as concentrações circulantes de progesterona aumentam, imediatamente, no momento da ovulação (GINTHER, 2000). O fim de um ciclo estral e o início de outro é marcado pela ovulação (dia 0 do ciclo). O término da fase lútea acontece com a regressão do corpo lúteo (SAMPER, 2000). A luteólise na égua é caracterizada pela diminuição nas concentrações sanguíneas de progesterona, por volta dos dias 15-17 do ciclo (GINTHER et al., 2005). Assim como em outras espécies, a PGF2 $\alpha$  é responsável pela regressão do corpo lúteo. Há evidências de que a ocitocina atua na liberação de PGF2 $\alpha$  pelo útero não gestante (McKINNON & VOSS, 1993). Durante o diestro a secreção inicial de ocitocina é, provavelmente, proveniente da hipófise. Em contraste com outras espécies, não existe nenhuma síntese significativa de ocitocina lútea na égua, sendo a única espécie em que a ocitocina foi localizada no endométrio. Especula-se que há células endometriais específicas

produtoras de oxitocina que contribuem para este mecanismo (BAE & WATSON, 2003).

## 2.5 SUPEROVULAÇÃO

A aceitação da transferência de embriões por algumas associações resultou em uma importante mudança na gestão de éguas reprodutoras. Inicialmente a técnica era aceita para éguas que tinham mais de 16 anos de idade ou para aquelas que apresentavam problemas reprodutivos que inviabilizavam a manutenção de uma gestação. Mas isto foi rapidamente alterado, sendo que não há mais restrições sobre a idade ou status reprodutivo da égua doadora inscrita em um programa de TE (SQUIRES, 2009). Com essas mudanças que permitem registros de vários potros a partir de uma égua em um determinado ano, o desejo de obter vários embriões em uma estação reprodutiva aumentou drasticamente. Isso gerou interesse na superovulação (SQUIRES, 2006).

Um dos principais custos de um programa de transferência de embriões é a manutenção de receptoras (ALVARENGA et al., 2001; SQUIRES et al., 2003). A superovulação traz benefícios econômicos quando associada a programas de transferência de embriões, por diminuir principalmente os gastos com a manutenção de receptoras vazias aumentando as taxas de recuperação embrionária (NISWENDER et al., 2003; CARMO et al., 2006; PERES et al., 2007; BONIN et al., 2010). A taxa de recuperação embrionária de éguas em programas de TE com ovulação única é de aproximadamente 50% (NISWENDER et al., 2003; SQUIRES et al., 2003) com uma taxa de prenhez pós-transferência de 70%, assim o cliente tem aproximadamente 35% de chances de obtenção de uma prenhez (SQUIRES & McCUE, 2007). Éguas que, espontaneamente, apresentam dupla ou tripla ovulações têm uma maior taxa de recuperação embrionária que as de ovulação única.

Os primeiros relatos no uso de FSH para indução de múltiplas ovulações em éguas utilizaram o FSH suíno (FSH-p), devido à sua ampla disponibilidade. Em síntese, a administração dessa gonadotrofina em éguas duas vezes ao dia, na metade ou no final do diestro até o início do estro, forneceu resultados pouco satisfatórios no que diz respeito à taxa de ovulação e número de éguas manifestando mais que uma ovulação por ciclo estral. Além de produzir uma resposta bem inferior à obtida na espécie bovina, trata-se de um método oneroso por requerer administração de elevadas doses – cerca de 70 vezes mais



do que o necessário para superovular vacas – sendo, portanto, de aplicação restrita (ROCHA FILHO, 2005). Ignácio (2009) testou FSH-p nas doses de 25 e 50 mg, iniciada em um dia determinado do ciclo estral e em momentos específicos do desenvolvimento folicular e verificou que não houve melhora na resposta ovulatória em éguas. Em trabalho recente, Cullingford et al. (2010) também utilizaram FSH-p, nas doses de 25, 50, 100, e 150 mg e verificaram que o hormônio foi ineficaz em induzir ovulações múltiplas em éguas com qualquer uma das doses.

Na década de 70 começaram a aparecer alguns estudos nos Estados Unidos mostrando que a ovulação e a múltipla ovulação podiam ser induzidas durante o anestro com extrato bruto de hipófise e que as ovulações múltiplas (acima de 4 ovulações) podiam ser induzidas em éguas cíclicas (DOUGLAS et al., 1974). Pesquisas têm mostrado que a égua é indiferente às drogas superovulatórias convencionais utilizadas rotineiramente em outras espécies (IGNÁCIO, 2009; CULLINGFORD et al., 2010). A superovulação na égua requer o uso de gonadotrofinas equinas. A utilização de preparados heterólogos pode resultar aparentemente em uma forte resposta imune, no que diz respeito a tratamentos repetidos. McKinnon et al. (1992) em estudo, verificaram que a imunização ativa contra a inibina em éguas resultou no dobro da taxa de ovulação, mas eram necessárias várias aplicações ao longo de várias semanas. Eventuais reações adversas no local da injeção teriam impedido seu uso comercial para superovulação. O extrato de pituitária equina (EPE) é um composto que apresentou relativo sucesso na superestimulação ovariana em equinos, porém a resposta ao tratamento é baixa comparada a outras espécies (CARMO, 2003).

## 2.6 EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA

No Brasil, não existem drogas superovulatórias disponíveis comercialmente para a égua. Dentre os agentes testados, o extrato de pituitária equina (EPE) e o FSH equino purificado (eFSH) são os que têm apresentado os resultados mais consistentes (PERES et al., 2007). Porém, o uso em larga escala do EPE é limitado, pois há um reduzido número de matadouros de cavalos no Brasil e a purificação do composto apresenta um elevado custo de produção (BONIN et al., 2010). Os resultados encontrados na literatura, com o uso do EPE, são muito variáveis, principalmente em decorrência da grande diferença encontrada na proporção das gonadotrofinas (LH: FSH) dos preparados (PERES et al., 2007).

Bonin et al. (2010) em experimento com éguas velhas (15 a 20 anos) da raça Quarto de Milha, verificaram que não houve atraso no desenvolvimento embrionário em todos os embriões recuperados das éguas tratadas com EPE, quando comparados aos embriões recuperados do grupo controle. Os autores sugeriram que o EPE teve efeito na maturação do oócito e transporte mais rápido deste embrião ao útero. Os resultados obtidos no experimento permitiram concluir que a administração de extrato de pituitária equina em éguas idosas doadoras de embriões interferiu positivamente na dinâmica de crescimento do folículo dominante, aumentando a incidência de múltiplas ovulações, incrementando a taxa de recuperação embrionária por ciclo, propiciando a recuperação de embriões em fase correta de desenvolvimento e melhorando a eficiência reprodutiva das doadoras tratadas. Dessa forma, os autores sugerem que a EPE é uma alternativa para otimizar o processo reprodutivo dessas éguas.

Peres et al. (2007), analisando a ultra-estrutura embrionária observaram que o tratamento superovulatório produziu embriões que se desenvolveram adequadamente. Observaram ainda que embriões coletados de éguas superovuladas parecem apresentar viabilidade normal, morfologia microscópica e ultra-estrutura compatível a de embriões obtidos de éguas não estimuladas por gonadotrofinas exógenas. Porém, a percentagem de ovócitos não fertilizados observada nos animais superovulados também parece ter sido superior (17,7%) ao descrito na literatura para éguas com ovulações únicas (3,6% a 12,9%).

Atualmente, há uma variação muito grande nos resultados quando se utilizam protocolos com EPE. Isso se deve a alguns fatores como: momento do início do tratamento em relação ao ciclo estral, relação FSH e LH nos preparados, duração do tratamento, dose de gonadotrofina e a via de administração do produto. Esta variabilidade pode ainda ser influenciada por fatores individuais tais como: a raça, o estado nutricional, a estação do ano e ainda a refratariedade a tratamentos superovulatórios repetidos. Estes fatores possivelmente são o principal entrave para que o extrato de pituitária equina seja utilizado comercialmente (CARMO, 2003; FARINASSO, 2004).

## 2.7 DOSES HORMONAIS

Diversos estudos tem testado protocolos utilizando EPE e eFSH com diferentes doses e momentos de aplicação. Alvarenga et al. (2001) utilizaram EPE em aplicações de 25 mg uma ou duas vezes ao dia, logo após a aplicação de prostaglandina, desde que nenhum folículo maior ou igual a 20 mm de diâmetro tivesse sido detectado no momento do início do tratamento. Com esse protocolo relataram que o número de ovulações foi de 1,2 para o ciclo anterior ao tratamento, 2,3 e 7,1 ovulações para os tratamentos uma e duas vezes ao dia, respectivamente. E o número de embriões recuperados por égua foi de 1,6 e 3,5 para os grupos tratados uma e duas vezes ao dia.

Scoggin et al. (2002) avaliaram estratégias para melhorar a resposta ovariana a superovulação com EPE e verificaram que com doses menores as taxas de recuperação embrionária foram maiores. Neste estudo os autores realizaram 4 tratamentos distintos com EPE: 25 mg uma vez ao dia, 50 mg uma vez ao dia, 12,5 mg duas vezes ao dia e 25 mg duas vezes ao dia. O tratamento que recebeu 50 mg uma vez ao dia desenvolveu o maior número de folículos pré-ovulatórios e proporcionou o maior número de ovulações quando comparados aos demais tratamentos. Entretanto, a recuperação embrionária foi maior nas éguas que receberam 12,5 mg duas vezes ao dia.

Farinasso (2004) avaliou o tratamento com EPE em éguas cíclicas, em sua maioria da raça Mangalarga Marchador, com doses diárias de 2 mg, 4 mg e 6 mg. O tratamento com EPE utilizando dose de 2 mg, não apresentou diferença significativa do grupo controle, mostrando que esta dose é ineficiente para induzir ovulações múltiplas em éguas cíclicas. A dose diária de 4 e 6 mg induziu ovulações múltiplas em 76,9 % dos ciclos tratados, apresentando resultado significativamente superior quando comparado com grupo controle.

Bonin et al. (2010) avaliaram os efeitos da administração de 7 mg/IM de EPE duas vezes ao dia, a partir do dia 8 pós-ovulação até que um folículo pré-ovulatório fosse observado. O tratamento hormonal resultou em um maior número de embriões recuperados no lavado uterino oito dias após a ovulação. Estes embriões apresentaram grau de desenvolvimento condizente com idade gestacional na época da coleta. Os resultados obtidos indicaram que as éguas tratadas apresentaram mais de uma ovulação e maior número de embriões recuperados por ciclo.

Rocha filho (2005) avaliou os efeitos de doses baixas de EPE ou eFSH purificado no crescimento folicular, taxa de ovulação e de recuperação embrionária em éguas. O grupo tratado com EPE recebeu 4 mg por via intramuscular uma vez ao dia e o grupo tratado com eFSH purificado recebeu 5 mg por via intramuscular, uma vez ao dia. Ambos os tratamentos aumentam a incidência de ovulações múltiplas em éguas. Esses protocolos de indução de ovulações múltiplas com baixas doses hormonais propiciam a recuperação de um embrião em média por lavado, o que já torna viável e interessante a aplicação comercial dos mesmos. Mas o autor concorda que o aumento nas doses diárias desses preparados hormonais – ainda utilizando doses abaixo das preconizadas na superovulação –, associado à seleção dos animais com base na população folicular pré-tratamento, podem produzir aumentos mais consistentes na incidência de ovulações duplas e triplas em éguas e melhorar a relação custo/benefício dos programas comerciais de transferência de embriões equinos.

Estudos específicos sobre os efeitos da administração de EPE em ciclos subsequentes são escassos. A maioria dos relatos em que se utilizou mais de um ciclo estral diz respeito à utilização de dois ciclos intercalados por um ou dois ciclos sem tratamento, não tendo sido encontrado diferença na resposta superovulatória de éguas entre os tratamentos realizados no primeiro e segundo ciclo estral, verificando apenas uma tendência a uma melhor resposta no segundo ciclo tratado (ROCHA FILHO, 2005).

## 2.8 INÍCIO DA SUPEROVULAÇÃO

Uma melhor resposta superovulatória foi observada em éguas que apresentam folículos entre 10 e 20 mm no início do tratamento, sendo que a maioria destes chega a ovulação. Este parâmetro é um bom indicativo para programar o início do protocolo (CARMO, 2003). Rocha Filho (2005) acredita ser mais interessante selecionar as éguas antes do início do tratamento com base na população folicular que elas apresentam. Este autor optou por iniciar os tratamentos em um dia fixo (dia 8) com o intuito de simplificar o protocolo. No entanto, no oitavo dia pós-ovulação algumas éguas apresentaram folículos de diâmetro inferior a 15 mm e demoraram mais dias em tratamento, enquanto outras já apresentavam folículos de diâmetro próximo a 30 mm, o que provavelmente comprometeu a

resposta dessas éguas ao tratamento. Gimenes (2010) também afirma que a população folicular presente no início do protocolo influencia no tempo (dias) de tratamento. E ainda, a presença de folículos dominantes no momento do início dos tratamentos apresenta resultados aquém do esperado.

O estudo de Gimenes (2010) revelou ainda que quando o tratamento foi iniciado com folículos que apresentavam diâmetro de aproximadamente 23 mm, resultou em uma diminuição no tempo de tratamento, mantendo a resposta ovulatória satisfatória com baixos custos. O tratamento com baixa dose de EPE (6 ou 8mg) aumentou o número médio de folículos >30mm e aumentou o número de ovulações, especialmente quando se utilizou 8 mg.

## 2.9 RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA

A baixa taxa na recuperação embrionária tem sido uma grande incógnita no processo da superovulação na espécie equina, levando a suspeita de uma influência na maturação oocitária dos folículos recrutados da onda folicular oriunda da superestimulação ovariana com a utilização de uma droga que apresenta altos níveis de LH como é o caso do EPE (CARMO, 2003). Acredita-se que boa parte destas alterações, provavelmente seja induzida por modificações no perfil endócrino dos animais superovulados (MACHADO, 2008).

As razões para a baixa recuperação embrionária em éguas superovuladas permanecem obscuras (CARMO et al., 2006). Segundo Squires (2006) existem algumas razões principais pelas quais, a superovulação não se tornou uma técnica comum, utilizada na reprodução de equinos. Ele relata que, como se sabe, o ovário da égua é invertido, com o córtex no interior do ovário e a medular na periferia. Além disso, a superfície do epitélio germinativo se apresenta apenas em uma pequena porção do ovário, na área da fossa de ovulação, sendo esta a única região em que o folículo é capaz de romper-se. Assim, o número de folículos que ovulam pode ser limitado pelo espaço disponível na fossa da ovulação. Essa restrição anatômica pode limitar o número de ovulações na égua em comparação com outras espécies, como a vaca, por exemplo.

Alvarenga et al. (2001) também atribuem a baixa taxa de ovulação devido a limitada área disponível na fossa de ovulação e ao grande tamanho do folículo pré-ovulatório da égua. Além disso, afirmam que é possível que os oócitos de alguns dos folículos induzidos

nunca sejam expulsos da cavidade folicular, ou que os ovócitos nunca teriam sido apanhados pelo oviduto por causa da tamanha distensão do ovário e extensão limitada do infundíbulo. Rocha Filho (2005) acredita que possa ocorrer a luteinização de folículos ovarianos e o desenvolvimento de folículos anovulatórios em decorrência de tratamentos superovulatórios. Carmo et al. (2006), relatam que a presença de uma grande quantidade de sangue coagulado na fossa ovulatória de éguas superovuladas sugerem uma perturbação no processo de ovulação. Sendo provável que esta hemorragia excessiva poderia estar envolvida na falha do oócito em chegar ao oviduto. Estes mesmos autores verificaram uma menor taxa de recuperação de oócitos por ovulação em éguas superovuladas quando comparadas às éguas controle. Esta diferença tornou-se evidente quando as éguas superovuladas apresentavam mais do que 3 ovulações.

## 2.10 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO NO BRASIL

O Brasil, a Argentina e os EUA são os países que mais produzem embriões equinos no mundo, responsáveis por mais de 88% de todos os embriões coletados (43%, 29% e 18% respectivamente). Segundo o último relatório do Comitê estatístico da IETS, publicado em dezembro de 2010, a atividade global da TE em equinos aumentou 12,7% em relação ao ano de 2009. No Brasil, as principais raças que utilizam a TE são Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. (STROUD, 2011).

Os animais da raça Crioula por muito tempo foram criados no sistema de criação extensivo, sendo o manejo reprodutivo realizado com a organização de manadas, onde os garanhões cobriam as éguas a campo, ou realizava-se a monta controlada através da rufiação e cobertura das éguas em cio. Com a expansão da criação e conseqüentemente tecnificação da produção, as práticas de manejo mudaram consideravelmente. Nos últimos anos, a procura por biotecnias aplicadas a reprodução aumentou, principalmente devido a liberação do uso da IA e da TE pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC). Atualmente existem 120 potros nascidos oriundos de transferência de embriões. Só no ano passado foram comunicados 85 produtos de transferência (dados não publicados – Serviço de Registro Genealógico ABCCC, 2013).

Existem vários trabalhos que relatam o comportamento reprodutivo de raças como a Quarto de Milha, Árabe, Mangalarga,

Mangalarga Marchador e até mesmo de animais sem raça definida, mas ainda não há literatura disponível relatada na raça Crioula. Os trabalhos existentes são escassos e praticamente não há relatos sobre este tipo de biotécnica reprodutiva em éguas Crioulas. Há, portanto, uma enorme demanda por protocolos que possam ser empregados nas éguas Crioulas, pois ainda não se sabe como os animais dessa raça se comportam ao procedimento de transferência de embriões e tão pouco a superovulação. O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta superovulatória em éguas da raça Crioula comparando e correlacionando com a resposta das éguas da raça Quarto de Milha.

### 3 CAPÍTULO ÚNICO

#### **UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO COM BAIXA DOSE DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE) EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA E QUARTO DE MILHA**

##### 3.1 INTRODUÇÃO

A raça Crioula, historicamente, teve grande importância para a América do Sul. Nos últimos anos sua relevância aumentou, em especial para o Brasil, devido à significativa expansão tanto em qualidade quanto em quantidade dos plantéis. Atualmente, possui um total de 350.793 animais vivos registrados na ABCCC. Somente no ano passado foram comunicados um total de 49.416 produtos. Com a recente liberação da associação para o uso da IA e da TE em animais da raça Crioula, espera-se um aumento significativo na utilização destas técnicas nos próximos anos, devido ao grande número de cavalos Crioulos que o Brasil possui.

Um protocolo que tenha o objetivo de aumentar a taxa de ovulação e a recuperação embrionária em éguas teria um impacto extremamente positivo em programas comerciais de transferência de embriões, transferência de ovócitos e no tratamento de alguns casos de subfertilidade. A taxa de recuperação embrionária de éguas em programas de TE com ovulação única é de aproximadamente 50% (NISWENDER et al., 2003; SQUIRES et al., 2003) com uma taxa de prenhez pós-transferência de 70%, assim o cliente tem aproximadamente 35% de chances de obtenção de uma prenhez (SQUIRES & McCUE, 2007). A superovulação é uma ferramenta que pode ser utilizada para melhorar estes índices.

A utilização de protocolos superovulatórios em equinos esbarra em problemas conceituais, visto que muitas vezes os técnicos esperam que o processo superovulatório seja equiparado aos resultados obtidos em outras espécies, como por exemplo, a espécie bovina. Vários trabalhos já foram desenvolvidos (IGNÁCIO, 2009; CULLINGFORD et al., 2010) e comprovam que os protocolos superovulatórios nos moldes daqueles aplicados para bovinos são ineficientes.



O efeito da resposta ovariana é dose dependente, ou seja, o aumento da dose de EPE promove um maior estímulo folicular. Em contrapartida, alguns trabalhos mostram que quanto maior o número de ovulações, menor a taxa de recuperação embrionária por ovulação (ALVARENGA et al., 2001 ; SCOGGIN et al., 2002; CARMO et al., 2006). Pesquisadores têm se dedicado ao estudo dos fatores responsáveis pela baixa recuperação embrionária em éguas superovuladas e ao desenvolvimento de protocolos que driblem esses fatores, produzindo menos efeitos adversos e promovendo a estimulação moderada e não excessiva dos ovários. O extrato de pituitária equina é comumente utilizado para a superovulação de éguas nas doses de 12,5 ou 25 mg duas vezes ao dia (SCOGGIN et al., 2002). Tais protocolos promovem boa estimulação ovariana, mas com resultados de recuperação embrionária muito aquém das expectativas. Bonin et al. (2010) e Farinasso (2004) utilizaram doses de EPE mais baixas do que as utilizadas para superovulação convencional (7 mg duas vezes ao dia e 6 mg uma vez ao dia, respectivamente) e obtiveram aumento no número médio de embriões recuperados, provocado pela maior incidência de ovulações duplas e triplas.

Os trabalhos científicos existentes referentes a raça Crioula são escassos. A raça Crioula e Quarto de Milha apresentam características bem definidas e distintas entre si, com diferença marcante principalmente, em tamanho e peso. Pesquisas avaliando o comportamento da raça Quarto de Milha frente a protocolos de superovulação e transferência de embriões já foram desenvolvidos (BONIN et al., 2010), mas na raça Crioula pouco se sabe sobre seu comportamento fisiológico frente a tais biotécnicas reprodutivas. O presente estudo realiza um comparativo entre as raças devido a suas particularidades, as quais poderiam influenciar em uma resposta diferente ao EPE. O trabalho teve por objetivos verificar a taxa de crescimento folicular mediante a aplicação de EPE em éguas da raça Crioula, estabelecer um protocolo que promova múltiplas ovulações em ambas as raças, utilizando dose reduzida de EPE, permitindo a ovulação de múltiplos folículos e que conseqüentemente, melhore as taxas de recuperação embrionária.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Local

O experimento foi desenvolvido em dois períodos, durante a estação reprodutiva de 2011/2012 e a estação reprodutiva de 2012/2013 (outubro a janeiro). A região do Planalto Serrano de Santa Catarina apresenta estações do ano bem definidas e conseqüentemente uma estação reprodutiva bem característica. O trabalho foi executado em duas propriedades distintas, na região da serra catarinense, distantes 90 km entre si. A respectiva latitude e longitude das propriedades está descrita a seguir: Animais da raça Quarto de Milha (27°50'35.73"S e 49°26'13.72"O); Animais da raça Crioula (27° 43'35.36" S e 50° 05'59.31"O).

### **3.2.2 Animais**

Foram utilizadas 8 éguas, doadoras de embrião, da raça Quarto de Milha e 6 éguas doadoras da raça Crioula. As éguas da raça Crioula apresentavam idade entre 3 a 4 anos, com média de peso de 345 kg. As éguas da raça QM apresentavam idade variando entre 3 a 11 anos, com média de peso de 532,5 kg. As doadoras selecionadas eram solteiras, sem potro ao pé e apresentavam aparelho reprodutivo saudável e estavam livres de doenças infecto-contagiosas.

Os animais encontravam-se em pastagem de azevém e trevo durante o dia, com livre acesso a água e sal mineral. Durante a noite permaneciam em cocheiras, recebendo suplementação com alfafa, aveia e ração comercial.

### **3.2.3 Extrato de Pituitária Equina (EPE)**

O produto utilizado para superovular as éguas deste trabalho foi o extrato de pituitária equina (EPE). O EPE utilizado foi adquirido do Laboratório de Reprodução Animal – Unicórnio (Brasília), cujo responsável é o Msc. Adalberto Farinasso.

O EPE foi utilizado na dose de 14 mg diárias, divididas em duas aplicações de 7 mg a cada 12 horas por via intramuscular. O volume por aplicação foi de 1,5 ml, com seringa de 3 ml e agulha de 0,70 x 30 mm.

### **3.2.4 Delineamento Experimental**

Os animais foram avaliados por três ciclos estrais consecutivos, onde que cada animal passava por todos os grupos. O

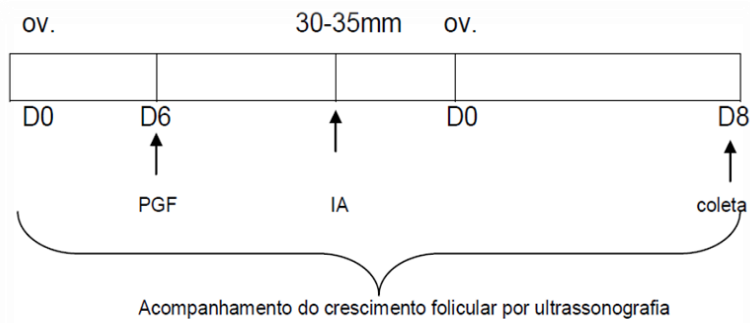
primeiro ciclo estral era o grupo controle, o segundo o grupo EPE e o terceiro o grupo pós- EPE, sendo conduzidos da seguinte forma:

- Grupo Controle (ver Figura 1): aplicação de PGF2 $\alpha$  e acompanhamento do crescimento folicular até a ovulação. As inseminações foram realizadas, se necessário, a cada 48 horas.

- Grupo EPE (ver Figura 2): aplicação de PGF2 $\alpha$  e acompanhamento do crescimento folicular. A partir do momento que houvesse a presença de folículos com cerca de 20 mm de diâmetro era realizada a administração de 7 mg EPE, via intramuscular, duas vezes ao dia, com intervalo de 12h. Quando a maioria dos folículos alcançava um diâmetro igual ou superior a 35 mm era induzida a ovulação através da administração 2500UI de hCG. A doadora era inseminada a cada 48h até o momento da ovulação.

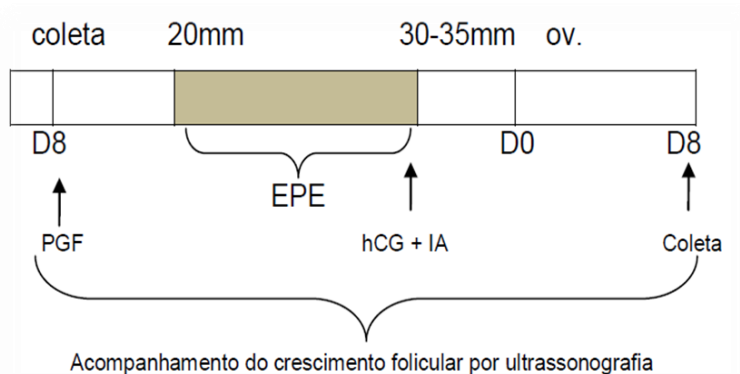
- Grupo Pós-EPE (ver Figura 3): Aplicação de PGF2 $\alpha$  e monitoramento do próximo ciclo após a superovulação com EPE. Os procedimentos realizados nas éguas foram idênticos ao do grupo controle.

Figura 1 – Esquema do protocolo do grupo controle.



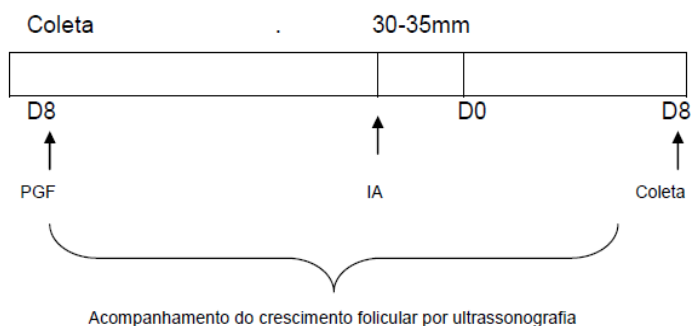
Fonte: produção do próprio autor

Figura 2 – Esquema do protocolo do Grupo EPE.



Fonte: produção do próprio autor

Figura 3 - Esquema do protocolo do grupo pós-EPE.



Fonte: produção do próprio autor

### 3.2.5 Monitoramento do crescimento folicular

O monitoramento reprodutivo consistiu no acompanhamento diário do crescimento folicular de todas as éguas através de palpação retal e exame ultrassonográfico. A ultrassonografia foi realizada com auxílio de ultrassom Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear de 5,0 MHz. Foram verificadas as características

uterinas, consistência e tamanho dos folículos. Estes parâmetros foram utilizados para auxiliar na execução do protocolo superovulatório.

O acompanhamento ultrassonográfico foi realizado até o momento da ovulação. Ao longo do ciclo foi determinado o número de folículos dominantes e posteriormente o número de ovulações.

### **3.2.6 Inseminação Artificial**

As inseminações foram realizadas com sêmen fresco pertencente a garanhões em boas condições reprodutivas, com fertilidade comprovada. As éguas Quarto de Milha foram inseminadas com um garanhão da raça QM e as éguas Crioulas inseminadas com um garanhão da raça Crioula.

As coletas foram realizadas com o auxílio de uma vagina artificial modelo Hannover. Uma amostra do ejaculado foi analisada em microscópio óptico para a certificação da qualidade espermática. A dose utilizada variou entre 0,5 a 1 bilhão de espermatozoides viáveis com motilidade progressiva.

Após prévia lavagem e assepsia de lábios vulvares e períneo, com auxílio de pipeta de inseminação, a dose de sêmen era depositada no corpo uterino. Quando necessário repetia-se a inseminação 48 horas após.

### **3.2.7 Coleta de Embriões**

No oitavo dia após a ovulação, era realizada a coleta de embriões pelo método não cirúrgico transcervical.

Inicialmente a doadora era mantida em um tronco de contenção adequado, a cauda enfaixada e amarrada. As fezes eram removidas do reto e na sequência realizada a higienização do períneo com água e sabão neutro sendo posteriormente enxaguada e seca com papel toalha.

A realização da coleta era por meio de lavagem uterina, sistema fechado, com ringer lactato utilizando uma sonda de silicone (Bivona CH 32), equipo de três vias e filtro coletor para embriões. Foram utilizados por coleta cerca de 3 a 5 litros de solução previamente aquecidos e mantidos a uma temperatura de aproximadamente 35°C.

Com o uso de luva descartável e lubrificada, a sonda era introduzida na vagina, conduzida através da cervix até chegar ao

corpo do útero onde o balão era inflado. A solução de ringer lactato era então infundida para o interior do útero, em uma quantidade suficiente para preencher os cornos e o corpo uterino. Sempre era utilizada a técnica da re-coleta quando não se observava o embrião na primeira procura.

### **3.2.8 Busca e Seleção dos Embriões**

No laboratório o líquido contido no filtro coletor era repassado para uma placa de Petri (100x20) previamente marcada. Com uma seringa de 20 ml contendo ringer lactato realizava-se a lavagem do copo coletor sendo escoado o líquido para o interior da placa.

O conteúdo da placa era examinado com o auxílio de um estereomicroscópio em aumento de 10 a 40x, dependendo do estágio de desenvolvimento do embrião.

Localizando o embrião na placa de Petri, este era removido por aspiração com auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 ml, para uma placa contendo meio de manutenção (Holding). Após este procedimento realizava-se a lavagem do embrião e posteriormente sua classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e grau de qualidade de acordo com as normas internacionais estabelecidas pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS).

### **3.2.9 Análise Estatística**

Os dados foram analisados utilizando o PROC GLM do pacote estatístico SAS. As variáveis foram submetidas ao teste de Tukey e as médias dos quadrados mínimos ajustados para comparação múltipla utilizando o teste de Tukey-Kramer, com nível de significância de 5%. Os valores estão sendo apresentados como médias  $\pm$  SD.

## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Crescimento Folicular**

Observou-se que o tempo de crescimento dos folículos até a ovulação foi diferente ( $p < 0,01$ ) entre as raças estudadas, apresentando uma média de desenvolvimento de 10,1 e 7,7 dias para as Crioulas e QM, respectivamente. Porém quando avaliamos o

crescimento folicular distribuído entre os tratamentos, observamos que na raça Crioula, as éguas que receberam EPE apresentaram um período de crescimento diferenciado em relação às éguas QM do grupo EPE. Quando analisamos separadamente os grupos dentro das raças específicas observamos que não houve diferença no período de crescimento folicular (ver Tabela 1).

O tamanho médio do folículo pré- ovulatório foi de  $37,6 \pm 2,39$  mm de diâmetro nas éguas Crioulas e  $35,9 \pm 3,2$  mm para as QM. A taxa média diária de crescimento folicular nas éguas Crioulas foi de 3,08; 2,39 e 2,89 mm no ciclo Controle, EPE e Pós-EPE. Já nas éguas Quarto de Milha a taxa de crescimento folicular foi de 3,49; 2,87 e 3,35 mm para os grupos Controle, EPE e Pós-EPE, respectivamente.

Os períodos da estação de monta onde foi desenvolvido o trabalho, não influenciaram no crescimento dos folículos ( $p > 0,05$ ).

Tabela 1 – Período de crescimento folicular a partir do momento da aplicação do luteolítico até a ovulação no grupo controle, EPE e pós-EPE na raça Quarto de Milha e Crioula.

	<b>QUARTO DE MILHA (dias)</b>	<b>CRIOULA (dias)</b>
<b>Controle</b>	$7,2 \pm 1,7$	$9,5 \pm 2,7$
<b>EPE</b>	$7,2 \pm 1,6^b$	$11,3 \pm 1,9^a$
<b>Pós- EPE</b>	$8,8 \pm 2,1$	$9,6 \pm 2,3$

a, b Letras diferentes entre linhas e colunas significa diferença estatística ( $p < 0,01$ )

### 3.3.2 Dose de EPE vs Dias em tratamento

Houve diferença entre as raças ( $p = 0,005$ ) no número de dias em tratamento com EPE com média de 6,6 e 4,7 dias para a raça Crioula e QM, respectivamente (ver Tabela 2). As éguas Crioulas receberam em média uma dose de 92,4 mg de EPE por tratamento, enquanto que as éguas QM receberam 65,8 mg de EPE por tratamento.

Tabela 2 – Duração do tratamento superovulatório (dias) no grupo EPE das raças Crioula e Quarto de Milha.

<b>RAÇA</b>	<b>DIAS EM TRATAMENTO</b>
Crioula	6,66 <sup>a</sup>
QM	4,75 <sup>b</sup>

Letras a,b na coluna significa diferença estatística (p=0,005)

### 3.3.3 Número de Ovulações

O tratamento com EPE influenciou o número de ovulações quando foi analisada a raça em separado (p=0,0534). E analisando os dados em conjunto (QM + Crioula) também verificou-se um incremento no número de ovulações (p<0,01) naquelas éguas tratadas com EPE (2 ovulações/ciclo), quando comparados ao grupo controle e pós-EPE (1,14; 1,30 ovulação/ciclo, respectivamente – ver Tabela 3). Não foi observada influência do ano no número de ovulações nas éguas estudadas (p>0,05).

Tabela 3 – Número de ovulações no grupo controle, EPE e pós-EPE na raça Crioula, Quarto de Milha e dados agrupados (Quarto de Milha + Crioula)

	<b>QUARTO DE MILHA</b>	<b>CRIOULA</b>	<b>QM + CRIOULA</b>
<b>Controle</b>	1,12±0,35 <sup>b B</sup>	1,16±0,40 <sup>b B</sup>	1,14 <sup>d</sup>
<b>EPE</b>	2,00±0,53 <sup>a AB</sup>	3,33±2,06 <sup>a A</sup>	2,00 <sup>c</sup>
<b>Pós- EPE</b>	1,42±0,53 <sup>ab B</sup>	1,16±0,40 <sup>b B</sup>	1,30 <sup>d</sup>

Letras a,b demonstram diferença estatística na coluna (interação tratamento dentro de cada raça) (p< 0,01)

Letras A, B demonstram diferença estatística entre colunas e linhas (tratamento vs raça) (p=0,0534)

Letras c, d demonstram diferença estatística na coluna (p< 0,01)

### 3.3.4 Taxa de recuperação embrionária

Neste trabalho foram acompanhados 41 ciclos estrais (QM+Crioula) sendo recuperados 51 embriões viáveis. As éguas tratadas com EPE (n=14) apresentaram 36 ovulações sendo que destas



foram recuperados 27 embriões. A taxa de recuperação embrionária por ovulação nas éguas tratadas com EPE foi de 75% (27/36) contra 56,25% (9/16) do grupo controle (n=14) e 88,23% (15/17) no grupo pós EPE (n=13).

A taxa de recuperação não foi influenciada pelo ano e pelo número de ovulações ( $p>0,05$ ). As éguas da raça QM (n=8) que foram superovuladas apresentaram taxa de recuperação embrionária de 56,25% (9 embriões/16 ovulações). Já as éguas da raça Crioula (n=6) que foram superovuladas a taxa de recuperação embrionária foi de 90% (18 embriões/ 20 ovulações).

Ao analisarmos a recuperação embrionária associando os dados de produção obtidos das raças QM e Crioula verificamos que as éguas tratadas com EPE apresentaram um aumento no número de embriões recuperados (1,92 embriões), quando comparado ao controle (0,64 embriões;  $p=0,0009$ ). Porém esta diferença não se mantém quando comparamos com as éguas do ciclo pós-EPE (não tratadas) apresentando produção embrionária similar tanto as éguas EPE quanto controle (1,15 embriões; ver Tabela 4).

Tabela 4 – Taxa de recuperação embrionária no grupo controle, EPE e pós-EPE com dados agrupados (Quarto de Milha + Crioula)

<b>TRATAMENTOS</b>	<b>NÚMERO DE EMBRIÕES</b>
EPE	1,92 <sup>a</sup>
Pós-EPE	1,15 <sup>ab</sup>
Controle	0,64 <sup>b</sup>

Letras a,b demonstram diferença estatística na coluna  $P=0,0009$

Os diferentes tratamentos, não influenciaram ( $p<0,05$ ) na recuperação embrionária na raça QM, sendo recuperados  $0,5\pm0,5$ ;  $1,1\pm0,8$  e  $1,2\pm0,4$  embriões nos grupos Controle, EPE e Pós-EPE, respectivamente. Contudo, na raça Crioula o grupo EPE apresentou maior número de embriões recuperados em relação aos demais tratamentos. As éguas Crioulas tratadas com EPE tiveram uma média de  $3,0\pm2,0$  embriões recuperados por coleta, já nos grupos Pós-EPE e Controle o número de embriões recuperados foi  $1,0\pm0,6$  e  $0,8\pm0,4$  embrião, respectivamente (ver Tabela 5).

Tabela 5 – Número de embriões recuperados no grupo controle, EPE e pós-EPE na raça Quarto de Milha e Crioula.

	<b>QUARTO DE MILHA</b>	<b>CRIOULA</b>
<b>Controle</b>	0,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>EPE</b>	1,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	3,0 ± 2,0 <sup>a</sup>
<b>Pós- EPE</b>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,6 <sup>b</sup>

a,b letras diferentes entre linhas e colunas demonstram diferença estatística

p<0,05

### 3.3.5 Estágio e qualidade dos embriões

O ano não influenciou na produção de embriões (p>0,05). O estágio de desenvolvimento e a qualidade embrionária não influenciaram as variáveis analisadas. Os embriões coletados encontravam-se em estágio de blastocisto inicial, blastocisto e/ou blastocisto expandido, apresentando desenvolvimento condizente com o dia da ovulação e coleta (ver Figura 4). Ao avaliar a viabilidade e qualidade dos embriões recuperados verificou-se que 90,4% dos embriões foram classificados com grau 1 de qualidade, o restante (9,6%) apresentava classificação de grau 2.

Figura 4 - Embriões recuperados de égua Crioula submetida ao tratamento com EPE.



Fonte: Produção do próprio autor.

### 3.4 DISCUSSÃO

A dose de 7 mg (b.i.d) de EPE, mostrou-se eficiente em promover múltiplas ovulações, pois verificou-se que 92,9% (13/14) das éguas responderam ao tratamento superovulatório. Bonin et al. (2010) com a mesma dose obteve 65% (13/20) dos animais superovulados. Farinasso (2004) relata que 76,9% (10/13) dos animais responderam ao tratamento superovulatório com dose de 6 mg de EPE uma vez ao dia, porém valores mais baixos na resposta superovulatória como 30,8% (4/13) foram encontrados por Rocha Filho (2005) quando utilizou dose de 4 mg de EPE. Esta grande variação na responsividade ao tratamento pode estar relacionada aos diferentes preparados hormonais, pois não se tem uma padronização do hormônio utilizado, sendo este um pool de glândulas pituitárias, ocorrendo provavelmente variação na proporção FSH:LH dos preparados (CARMO, 2003).

Os resultados obtidos com as éguas da raça Crioula demonstram que houve diferença estatística no número de ovulações ( $1,16 \pm 0,40$ ;  $3,33 \pm 2,06$  - controle e EPE, respectivamente) quando comparamos com as éguas da raça QM ( $1,12 \pm 0,35$ ;  $2,00 \pm 0,53$  - controle e EPE respectivamente). Pesquisas tem demonstrado que o efeito da

resposta ovariana é dose dependente, ou seja, o aumento da dose de EPE promove uma maior estimulação ovariana (ALVARENGA et al., 2001; CARMO et al., 2006). Tais autores utilizaram doses de 12,5 a 50mg, uma ou duas vezes ao dia e relacionam as maiores doses com maior número de ovulações. Se analisarmos a dose com relação ao peso, observa-se que as éguas Crioulas (peso médio de 345 kg) receberam uma dose por peso maior que as éguas QM (peso médio de 532,5 kg). Bonin et al. (2010) em éguas QM com peso entre 450 a 550 kg obtiveram em média 1,8 ovulações. Mais estudos devem ser realizados para verificar se a melhor resposta superovulatória na raça Crioula está realmente ligada a maior dose recebida em relação ao peso.

A grande incógnita no processo da superovulação na espécie equina tem sido a baixa taxa na recuperação embrionária. As características do ovário da égua (fossa de ovulação) e o infundíbulo (pequeno em relação ao ovário) fazem com que as dificuldades sejam maiores (ALVARENGA et al., 2001). Squires e McCue (2007) relatam que se a dose superovulatória é muito grande, o ovário torna-se excessivamente estimulado e muitos dos folículos não ovulam, luteinizando. Geralmente, se uma égua tem mais de cinco ovulações, a recuperação de embriões por ovulação é menor. Quando se utiliza uma baixa dose de EPE, não ocorre um estímulo excessivo, permitindo que se obtenha uma melhor taxa de recuperação embrionária. Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que com o uso da baixa dose hormonal as taxas de recuperação embrionária aumentam consideravelmente, permitindo que pelo menos um embrião seja recuperado por coleta. Foram coletados 27 embriões de 36 ovulações (14 éguas superovuladas com EPE), representando uma taxa de recuperação embrionária/ovulação de 75%. Os resultados demonstram ainda que não houve falha na ovulação, pois todos os folículos pré-ovulatórios responderam à indução da ovulação com hCG.

Das 8 éguas QM superovuladas foram obtidos 9 embriões de 16 ovulações (56,25%), e das 6 éguas Crioulas superovuladas foram obtidos 18 embriões de 20 ovulações (90%). Carmo (2003) obteve valores médios de 4,25 ovulações e 1,5 embriões por égua (35,29%) obtidos nos tratamentos superovulatórios dos dois protocolos estudados (dose constante – 25 mg b.i.d ; e dose decrescente – 40-10mg b.i.d), verificou ainda que o EPE superestimulou com eficiência a atividade ovariana em éguas cíclicas, apresentando entretanto, baixas taxas de recuperação embrionária. Scoggin et al. (2002) relataram um percentual de embriões recuperados de 60%

utilizando EPE (12,5 mg b.i.d). Alvarenga et al. (2001) observaram um percentual de 69% e 49% de embriões recuperados por ovulação quando administradas 25 mg uma e duas vezes ao dia respectivamente, com uma média de 7,1 ovulações e 3,5 embriões por égua. Bonin et al. (2010) observaram uma taxa de recuperação embrionária por ovulação de 60% no grupo tratado contra 40% no grupo controle. Farinasso (2004) utilizando uma dose de 6 mg de EPE obteve média de  $1,31 \pm 0,75$  embriões por ciclo, com uma taxa de recuperação embrionária por ovulação de 70,8%. Quando analisamos os resultados agrupados no presente trabalho (QM+Crioula taxa de recuperação 75% embrião/ovulação) verificamos que são ligeiramente superiores aos demais trabalhos relatados. Se repetirmos esta análise observando isoladamente as raças observamos uma superioridade numérica da raça Crioula (90%) em relação a QM (56,25%).

Squires & McCue (2007) afirmam que éguas com duas a quatro ovulações geralmente têm uma recuperação de 50% de embriões por ovulação. Resultados semelhantes foram observados dentre os grupos testados com as éguas da raça QM. Demonstrou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $0,5 \pm 0,5$ ;  $1,1 \pm 0,8$  controle e EPE respectivamente), mas pode-se observar que o tratamento com EPE permite que pelo menos um embrião seja recuperado por coleta. Gimenes (2010) em estudo observou que embora o número de embriões por ovulação tenha se mantido similar entre os grupos tratados, resultou no dobro de embriões recuperados por coleta em relação ao controle, demonstrando o benefício do tratamento preconizado. Esses protocolos de indução de ovulações múltiplas com baixas doses hormonais propiciam a recuperação de um embrião em média por lavado, o que já torna viável e interessante a aplicação comercial dos mesmos.

No presente trabalho verificou-se que o ciclo Pós- EPE não apresentou diferença estatística do ciclo Controle, mas mostrou tendência a uma melhor resposta tanto em ovulações duplas (1,14 controle; 1,30 Pós-EPE – QM + Crioulas), quanto na recuperação embrionária ( $0,5 \pm 0,5$  controle;  $1,2 \pm 0,4$  Pós-EPE– QM e  $0,8 \pm 0,4$  controle;  $1 \pm 0,6$  Pós-EPE– Crioulas). Quando avaliamos os dados agrupados (QM+Crioula), verificamos que a taxa de recuperação embrionária por ovulação no grupo Pós-EPE foi de 88,23% (15/17). Esta taxa mostrou-se numericamente superior ao controle 56,25 (9/16) e grupo EPE 75% (27/36). Bonin et al. (2010) observando o ciclo pós-tratamento, não observou diferença. Carmo (2003) também afirma que

os períodos do ciclo estral correspondentes ao pós-tratamento superovulatório não sofreram interferência do tratamento superovulatório com EPE. Beg & Ginther (2006) afirmam que a divergência é precedida por uma fase de crescimento comum de vários dias. Durante esta fase, os folículos crescem a uma taxa semelhante e cada folículo tem a capacidade para a futura dominância. McKinnon & Voss (1993) relatam que os folículos da fase antral se desenvolvem na ausência dos hormônios gonadotróficos, mas existe alguma evidência, no entanto, que a taxa de crescimento de folículos pré-antrais pode ser acelerada por gonadotrofinas. Em éguas tem sido hipotetizado que os folículos podem crescer tanto quanto 2 mm com suporte de gonadotrofinas. Suspeita-se que a aplicação do EPE pode estar interferindo nesta fase de crescimento comum, ocorrendo uma interferência no ciclo posterior ao tratamento. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para afirmar se ocorre uma influência do tratamento superovulatório no ciclo posterior ou foi resultado de fatores individuais.

Não houve diferença significativa no estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária dentro de nenhuma das variáveis. Os embriões recuperados encontravam-se em fase de desenvolvimento condizente com a data da coleta, indicando que baixa dose de EPE, não compromete a maturação ovocitária. Bonin et al. (2010) em experimento verificaram que em éguas velhas não houve atraso no desenvolvimento embrionário dos embriões recuperados das éguas tratadas com EPE, quando comparados aos embriões recuperados do grupo controle. O tratamento interferiu positivamente na dinâmica de crescimento do folículo dominante propiciando a recuperação de embriões em fase correta de desenvolvimento e melhorando a eficiência reprodutiva. No presente estudo os embriões apresentavam boa viabilidade e qualidade, fato este também observado por diversos pesquisadores (ALVARENGA et al., 2001; PERES et al., 2007; MACHADO, 2004).

A velocidade de crescimento folicular foi menor nas éguas da raça Crioula (folículo cresceu média de 2,39 mm / dia), quando comparado às éguas da raça QM (2,87 mm / dia). Machado (2004) observou uma taxa de crescimento folicular nos grupos tratados com EPE de 2,2mm / dia. Segundo Ginther et al. (2008) a partir da divergência, o folículo pré-ovulatório cresce a uma taxa média diária de 3 mm, um crescimento contínuo ocorre até 2 dias antes da ovulação, quando o tamanho folicular atinge um patamar de cerca de 40

milímetros. Taxas de crescimento folicular semelhantes foram observadas nos ciclos Controle e Pós-EPE com 3,08; 2,89 mm nas éguas Crioulas e 3,49; 3,35 mm nas éguas QM, respectivamente.

Dessa forma, o período de crescimento dos folículos até a ovulação foi diferente ( $p < 0,01$ ) entre as raças estudadas, apresentando uma média de desenvolvimento de 10,1 e 7,7 dias para as Crioulas e QM, respectivamente. Em experimento Dimmick et al. (1993) avaliando a dinâmica folicular e a duração do estro em éguas da raça Quarto de Milha e da raça Árabe, demonstraram diferenças entre as raças. Dentre os parâmetros avaliados, verificaram que a raça Árabe apresentou um estro mais longo ( $6,2 \pm 0,4$  dias) com relação às éguas da raça QM ( $4,9 \pm 0,38$  dias). Mais estudos devem ser realizados para uma melhor identificação de características fisiológicas relacionadas a raça Crioula.

A duração média do tratamento com EPE foi de 6,1 e 4,7 dias para as éguas da raça Crioula e Quarto de Milha, respectivamente ( $p < 0,01$ ). Esta diferença provavelmente reflete a taxa de crescimento folicular diferenciada observada nas raças.

Os tratamentos convencionais que utilizam uma ou duas doses diárias de 12,5 a 50 mg de EPE e iniciam o tratamento no 5° ou 7° dias após a ovulação (ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002) acabam tornando-se protocolos longos, caros e com baixa aplicabilidade. Isto se deve ao tempo médio de aplicações que neste caso acaba sendo em média de 8 a 10 dias. O protocolo utilizado no presente trabalho teve como vantagem a diminuição do número de aplicações e posteriormente a redução dos custos com o hormônio utilizado. A redução na duração do tratamento superovulatório ocorreu devido ao momento inicial do protocolo, onde as aplicações somente iniciaram quando foram visualizados folículos de 20 mm nos ovários. Esta conduta de trabalho propiciou com que houvesse uma diminuição no tempo (dias) de aplicação do EPE. Resultados semelhantes foram observados por Gimenes (2010), que relatou média de 4 dias para éguas tratadas com EPE desde que o protocolo fosse iniciado quando os folículos estivessem com diâmetro entre 20 a 23 mm.

### 3.5 CONCLUSÃO

A taxa de crescimento folicular observada nos animais tratados com EPE foi similar a dos animais não tratados, aproximando-se das condições fisiológicas.

O tratamento com EPE na dose de 7 mg b.i.d mostrou-se efetivo, aumentando a incidência de ovulações múltiplas em éguas.

Nas éguas Crioulas observou-se uma melhor resposta superovulatória e taxa de recuperação embrionária comparado com as éguas da raça QM.

As éguas mantiveram a atividade cíclica ovariana após a suspensão do tratamento com EPE, indicando que o tratamento superovulatório não interfere negativamente nos ciclos subsequentes.



## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A. et al. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v. 56, p. 879-687. 2001.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 220–228. 2011.
- BAE, S. E.; WATSON, E. D. A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 60, p. 909–921. 2003.
- BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, p. 365–377. 2006.
- BERGFELT, D. R. et al. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.11, p. 319–322. 1991.
- BLANCHARD, T. L. et al. **Manual of equine reproduction**. 2 ed. Philadelphia: Mosby. 2003. 253 p.
- BONIN, B. F. et al. Efeito do tratamento com extrato de pituitária equina na resposta ovariana e eficiência de éguas idosas em programa de transferência de embriões. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 94-103. 2010.
- CARMO, M. T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003, 156 f. (Dissertação de Mestrado).
- CARMO, M. T. et al. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 337–339. 2006.
- CULLINGFORD, E. L. et al. Attempts at superovulation of mares with porcine follicle stimulating hormone and recombinant equine follicle stimulating hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 6, p. 305-309. 2010.

DAVIES MOREL, M.C.G. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. 2 ed. New York, USA: CABI Publishing. 2003. 357p.

DIMMICK, M. A.; GIMENEZ, T.; SCHLANGER, R. L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian vs. Quarter Horse mares. **Animal Reproduction Science**, v. 31, p. 123-129. 1993.

DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. **Biology of reproduction**, v. 66, p. 1111–1118. 2002.

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

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

GIMENES, A.M. **Resposta ovariana em éguas tratadas com baixa dose de extrato de pituitária equina (EPE)**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2010, 74 f. (Dissertação de Mestrado).

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 61–79. 2000.

GINTHER, O. J. et al. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p .45-63. 2004.

GINTHER, O.J. et al. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology Reproduction**, v. 73, p. 315–323. 2005.

GINTHER, O.J. et al. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 454–460. 2008.

GINTHER, O.J. et al. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating  $17\beta$ -estradiol at the time of ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 178–182. 2010.

IGNACIO, F. S. **Resposta ovariana e taxa de recuperação embrionária em éguas tratadas com FSH suíno**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2009, 86 f. (Dissertação de Mestrado).

MACHADO, M. S. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina e FSH equino purificado**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2004, 115 f. (Dissertação de Mestrado).

MACHADO, M. S. **Avaliação do perfil endócrino de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária e FSH equino purificado**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2008, 129 f. (Tese de Doutorado).

McKINNON, A.O. et al. Increased ovulation rates in mares after immunization against recombinant bovine inhibin (-subunit). **Equine Veterinary Journal**, v.24, p.144-146, 1992.

McKINNON, A.O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. 1137 p.

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

NEELY, D. P.; KIU, I. K.; HILLMAN, R. B. **Reproducción equina**. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur. 1988. 166p.

NISWENDER, K. D. et al. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, n. 11, p. 497-500. 2003.

PERES, K. R. et al. Análise da viabilidade e da ultra-estrutura de embriões obtidos de éguas superovuladas. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.1, jun., p. 52-61. 2007.

REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. São Paulo: Roca. 1996. 351p.

ROCHA FILHO, A. N. **Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária ou FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2005, 70 f. (Dissertação de Mestrado).

SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia, USA: W.B. Sanders Company. 2000.

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction**. USA:Saunders Elsevier. 2007. 494 p.

SCOGGIN, C. F. et al. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 151-164. 2002.

SQUIRES, E. L. et al. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151-170. 2003.

SQUIRES, E. L. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n.5, p. 268- 273. 2009.

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

SQUIRES, E. L. Superovulation in mares. **Veterinary Clinical Equine**, v. 22, p. 819–830. 2006.

STROUD, B. **IETS 2011 Statistics and data retrieval committee report:** The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestical farm animals. [Denver]: IETS, 2011. 13p. Disponível em: <<http://www.iets.org/pdf/December2011.pdf>> Acesso em: 27 de maio de 2013.