

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**MARIO DE FREITAS ITHO**

**USO DE BAIXAS DOSES DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA E  
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (SOMATOTROFINA) NA INDUÇÃO  
DO ESTRO EM ÉGUAS EM ANESTRO**

**Campos dos Goitacazes - RJ**

**Fevereiro - 2010**

**MARIO DE FREITAS ITHO**

**USO DE BAIXAS DOSES DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA E HORMÔNIO  
DE CRESCIMENTO (SOMATOTROFINA) NA INDUÇÃO DO ESTRO EM ÉGUAS  
EM ANESTRO**

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Ciências e Tecnologias Agropecuárias  
da Universidade Estadual Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Animais, na Área  
de Concentração em Biotecnologia da  
Reprodução.**

**Orientador: Prof. José Frederico Straggiotti Silva**

**Campos dos Goytacazes**

**2010**

**MARIO DE FREITAS ITHO**

**USO DE BAIXAS DOSES DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQÜINA E HORMÔNIO  
DE CRESCIMENTO (SOMATOTROFINA) NA INDUÇÃO DO ESTRO EM ÉGUAS  
EM ANESTRO**

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Ciências e Tecnologias Agropecuárias  
da Universidade Estadual Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Animais, na Área  
de Concentração em Biotecnologia da  
Reprodução.**

Aprovada em 12 de fevereiro de 2010.

Banca examinadora

---

Prof<sup>o</sup> Eduardo Shimoda (Doutor, Produção Animal) - Universidade Cândido Mendes

---

Dr. José Renato Costa Caiado (Doutor, Produção Animal) – UENF

---

Prof<sup>o</sup> Bruno Fagundes (Doutor, Produção Animal) – UNIG

---

Prof<sup>o</sup> José Frederico Straggiotti Silva (Doutor, Medicina Veterinária) - UENF  
(Orientador)

Aos meus pais, Itho e Sony, pelo exemplo de honestidade, inteligência, humildade,  
esforço, persistência e carinho;

Aos meus filhos, Luisa e João, por me fazer querer ser um exemplo;

À minha esposa, Isabel, sem ela nada disso seria possível; pela paciência;

Aos animais, que traçaram o rumo que dei à minha vida.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias – CCTA, pela oportunidade e acolhimento recebido;

Ao professor orientador José Frederico Straggiotti Silva, pela humildade, mesmo sendo um excelente profissional, professor e orientador, se mostra uma pessoa tão acessível e amiga;

Ao amigo Marcelo Vivaqua, por ter me apresentado este meio, que me fez realizado;

Aos parceiros José Renato Costa Caiado, Bruno Fagundes e Marcus Barreto por compartilharem comigo experiências sempre de grande valor;

Ao Prof. Eduardo Shimoda, pela facilidade de acesso e clareza;

A Capes pelo auxílio tão fundamental para conclusão deste curso;

Aos funcionários e tratadores dos Haras, pelo apoio em todas as horas;

E em especial à minha esposa, Isabel, por fazer possível a realização deste trabalho.

**Muito Obrigado**

*Animais são livres por sua ignorância.  
Humanos são acorrentados pela ignorância.*

Vine

## BIOGRAFIA

MARIO DE FREITAS ITHO, filho de Hécio Aparecido Itho e Sony de Freitas Itho, nasceu em 3 de setembro de 1979, na cidade de Vitória – ES.

Em 1997, mudou-se para Itaboraí – RJ, para iniciar o curso de Medicina Veterinária na Faculdade Plínio Leite.

Em 2000, transferiu-se para Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica – RJ, onde concluiu o curso em 2002.

Trabalhou no campo como autônomo durante sete anos atuando como Médico veterinário, responsável pela reprodução, realizando processos de Transferência de embriões, na região do Estado do Espírito Santo.

Em março de 2009, ingressou no curso de Mestrado em Ciências Animais da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se aos exames finais da defesa de dissertação em fevereiro de 2010.

## RESUMO

ITHO, MARIO FREITAS, M. SC., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. FEVEREIRO de 2010. **USO DE BAIXAS DOSES DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQÜINA E HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (SOMATOTROFINA) NA INDUÇÃO DO ESTRO EM ÉGUAS EM ANESTRO.**

Orientador: Prof. José Frederico Straggiotti Silva.

Este experimento foi conduzido com o objetivo de induzir o estro e a ovulação em éguas doadoras de embriões da raça Mangalarga Marchador que encontravam-se em anestro durante o período de estação de monta, com o uso de baixas doses de extrato de pituitária eqüina e hormônio de crescimento. Foram submetidos aos protocolos, 12 animais, dos quais 6 foram utilizados 2 vezes, totalizando 18 tratamentos. Estes animais foram inicialmente tratados como grupo controle, isto é, receberam 2 doses de PGF2 $\alpha$  e soro fisiológico durante oito dias consecutivos. Após este procedimento com a confirmação da manutenção do estado de anestro, esses mesmos animais foram submetidos ao protocolo de tratamento. O tratamento consistiu na administração de 6 mg de EPE e 6 mg de GH por via intramuscular, diariamente às 11 horas da manhã. A administração foi mantida por oito ou mais dias, sendo interrompida quando um ou mais folículos apresentaram tamanho de no mínimo 35 mm de diâmetro e quando houve presença de edema uterino. Induziu-se a ovulação com hCG 2500 UI, por via endovenosa. O resultado obtido neste experimento foi de 72,2 % de eficiência. De 18 animais submetidos aos tratamentos, 13 apresentaram crescimento folicular, melhora de tônus uterino e início de formação de edema e ovulação. Este resultado mostrou que o protocolo estabelecido no presente trabalho foi eficiente, podendo ser utilizado em um programa de transferência de embriões. Por serem utilizadas baixas doses, o seu custo benefício é compensador.

Palavras-chave: eqüinos, reprodução, transferência de embriões, indução do estro.

## ABSTRACT

ITHO, MARIO FREITAS, M. SC., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. FEBRUARY 2010. **USE OF LOW DOSES OF EQUINE PITUITARY EXTRACT AND GROWTH HORMONE (SOMATOTROPIN) IN THE INDUCTION OF ESTRUS IN MARES IN ANESTRUS.**

Professor Adviser: Prof. José Frederico Straggiotti Silva.

This experiment was conducted with the aim of inducing estrus and ovulation in Mangalarga Marchador embryo donors mares that were anestrous during the breeding season with the use of low doses of EPE and GH. Twelve animals were used of which six were used two times, totaling eighteen treatments. These animals were treated as control group, receiving two doses of PGF2 $\alpha$  and saline for eight consecutive days. After this procedure with confirmation of maintaining a state of anestrous, these animals were subjected to the treatment protocol. The treatment consisted of administration of 6 mg of EPE and 6 mg of GH intramuscularly daily at 11:00 AM. The administration was continued for eight or more days, being interrupted when one or more follicles had a minimum size of 35 mm in diameter and when there was a uterine edema, ovulation was induced with hCG 2500 UI intravenously. The result of this experiment was 72.2% efficiency, in eighteen animals submitted to treatment, thirteen had follicular growth, improvement of uterine tone and early edema formation and ovulation. This result showed that the protocol outlined in this work was efficient and can be used in a program of embryo transfer and, as low doses are used, their cost is not as expensive.

Key- words: equine, reproduction, embryo transfer, induction of estrus.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1-Fisiologia do ciclo estral.....	14
2.2 -Foliculogênese.....	16
2.3-Transferência de embriões.....	19
2.4-Extrato de pituitária eqüina.....	20
2.5-Hormônio de crescimento.....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1- Período e local do experimento.....	28
3.2- Éguas.....	28
3.3 -Exame admissional.....	29
3.3.1- Cadastramento dos animais.....	29
3.3.2- Avaliação do trato reprodutivo por ultrassonografia.....	29
3.4 -Modelo experimental.....	29
3.5- Garanhão.....	30
3.6- Inseminação Artificial.....	31
3.7 -Monitoramento da dinâmica folicular.....	31
3.8 -Descrição do Protocolo.....	31
3.9 -Preparo e estocagem do material.....	32
3.10 -Transferência de embriões.....	32
3.11- Análise estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento significativo na prestação de serviços, na comercialização e no número de criadores envolvidos no setor de eqüideocultura. Esse incremento na indústria eqüina está ocorrendo devido à recuperação da economia brasileira e principalmente devido ao desenvolvimento e à utilização de novas biotécnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial com sêmen refrigerado e transportado, sêmen congelado e transferência de embriões.

Outro aspecto responsável por esse aumento se deve à aquisição de animais de diferentes raças por criadores brasileiros nas últimas três décadas, aumentando o potencial genético do nosso plantel, colocando o Brasil em um patamar elevado em termos de criação de eqüinos.

Assim, com o desenvolvimento da equideocultura, as biotécnicas de reprodução vêm sendo testadas e aperfeiçoadas com o intuito de melhorar e aumentar os índices reprodutivos das éguas.

Pelo fato das éguas apresentarem estro geralmente apenas em uma determinada época do ano, as técnicas de reprodução e melhoramento genético nos eqüinos visam, além de obter indivíduos geneticamente superiores, aumentar o número de produtos por égua, durante a estação de monta.

Assim como a inseminação artificial, a técnica de transferência de embriões tem se consagrado como importante ferramenta para melhoramento genético no rebanho eqüino. O primeiro resultado de sucesso da técnica, ocorreu em 1974, quando pesquisadores japoneses, OGURI e TSUTSUMI, obtiveram o nascimento de 6 potros de um total de 15 embriões transferidos, através de técnica não cirúrgica.

No Brasil, a transferência de embriões (TE) foi introduzida em 1987 por FLEURY, e com a aceitação da técnica pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Mangalarga Marchador, as pesquisas em relação à técnica foram motivadas e desenvolvidas.

Desde então, os criadores brasileiros de eqüinos têm usado o procedimento de transferência de embriões (TE) cada vez mais, fazendo com que no ano de 2003, segundo CARMO e ALVARENGA (2003), o país fosse considerado o que mais realizou transferência de embriões. Porém, com a aceitação da técnica pela

“*American Quarter Horse Association*”, os Estados Unidos passaram a liderar como país que mais realiza transferências anuais de embriões (SOUSA, 2006).

Nos últimos anos não ocorreram significativas alterações na técnica empregada para coleta, avaliação, processamento e inóculo dos embriões, tendo os estudos se concentrado na hormonioterapia aplicada à TE. O emprego dos hormônios reprodutivos tem objetivado principalmente o aumento da disponibilidade do número de receptoras por meio da suplementação com Progesterona (P4), aumentando o intervalo de utilização das mesmas (CAIADO, 2004) e dos indutores de ovulação, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e a Deslorelina (análogo sintético do GnRh) (DOUGLAS, 1974), favorecendo a sincronização entre doadora e receptoras.

Tanto a inseminação artificial (IA), como a TE, apesar de auxiliarem no processo reprodutivo de animais com patologias, em certos casos, não são suficientes. Éguas que se encontram em anestro, mesmo durante a estação de monta, não são animais aptos a um programa de IA e TE. Para estes animais não serem descartados, estudos vêm sendo realizados com o uso de hormônios para induzir a ovulação em éguas que se encontram em anestro.

O extrato de pituitária eqüina (EPE) vem sendo utilizado com sucesso em vários estudos com o objetivo de promover a superovulação em éguas (DOUGLAS, 1974 e 1979; LAPIN & GINTHER, 1977; WOODS & GINTHER, 1983; ALVARENGA *et al.*, 1999 e 2001), aumentando o número de embriões coletados. Segundo RAMOS (2005), a superovulação consiste em fazer ovular vários folículos de uma mesma onda de crescimento folicular que normalmente estariam em crescimento ou em atresia, através de hormônios.

Trabalhos recentes têm demonstrado que a utilização de doses reduzidas do EPE vem apresentando resultados satisfatórios no estímulo ovariano quando comparado àquelas normalmente utilizadas nos protocolos superovulatórios (FARINASSO, 2004; ROCHA *et al.*, 2005).

Recentemente, o papel do hormônio de crescimento (somatotrofina ou GH) na dinâmica folicular e nas funções reprodutivas normais tem sido tema de interesse e alvo de intensas investigações em várias espécies mamíferas. Foi bem documentado que a administração exógena de GH aumenta o número de folículos em ovários de porcas (ECHTERNKAMP, 1994), vacas (GONG *et al.*, 1991) e

mulheres (HUGUES *et al.*, 1991).

O mecanismo exato por meio do qual o GH afeta a população folicular ovariana ainda não está bem estabelecido. Entretanto, sua habilidade em estimular o fígado para a produção de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) levando ao aumento nas concentrações sistêmicas deste hormônio, sugere que o mesmo desempenhe um papel importante neste mecanismo (HOMBURG *et al.*, 1988).

Recentes observações indicaram que o GH e IGF-1 promovem aumento da população de folículos antrais, melhora da maturação oocitária e o aumento de embriões transferíveis de animais superovulados. Além disso, auxiliam no desenvolvimento nos estágios embrionários iniciais e aumentam as taxas de prenhez em vacas superovuladas quando utilizados de forma exógena (GOMES, 2004).

Este experimento teve como objetivo induzir o estro em éguas doadoras de embriões em anestro pelo uso de EPE e GH em baixas doses. Simultaneamente, avaliou-se a duração do período de estro, os índices de recuperação embrionária e de gestação e se houve aumento do número de folículos maduros e de ovulações múltiplas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Fisiologia do ciclo estral

O ciclo estral é definido como o período entre duas ovulações consecutivas, acompanhadas por sinais de estro e/ou concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 1ng/mL (HUGHES *et al.*, 1975, HUGHES, *et al.*, 1980) . Pode ser dividido em duas fases: uma folicular ou de estro caracterizada pela receptividade sexual, crescimento folicular e maior secreção de estrógeno; outra luteal ou de diestro, que inicia logo após a ovulação e se caracteriza por uma ativa resistência ao ganhão e formação de corpo lúteo, com maior secreção de progesterona (HUGHES *et al.*, 1972, ALLEN, 1977, ROOSDALE, & RICKETTS, 1980).

A espécie eqüina tem como característica reprodutiva o comportamento poliéstrico estacional e, no período de 12 meses, apresenta distintas fases quanto ao ciclo reprodutivo (GINTHER, 1974). Sabe-se que há variação sazonal do ciclo estral em éguas, mas que nem todas entram em anestro estacional no inverno (GINTHER, 1974). No entanto, a maioria entra em anestro durante o período anual em que os dias encontram-se mais curtos, com menor quantidade de luminosidade, isto é, no outono e inverno. A teoria corrente para a inatividade invernal na égua, se baseia no fato que, quando o comprimento do dia diminui, a produção de melatonina pela glândula pineal aumenta, e este aumento leva a um decréscimo na produção e secreção de GnRH pelo hipotálamo (McKINNON e VOSS, 1993).

Entre os fatores que determinam a atividade sexual sazonal, pode-se destacar o fotoperíodo (relação luz/escuro) e a sua interação com os fatores ambientais que, de alguma maneira, estabelecem as condições nutricionais das éguas. Embora exista uma estreita relação entre o aumento da duração da luminosidade diária durante os meses de primavera e verão, e uma proporcional ativação dos mecanismos envolvidos na atividade reprodutiva, em diferentes latitudes, a condição nutricional das fêmeas tem uma importante participação na manifestação e regularidade dos ciclos estrais (TAROUCO, 2006).

Éguas em boa condição corporal e com disponibilidade de alimento, criadas

em regiões próximas à Linha do Equador (menor latitude), onde há pouca variação do fotoperíodo, tendem a ciclar durante todo o ano (poliéstricas anuais). Portanto, nestas regiões, o fator nutricional passaria a ser relevante. Se estas mesmas éguas fossem transferidas para locais de maiores latitudes e, por conseguinte, com variações na duração do número de horas-luz nas diferentes estações do ano, provavelmente, passariam a ter um comportamento reprodutivo sazonal (poliéstricas estacionais) (TAROUCO, 2006).

O ciclo reprodutivo pode ser definido em duas estações: ovulatória e anovulatória, interligadas por períodos denominados transicionais de primavera e outono. Durante a estação ovulatória, que corresponde aos meses do final da primavera e verão, as éguas ciclam em intervalos regulares. Em pôneis, estas estações são mais rigidamente definidas, enquanto que em outras raças a estação ovulatória é mais longa e um maior número de fêmeas poderá ovular durante todo o ano (WESSON e GINTHER, 1981). As taxas de ovulação aumentam na primavera, paralelamente ao aumento do fotoperíodo, com incidências máximas durante o verão. A diminuição da duração de horas-luz precede a baixa incidência de ovulações durante o outono e o inverno (GINTHER, 1992).

Os intervalos entre os ciclos estrais e a duração do estro sofrem variações de acordo com a época do ano em que são observados. Normalmente, a duração do estro ovulatório é significativamente menor nos meses de verão em relação aos de outono, inverno e início da primavera. Dados da literatura relatam uma duração média da fase de estro de 6,5 dias, de diestro de 14,9 e do ciclo estral de 21,7 dias (GINTHER, 1992). A estação anovulatória geralmente ocorre durante o inverno e início da primavera, com uma duração variável de 40 dias a 8 meses (HUGHES *et al.*, 1972). Este período compreende os meses do ano nos quais menos de 25% das éguas ovulam e menos de 10% permitem a monta do garanhão, sendo que 19,9% ficam indiferentes à sua presença (SHARP, 1980). As éguas permanecem em anestro com pouca ou nenhuma atividade folicular detectável pela palpação retal, ovários pequenos, conseqüentes da queda estacional da estimulação gonadotrófica, sugerindo produção estrogênica mínima (TAROUCO, 1995).

Com o aumento do fotoperíodo, a atividade antigonadal diminui e a liberação das gonadotrofinas se inicia proporcionalmente. Essa mudança gradual resulta em manifestações "transicionais" caracterizadas pela formação de múltiplos pequenos

folículos e a ocorrência de ciclos prolongados, onde o grau de receptividade sexual varia até o estro ser evidente (HUGHES *et al.*, 1980). O período transicional de primavera, no Hemisfério Norte, inicia no final do inverno e culmina com a primeira ovulação do ano que ocorre no final de março e início de abril (SHARP, 1980). No Hemisfério Sul, foi observada uma fase transicional na atividade ovariana, durante a primavera, quando estros anovulatórios comumente ocorriam (OSBORNE, 1966). Um estudo encontrou um nítido aumento de peso nos ovários de julho a agosto, enquanto que a taxa ovulatória ainda estava em declínio, para somente sofrer um acréscimo no mês de setembro; este período foi caracterizado como o transicional de primavera, onde ocorreu um aumento do número e diâmetro de folículos, refletindo no aumento de peso dos ovários, sem a ocorrência de ovulação (TAROUCO *et al.*, 1995).

## 2.2- Foliculogênese

A foliculogênese é o processo pelo qual folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para ovulação. O número de folículos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno, estima-se que aproximadamente 99% sofrem atresia (WEEB *et al.*, 1999; JOHNSON, 2003).

O desenvolvimento dos folículos pré-antrais pode ser dividido em três estágios: ativação de folículos primordiais, transição de folículo primário para secundário e desenvolvimento de folículos secundários até o estágio pré-antral (FORTUNE, 2003). Folículos primários e secundários são referidos coletivamente como folículos pré-antrais (PIERSON, 1993).

Com o desenvolvimento de estudos *in vitro* foi determinado que, o hormônio folículo estimulante (FSH), estimula o crescimento folicular e a formação do antro em folículos a partir de 140µm em camundongos (HARTSHORNE *et al.*, 1994). Em suínos, o FSH estimula o crescimento de folículos pré-antrais a partir de 200µm, porém não promove desenvolvimento do oócito (MAO *et al.*, 2002). Na espécie bovina, o FSH também foi eficiente na estimulação de folículos pré-antrais, aumentando em 55% a probabilidade de formação de antro, em associação com

fatores de crescimento (GUTIERREZ *et al.*, 2000). Os efeitos potenciais do LH ainda são pouco conhecidos, contudo WU *et al.* (2000) demonstraram que o desenvolvimento de folículos pré-antrais pequenos (85-100 $\mu$ m) em camundongos, ocorreu apenas na presença de LH, FSH e soro.

A relação do hormônio do crescimento (GH) é positiva no desenvolvimento de folículos pré-antrais médios. Sua ausência provoca uma grande redução no número de folículos >200 $\mu$ m de diâmetro (BACHELOT *et al.*, 2002), acarretando menor número de folículos pré-ovulatórios e reduzida taxa de ovulação (ZACZEK *et al.*, 2002). A deficiência em receptores para GH leva à redução dos níveis de fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) circulante. Contudo, BACHELOT *et al.* (2002) demonstraram que os efeitos do GH no crescimento folicular são independentes da ação do IGF-I. Em eqüinos, foi comprovado que a concentração de IGF-I é maior no futuro folículo dominante e a sua presença estimula a produção de estradiol. O IGF-I está envolvido no mecanismo de divergência do folículo dominante (GINTHER *et al.*, 2004).

Os esteróides atuam de forma positiva no desenvolvimento folicular pré-antral, incluindo ação em folículos primários. A presença de estradiol está relacionada ao crescimento das células da granulosa em tamanho, atuando em sinergismo com o FSH, que estimula a replicação dessas células (HULSHOF *et al.*, 1995).

Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro quando atingem 300 $\mu$ m de diâmetro, o qual é preenchido por um fluído viscoso composto por hormônios esteróides, principalmente estradiol, progesterona e inibina. O volume e a composição desse líquido modificam-se com o desenvolvimento folicular. Junto a esse processo ocorre a formação de uma bainha de células ao redor da granulosa, denominadas células da teca, que constituem duas camadas: a teca externa, composta basicamente por tecido conjuntivo; e a teca interna, constituindo a camada vascularizada interna. Ocorre nova proliferação das células da granulosa, as quais se organizam em várias camadas ao redor do oócito formando o “*cumulus oophorus*”. Os principais produtos secretados pelas células da teca são os andrógenos esteróides, enquanto as células da granulosa produzem estrógeno e inibina. Todos esses eventos marcam a transição de folículo secundário para terciário; o que inicia novo desenvolvimento até ser eleito à ovulação (HAFEZ,

1995).

Em espécies monovulatórias como a eqüina, usualmente, um único folículo emergirá da onda de crescimento folicular e chegará a folículo dominante (GINTHER, 2000). Durante a onda de crescimento folicular, vários folículos emergem e começam a crescer a uma taxa similar. Uma elevação dos níveis de FSH plasmático promove o recrutamento, ou seja, a continuidade do crescimento folicular. O maior folículo emerge em média um dia antes do segundo maior folículo. Em éguas, as concentrações de FSH iniciam seu declínio quando os folículos adquirem o diâmetro de 13mm. Neste momento, os dois folículos maiores crescem paralelamente (fase paralela). Ambos os folículos secretam inibina causando progressivo declínio da concentração de FSH, necessário para os seus próprios crescimentos. Quando o maior folículo atinge diâmetro de 22,5mm a fase paralela finaliza-se e inicia-se a fase de divergência folicular. A divergência caracteriza-se pela contínua taxa de crescimento do maior folículo, ou seja, folículo dominante (GINTHER, 2000). O futuro folículo dominante é apto a utilizar baixas concentrações de FSH para seu crescimento e desenvolvimento, devido a um aumento na expressão de receptores para FSH (WEEB *et al.*, 1999). Em bovinos e aparentemente em eqüinos, a expressão de receptores para LH é maior no “futuro” folículo dominante do que nos outros folículos antes da fase de divergência (GINTHER *et al.*, 2003). BODENSTEINER *et al.*(1996) também descreveram que a alteração na dependência gonadotrófica do folículo dominante é um dos fatores fundamentais para a seleção folicular. Além disso, existe a participação decisiva de fatores de crescimento produzidos localmente, no processo de seleção do folículo dominante (MONNIAUX *et al.*, 1997). Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), IGFs e suas proteínas ligantes (IGFBPs) são considerados os fatores mais importantes nessa fase.

Em éguas, antes da fase de divergência ocorre aumento de IGF-I. O estradiol, a inibina e a ativina aumentam apenas após a divergência ter iniciado, o que sugere que o fator intra-ovariano mais importante durante essa fase é o IGF-I (GINTHER *et al.*, 2003).

Os eventos que ocorrem durante a fase final de crescimento folicular podem ser divididos em três fases: recrutamento e seleção (crescimento de vários folículos antrais), dominância (ocorre crescimento maior de um único folículo) e ovulação ou

atresia (ovulação do folículo dominante e atresia dos demais) (CURSIO, 2005).

CORDEIRO (2008) citou que a taxa de ovulação dupla espontânea na raça Mangalarga Marchador foi de 8,4%.

### **2.3- Transferência de embriões**

Os trabalhos pioneiros em TE de eqüinos datam da década de 70 (IMEL *et al*, 1981). Porém, apenas a partir dos anos 80, resultados satisfatórios foram alcançados através do método não cirúrgico (TISCHNER, BIELANSKI, 1980; SALAZAR *et al*, 1980).

No Brasil, os trabalhos de transferência de embriões eqüinos (TEE) tiveram início em 1986, no estado de São Paulo, e foram realizados com sucesso na raça Mangalarga (FLEURY, 1998). Na raça Mangalarga Marchador a técnica foi reconhecida e aceita pelo seu Conselho Deliberativo Técnico em 1995, sendo a partir daí, muito utilizada (CAIADO, 2005).

Segundo o último levantamento da “*International Embryo Transfer Society*” (IETS), o Brasil contribuiu com aproximadamente 40% do total de transferências de embriões do ano de 2005. Além disso, é importante ressaltar que, em 2005, foram realizadas cerca de 25000 transferências a mais do que no ano de 2004, representando um aumento de 21,7% no mundo e 3,7% no Brasil. Esses dados são mais representativos se forem comparados em relação ao ano de 2003, sendo que a técnica cresceu 56,2% no país. Isto significa que a transferência de embriões na espécie eqüina ainda é uma técnica importante e em expansão, tanto em nível nacional, como mundial (PERES, 2008).

Dentre as vantagens da transferência de embriões, pode-se citar que ela permite aumentar o número de indivíduos geneticamente superiores, permite que potras com 2 anos de idade sejam usadas como doadoras, levando a diminuição do intervalo entre gerações e, conseqüentemente, aumentando a eficiência do melhoramento genético no plantel. A TE também permite a obtenção de gestações de éguas que se tornaram subférteis por problemas adquiridos, cuja causa não

tenha relação direta com a fertilização do oócito e seu transporte até o útero. Esta técnica promove ainda o melhor aproveitamento de éguas de alto valor zootécnico, idosas ou que estejam participando de competições hípicas (FLEURY *et al.*, 2007).

Outra característica da TE, é o fato dela possibilitar a preservação de linhagens em risco de extinção pela criopreservação, além de realizar o transporte de material genético sem o risco de contaminação por doenças. Por fim, a transferência de embriões, possibilitou aos criadores mais um produto para se obter lucro, com o comércio de embriões.

Vários são os fatores que podem interferir nos índices de prenhez após a TE. Entre aqueles de maior impacto podem ser citados a habilidade do técnico, a sincronia da ovulação entre doadora e receptora, a qualidade do sêmen utilizado, o grau de alterações patológicas do endométrio uterino de receptoras, a qualidade e idade dos embriões transferidos e a funcionalidade da glândula luteínica da receptora (ALVARENGA, 1999; FARINASSO, 2004 e CAIADO, 2005).

Tem sido utilizada por vários pesquisadores a recuperação não cirúrgica de embriões feita por meio de lavagens uterinas em um sistema fechado, utilizando um tipo especial de sonda (BIVONAR Inc. Gary. Indiana. USA), apropriada para utilização em éguas, adaptada a uma extensão de silicone unida a um filtro (75 micras) para coleta de embrião. (ALVARENGA *et al.*, 1993; RIERA e MCDONOUGH, 1993; ALLEN, 1994; FLEURY, 1998; CAIADO *et al.*, 2005). CAIADO *et al.* (2007) citando SQUIRES *et al.* (2003) afirmaram que esta técnica permanece praticamente inalterada nas duas últimas décadas.

#### **2.4- Extrato de pituitária eqüina (EPE)**

O extrato de pituitária eqüina (EPE) é um preparado da glândula pituitária eqüina, rico em LH e FSH eqüino liofilizado, sendo o único composto que regularmente induz ovulações múltiplas em éguas.

O EPE tem sido o produto mais amplamente utilizado para a superovulação em éguas. Diversos laboratórios têm produzido o EPE não purificado, contudo o seu uso está em processo de regulamentação (FARINASSO, 2004).

As pituitárias são adquiridas em matadouros de eqüinos, onde são removidas através de um corte oblíquo caudo/cranial na região caudal ao pavilhão auricular e mandíbula; após a remoção do encéfalo, as pituitárias são visualizadas alojadas nas selas túrsicas, de onde são removidas com o auxílio de uma espátula (CARMO, 2003). As pituitárias extraídas são lavadas com solução fisiológica, sendo em seguida armazenadas em pacotes plásticos e conservadas a uma temperatura de -20°C por duas semanas (CARMO, 2003). Depois de descongeladas, as pituitárias são banhadas em água destilada e deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com solução de 40% de etanol e 6% de acetato de amônia. A fração ativa é precipitada e aumenta-se a concentração de etanol em 80%, sendo em seguida dialisada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20°C (CARMO, 2003).

A primeira tentativa de superovulação em éguas foi realizada por um pesquisador inglês (DAY, 1940) utilizando tanto o PMSG (eCG) quanto o hCG sozinho ou em combinação, e EPE na dose de 800 mg subdividida em uma administração ao dia por um período de cinco dias. Porém, todas as tentativas para estimulação de múltiplos folículos foram acompanhadas de insucesso (ANDRADE, 1986, CARMO, 2003).

Somente em 1974, foi publicado o primeiro relato de indução de superovulação com sucesso em éguas, por DOUGLAS *et al.* Os autores induziram a superestimulação ovariana com EPE parcialmente purificado em duas administrações ao dia, através da administração em doses constantes por 14 dias consecutivos, em 29 éguas pôneis em sazonalidade anovulatória. Os resultados mostraram que 86% das éguas tratadas obtiveram resposta à ativação ovariana, ocorrendo uma ou mais ovulações, e quatro (14%) éguas continuaram apresentando inatividade ovariana. Das éguas pôneis que ovularam, 58% apresentaram duas ou mais ovulações (ARRUDA e FLEURY, 2001).

Numerosos experimentos têm documentado a habilidade do Extrato de Pituitária eqüina (EPE) de induzir ovulações múltiplas (2 a 7 ou + folículos) em éguas cíclicas (ALVARENGA *et al.*, 2001; FARINASSO, 2004; ) com doses diárias que variam de 25 mg a 50 mg ou mais, sendo o único composto que, regularmente, induz uma boa resposta superovulatória na égua, porém com índices de recuperação embrionária, baixos e inconsistentes (FARINASSO, 2004). ALVARENGA *et al.* (1999) utilizaram o EPE em aplicações uma ou duas vezes ao

dia, e relataram que 25 mg de EPE aplicado duas vezes ao dia, com o tratamento iniciado logo após a aplicação de PGF entre os dias seis e oito do diestro, induziu a uma resposta ovariana significativamente maior do que a aplicação do produto em uma vez ao dia (ALVARENGA *et al*, 1999; MACHADO, 2004):

Em um experimento subsequente, ALVARENGA *et al.* (2001) utilizando o mesmo protocolo, observaram uma melhor resposta superovulatória e um maior número de embriões coletados quando o EPE foi administrado na mesma dosagem duas vezes ao dia, desde que nenhum folículo maior ou igual a 20mm de diâmetro tivesse sido detectado no início do tratamento. Quando a metade destes folículos alcançou 35mm de diâmetro, uma dose de 2500UI de hCG foi administrada para induzir a ovulação. Com este 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 ou duas vezes ao dia, respectivamente. O número de embriões recuperados por égua foi de 1,6 e 3,5 para os grupos tratados uma ou duas vezes ao dia, respectivamente (ALVARENGA *et al*, 1999; MACHADO, 2004).

Em tratamento com EPE na dose de 40mg diárias (uma aplicação) com a indução de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  iniciado no quinto e sexto dia do diestro, e duração média de 6 dias  $\pm$  2. Obteve-se média de 3,6 ovulações por ciclo nas éguas tratadas contra 1,1 para grupo controle sem EPE. Observaram que 92,9% responderam com mais de uma ovulação (5 éguas com 2 ovulações; 1 égua com 3 ovulações; 2 éguas com 4 ovulações; 4 éguas com 5 ovulações e 1 égua com 9 ovulações). Dois dias após foram extirpados oviduto e ovário, via incisão no flanco, para coleta de oócitos ou oócitos fertilizados, e obtiveram 57,1% de recuperação embrionária (28 embriões/49 ovulações) para éguas tratadas contra 62,5% no grupo controle, e observaram taxa de fecundação e taxa de desenvolvimento embrionário similar entre os tratamentos (FARINASSO, 2004).

BEZARD *et al.*, (1995), estudaram o número de oócitos recuperados entre éguas pôneis superovuladas (tratamento longo e curto) e não superovuladas (controle) em fase cíclica. O grupo do tratamento longo consistiu em iniciar o tratamento superovulatório no 8<sup>o</sup> dia de diestro e terminar com a presença de dois ou mais folículos com  $\geq$ 35mm de diâmetro; enquanto o grupo de tratamento curto iniciou-se com a presença de folículos com o diâmetro de no máximo 17mm, e terminou quando dois ou mais folículos apresentaram 25mm de diâmetro. A dose

administrada do EPE foi de 75mg uma vez ao dia. A prostaglandina F2 $\alpha$  foi administrada no 7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dia pós-ovulação para ambos os grupos, e a indução da ovulação foi de 25 mg do EPE/IV. Entre 34 e 35h pós-indução das ovulações, foi feita a punção folicular. Obtiveram uma média de 1,09 folículos no grupo controle, 2,29 para o tratamento longo e 2,8 para o tratamento curto. Quarenta e seis oócitos foram recuperados de 68 folículos pré-ovulatórios. Considerando o número de oócitos por ciclo, observaram menor taxa no controle (0,66), com uma tendência ( $p=0,06$ ) para um maior número de oócitos recuperados para o tratamento curto (1,58 oócitos) em relação ao tratamento longo (0,73 oócitos). Verificaram média de duração do tratamento similar entre FSH eqüino e EPE, ou seja, 7.6 e 8.0 dias, respectivamente. Neste sentido, concluíram que a maior quantidade de LH no EPE não afeta a resposta ovulatória de éguas tratadas e que ambos os tratamentos aumentam a taxa de ovulação em comparação ao grupo controle (éguas que não receberam tratamento). Observaram também que o extrato hipofisário por ser rico em LH, aplicado por via endovenosa foi eficiente para induzir as ovulações nas éguas tratadas, concordando com experimento pregresso (DUCHAMP *et al*, 1987; FARINASSO, 2004).

PALMER (1987) verificou que sucessivos tratamentos superovulatórios com EPE por seis ou mais ciclos na estação reprodutiva, não afeta a taxa de ovulação. Contudo, a administração contínua de EPE por 94 dias rompeu o ritmo das ondas foliculares e os folículos apresentam tendência a crescer e ovular de forma independente (FARINASSO, 2004; HOFFERER, 1993).

FARINASSO (2004), avaliando o tratamento diário com baixas doses de EPE (2mg, 4mg e 6mg) em éguas no período de estação de monta, observou que a dose de 2mg foi pouco eficaz na indução de ovulações múltiplas, mas que doses de 4mg e 6mg resultaram, respectivamente, em taxas de ovulação de 1,92 e 1,84 por ciclo, e uma taxa de 1,31 embriões/égua no tratamento com doses de 6mg de EPE diários. Esses resultados indicam que éguas cíclicas são responsivas às baixas dosagens de EPE, representando tratamentos menos invasivos e menos dispendiosos (FARINASSO, 2004).

As respostas ao estímulo superovulatório com o EPE podem ser variáveis, provavelmente devido a não padronização dos teores de FSH e LH contidos no extrato. A partir de 1 quilo de pituitária eqüina obtêm-se de 5 a 8 gramas do EPE. As

pituitárias são geralmente obtidas de um ou mais abatedouros, e dessa forma, o EPE varia conforme a fase do ciclo estral, a idade das éguas, período do ano e origem dos animais (FARINASSO, 2004).

## 2.5- Hormônio de crescimento (GH)

O GH, um polipeptídeo simples, produzido na hipófise anterior e no fígado estimula a síntese de IGF-1, que irá agir nos tecidos periféricos. A liberação do GH é controlada por hormônios produzidos no hipotálamo, que são: fator liberador de hormônio do crescimento e fator inibidor da liberação de hormônio do crescimento. A liberação desses fatores é influenciada por neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina e vários neuropeptídeos (GLUCKMAN *et al.*, 1986).

Mais de vinte anos após a determinação da seqüência de aminoácidos da insulina, em 1955, sugeriu-se o envolvimento da insulina como regulador da atividade ovariana. A presença de insulina e fatores do sistema IGF no ovário foi relatada pela primeira vez em porcas (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). Desde então, a presença de IGFs no fluido folicular de várias outras espécies tem sido documentada, incluindo bovinos, ovinos, eqüinos e humanos (PONCHIROLLI, 2003). IGFs são fatores de crescimento polipeptídicos secretados pelo fígado e por vários tecidos em resposta ao estímulo do Hormônio do Crescimento (GH). Eles são mediadores da maioria das ações promotoras de crescimento do GH. Regulam a proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares e têm efeitos metabólicos semelhantes aos da insulina. Diferentemente da insulina, a maioria dos tecidos os produzem. Os IGFs têm a capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos autócrino e/ou parácrino (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

O sistema de IGFs exerce influência sobre as atividades da esteroidogênese, proliferação celular, atividade da aromatase, foliculogênese, ovulação, implantação e desenvolvimento embrionário (ZULU *et al.*, 2002), além de estimular a síntese de DNA e progesterona pelos tecidos ovarianos (VANDERHAAR *et al.*, 1995).

Segundo WEBB *et al.* (2006), o IGF-1 interage com o FSH no estímulo da

produção de estradiol pelas células da granulosa. O IGF-1 é importante para a maturação sexual, secreção de gonadotrofinas e age sinergicamente com estas para estimular o crescimento e a diferenciação dos folículos (ZULU *et al.*, 2002, YOSHIMURA, 1998).

Em bovinos, já existe a comprovação de que a ação do GH na maturação de oócitos bovinos é por ação direta nos receptores para GH (GHR), não ocorrendo interferência do IGF-I (IZADYAR *et al.*, 1997). Em bovinos foi identificada a presença de GH e GHR no oócito e células *cumulus*. Também identificaram a presença mRNA para GH no oócito e células da granulosa, indicando a capacidade de síntese do hormônio. Isso sugere a participação do GH na regulação parácrina e/ou autócrina do crescimento folicular e maturação em bovinos (IZADYAR *et al.*, 1997).

Em eqüinos foi identificada a presença de GHR e mRNA para GHR em oócitos desnudos e células do *cumulus*, sugerindo a possibilidade de ação direta do hormônio no oócito. Em ratos e bovinos tal hipótese já foi testada, não desenvolvendo o resultado esperado, o que indica que a ação do GH é mediada pelas células do *cumulus* (MARCHAL *et al.*, 2003).

GINTHER *et al.* (2001) afirmam que somente folículos acima de 9,0mm de diâmetro expressam mRNA para IGF-I e ARMSTRONG *et al.* (2001) não detectaram mRNA de IGF-I nem em células da granulosa nem em células da teca. Já o IGF-II tem sido claramente detectado apenas em células da teca de folículos antrais (YUAN *et al.*, 1998; BAO & GARVERICK, 1998).

A presença do GH induz a expansão do *cumulus* e melhora os índices de FIV e desenvolvimento até o estágio de blastocisto, em bovinos (IZADYAR *et al.*, 1996). Marchal *et al.* (2003), utilizaram a adição de 500ng/mL de hormônio do crescimento eqüino (eGH) no cultivo de oócitos eqüinos coletados por aspiração *in vivo* e coletados de ovários de abatedouro. Em ambos os grupos de oócitos, não foram encontradas diferenças nos índices de meiose 2 da maturação nuclear oocitária em relação ao controle. Quando a totalidade dos oócitos foi avaliada, independente do método de coleta utilizado, foi encontrado aumento no índice de maturação nuclear no grupo com adição de eGH.

CHASE *et al.* (1998) demonstraram que a liberação de GH é controlada pela nutrição e pela concentração de IGF-I através de “*feedback*” negativo. No entanto, a ação do GH na liberação de IGF-I é dependente da presença de insulina. Animais

subnutridos apresentam elevadas concentrações de GH, baixas concentrações de insulina e de IGF-I. Isso se deve a uma menor atividade dos receptores hepáticos de GH, que pode ser por menor quantidade ou por menor sinalização do segundo mensageiro. A atividade do receptor é determinada pela insulina. A presença da insulina determina receptores ativos e a ausência leva a diminuição da atividade (CHASE *et al.*, 1998). Estes mesmos autores também demonstraram que bovinos com deficiência de receptores de GH (GHRD) eram associados à condição de miniatura e apresentavam menores concentrações de IGF-I, maiores concentrações de GH e menor número de folículos pequenos presentes no ovário, comparados ao grupo controle. Concluíram que GH e IGF-I são regulados pela nutrição (maior ou menor concentração de insulina) e têm efeitos diretos na função ovariana e que alterações no GH, rGH e IGF-I associadas à nutrição ocorrem independentemente das gonadotrofinas.

O sistema IGF é complexo e composto por IGF-I e IGF-II, por dois tipos de receptores (tipo-I e II), por seis proteínas ligadoras a IGF que são as IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6 e por enzimas de inativação (IGFBPase) das IGFBPs. Não existe especificidade para receptor, porém quando IGF se liga ao receptor tipo II não desencadeia o sinal à célula, por ser inativo. As proteínas ligadoras de baixo peso molecular (IGFBP-2, 4 e 5) apresentam maior afinidade pelos IGFs, impedindo que estes se liguem aos receptores. A função das IGFBPases é degradar as IGFBPs, possibilitando maior biodisponibilidade de IGF (livre) para se ligar aos receptores (FORTUNE *et al.*, 2004).

Vários estudos, em diferentes espécies de mamíferos, incluindo bovinos e suínos, demonstraram que a insulina, o IGF-1 e o IGF-2 estimulam a produção de progesterona pela célula da granulosa, na seguinte ordem, em relação à potência: IGF-1 > IGF-2 > insulina (MORLEY *et al.*, 1989; MONNIAUX *et al.*, 1994; SPICER *et al.*, 1993).

Possivelmente, fatores de crescimento, como o IGF-1 possam participar da seleção de folículos dominantes, como sugerido em humanos e vacas, devido a um aumento de concentração deste nos folículos maiores nestas espécies (SPICER e ENRIGHT, 1991).

Na maioria das espécies domésticas, somente o folículo dominante apresenta receptores para o LH dentro das células da granulosa e uma vez que o IGF-1 e seus

receptores encontram-se em maior quantidade no fluido folicular colhido do folículo dominante, a hipótese que o IGF-1 intrafolicular seja necessário para a seleção do folículo dominante se torna pertinente (BEAM e BUTLER, 1997). Entretanto, ao contrário da maioria das espécies domésticas, vem sendo observado nas éguas que somente os folículos ovarianos com diâmetro acima de 5mm apresentam receptores para LH (GOUDET *et al.*, 1999). Uma vez que os folículos ovarianos das éguas atingem diâmetros superiores a 40mm quando comparado com a maioria das espécies estudadas, este fenômeno que afirma somente ter receptores para o LH o folículo dominante, não se aplica à espécie eqüina. Entretanto, mesmo em éguas, as células da granulosa dos folículos subordinados apresentam um número de receptores para o LH inferior àquele presente no folículo dominante, sugerindo uma possibilidade do IGF-1 intrafolicular desempenhar um papel importante na seleção do folículo dominante (GOUDET *et al.*, 1998). Segundo FINDLAY (1993), contrariando as afirmações anteriores, receptores para o LH e FSH foram encontrados em folículos a partir de 0,5mm de diâmetro, sugerindo que os potenciais efeitos do IGF-1 na seleção do folículo dominante estariam limitados em aumentar o número de receptores para o LH, ao invés de produzir um incremento no número de receptores para o LH e o FSH.

Foi demonstrado que ocorre uma diminuição das concentrações de IGF-1 à medida que ocorre o aumento da idade nas éguas (LOFSTEDT e PATEL, 1989), o que poderia explicar, em parte, a diminuição da fertilidade em animais mais velhos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Período e local do experimento

O experimento foi realizado durante o período de agosto de 2009 a dezembro de 2009 na Central de Reprodução Eqüina Mitho, localizada no município de Guarapari, no estado do Espírito Santo.

#### 3.2- Éguas

Foram utilizadas 12 éguas doadoras de embriões da raça Mangalarga Marchador, com faixa etária de 8 a 21 anos, peso vivo entre 320 e 450kg e escore corporal de 2 a 4 (1-5) em anestro prolongado. Estes animais foram mantidos em piquetes com livre acesso a bebedouro coletivo, ração com 12% de proteína, capim- elefante (*Pennisetum purpureum*) picado e suplementação mineral.

As éguas receptoras (22), também da raça Mangalarga Marchador, com idade de 4 a 12 anos e escore corporal de 3 a 4 (1-5) foram mantidas estabelecidas durante o dia com capim-Napier (*Pennisetum purpureum*) picado, ração com 12% de proteína e suplementação mineral, sendo soltas à noite no pasto também com fornecimento de capim picado no cocho. Estas éguas foram utilizadas entre o quarto e oitavo dia de ovulação, acompanhadas a cada 48 horas através de palpação retal e exame ultrassonográfico. Só foram utilizadas receptoras com tônus uterino 3, segundo a classificação de CAIADO *et al* (2007). De acordo com esta classificação, tônus 1: mínimo tônus do anestro até o início da atividade cíclica - o formato e a consistência do útero não estavam bem definidos ao exame de palpação retal; tônus 2: tônus proporcionado pela fase estrogênica do ciclo estral (estro) - útero com consistência macia e formato quase tubular, com contratilidade ainda não perceptível ao toque; tônus 3: tônus da fase progesterônica do ciclo estral (diestro) - útero com formato tubular bem definido, com aumento do tônus e da consistência e

contratilidade uterina perceptível ao toque; e tônus 4: máximo tônus do início da prenhez, após o 13º dia – contratilidade uterina mais perceptível ao toque e útero em formato tubular e consistência mais firme.

Todas as éguas, doadoras e receptoras, foram submetidas a protocolos de vacinação e vermifugação normalmente realizados na Central.

### **3.3- Exame admissional:**

#### **3.3.1- Cadastramento dos animais**

Foi realizada uma ficha individual das éguas, na qual constaram informações referentes à idade, aos respectivos históricos e achados no exame clínico geral e reprodutivo.

#### **3.3.2- Avaliação do trato reprodutivo por ultrassonografia**

Avaliações por ultrassonografia do trato reprodutivo foram realizadas em todas as éguas utilizando-se um equipamento Aloka modelo SSD-500 com transdutor transretal de 5MHz.

### **3.4- Modelo experimental**

As éguas doadoras foram usadas inicialmente no primeiro ciclo do experimento como grupo controle e no segundo ciclo, como grupo tratado, não obrigatoriamente sendo utilizadas na mesma época. No primeiro ciclo (grupo controle) duas aplicações com doses de 5mg de dinoprost-trometamina (PGF<sub>2</sub>α),

(Lutalyse<sup>®</sup>; Pharmacia & Upjohn, Co., Kalamazoo, MI, EUA), por via intramuscular foram feitas e repetidas no dia seguinte. Simultaneamente a segunda dose de PGF2 $\alpha$ , foi administrado 1mL de solução fisiológica por via intramuscular, 1 vez ao dia, durante no mínimo 8 dias para verificar se haveria crescimento folicular e início do estro nestas éguas. Como não ocorreu o estro, estes mesmos animais, após 15 dias do início do primeiro ciclo, foram submetidos ao tratamento, onde o 15<sup>o</sup> dia passou a ser considerado o dia 0 do grupo tratado. O protocolo foi realizado da mesma forma que no grupo controle, porém, no lugar de soro fisiológico, foi utilizado 6mg de EPE e 6mg de GH.

Este modelo experimental, que utilizou os mesmos animais para grupo controle e tratado, visou garantir que características individuais de cada égua, não influenciassem no resultado do experimento.

Após 30 dias do término do tratamento, e com a manutenção do estado de anestro, seis dos 12 animais foram reutilizados para um segundo estudo.

### **3.5- Garanhão**

Sêmen de três garanhões da raça Mangalarga Marchador com bom histórico de fertilidade foi utilizado nas inseminações artificiais das éguas estimuladas. Após a coleta, realizada com auxílio de uma égua em cio, por meio de uma vagina artificial modelo Botucatu (PAPA e ALVARENGA, 1984), o sêmen foi filtrado para a remoção da fração gelatinosa, analisado em microscópio óptico e posteriormente diluído na proporção 1:1 em meio diluente à base de leite desnatado (Max-Sêmen<sup>®</sup>). A inseminação foi realizada na dose de  $500 \times 10^6$  espermatozoides viáveis com motilidade progressiva e vigor 3 a 5 em uma variação que vai de 0 a 5.

### **3.6- Inseminação Artificial:**

Durante a fase de estro, após a detecção de pelo menos um folículo de 35mm de diâmetro com maturidade ovulatória, as éguas foram inseminadas com no mínimo  $500 \times 10^6$  espermatozóides viáveis. As inseminações foram repetidas a cada 48 horas, até que fosse detectada a ovulação.

### **3.7- Monitoramento da dinâmica folicular**

As éguas doadoras foram submetidas a um acompanhamento diário por meio de palpação retal e ultrassonografia uterina e ovariana. O acompanhamento foi feito individualmente em troncos de contenção com o intuito de observar o efeito da ação das drogas sobre a dinâmica folicular.

### **3.8- Descrição do Protocolo**

Foi determinada a situação ovariana da doadora no início do tratamento, principalmente com relação à ausência folicular ou folículos de tamanho pequeno e semelhante. A situação uterina da doadora no início do tratamento também foi avaliada, principalmente em relação à ausência de tônus uterino, e sua imagem ultrassonográfica destituída de edema uterino.

Foi efetuada uma aplicação com dose de 5mg de dinoprost-trometamina (PGF<sub>2</sub>α) (Lutalyse®; Pharmacia & Upjohn, Co, Kalamazoo, MI, EUA), por via intramuscular e repetida no dia seguinte.

O tratamento com EPE e GH foi iniciado com 6mg de EPE e 6mg de GH por via intramuscular, concomitante com a segunda dose de PGF<sub>2</sub>α, uma vez ao dia, durante no mínimo oito dias.

Quando não ocorreu resposta, a aplicação diária de EPE e GH foi

interrompida, ou seja, quando após oito dias de tratamento, não foi observado crescimento folicular. Estes foram classificados como os que não responderam ao tratamento.

O tratamento foi mantido por oito ou mais dias, dependendo da resposta da doadora em relação ao desenvolvimento folicular, sendo interrompido quando um ou mais folículos apresentaram tamanho de 35mm de diâmetro. No momento da presença de folículos de tamanho entre 35mm de diâmetro, com presença de edema observado na ultrassonografia, induziu-se as ovulações com hCG 2500UI por via endovenosa.

### **3.9- Preparo e estocagem do material**

O EPE e o GH foram fornecidos em frascos individuais com 48mg de material liofilizado cada e mantidos sempre a -18°C ou -16°C. Ambos foram diluídos em 8mL em solução fisiológica (6mg/mL) e fracionados em alíquotas de 1 mL para serem armazenados de forma congelada. Antes de se iniciar o tratamento, o EPE e o GH eram descongelados e administrados por via intramuscular profunda com agulha 40x12 na região da garupa uma vez ao dia. Quando mantidos descongelados sob refrigeração, o tempo de estocagem não poderia ultrapassar sete dias, sendo mantido à temperatura de 4°C. A solubilização do EPE e do GH foi realizada com movimentos suaves, a fim de evitar a formação de bolhas de ar, evitando a desnaturação de proteínas, preservando a qualidade do produto.

### **3.10- Transferência de embriões**

A coleta de embriões foi realizada no oitavo dia de ovulação, utilizando-se uma sonda de Foley Rush nº 24, um equipo para coleta de embriões, um filtro para coleta de embriões, soro ringer lactato JP®, placa de petri, palhete 0,25 ou 0,50, e meio de embrião Embriocare Plus Cutilab®, seringa de insulina, sonda Tom Cat,

seringa de 3mL, agulha 30x10.

Três lavados uterinos sequenciais foram realizados ou até a confirmação visual da recuperação embrionária. Após a recuperação ou o terceiro lavado uterino, o material filtrado foi avaliado com auxílio do microscópio estereoscópico e quando localizado, o(s) embrião(ões) foi(foram) removido(s) para uma solução de manutenção de embriões (Embriocare Plus®) e foram promovidas oito passagens nesta solução. O envase foi realizado em pipeta de inseminação artificial em éguas Provar®, envolvida por camisa sanitária Provar®.

Para a inovulação na receptora, foi realizado um procedimento de limpeza de reto, higienização do ânus e vulva e introdução da pipeta de IA com o embrião por via transvaginal e transcervical no corpo uterino.

### **3.11- Análise estatística**

A análise estatística consistiu, inicialmente, na obtenção das freqüências de animais cuja aplicação de EPE apresentou eficiência, sendo obtidas freqüências estratificadas por tratamento (1, 2 e 3). As freqüências dos diferentes tratamentos foram comparadas às freqüências do controle por meio do teste não paramétrico de qui-quadrado, por contingência, sendo adotado o nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no aplicativo Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 12 animais utilizados no experimento, 6 foram tratados duas vezes cada, totalizando 18 tratamentos, conforme descrito no quadro abaixo.

n	Animal	Dias de tratamento	Tamanho do folículo final trat.	Número de folículos	Ov.	Embrião	Gestação
1	Escrava	9	36	1	Sim	Não	-
2	Escrava	11	36 e 36	2	Sim 2	Não	-
3	Balsa	8	0	0	Não	-	-
4	Balsa	8	0	0	Não	-	-
5	Porcina	12	39	1	Sim	Sim	Sim
6	Porcina	9	42	1	Sim	Sim	Sim
7	Petúnia	8	0	0	Não	-	-
8	Petúnia	8	0	0	Não	-	-
9	Daniela	10	41	1	Sim	Sim	Não
10	Daniela	11	39	1	Sim	Não	-
11	Bailarina	8	0	0	Não	-	-
12	Bailarina	12	40	1	Sim	Sim	Não
13	Gaivota	9	40	1	Sim	Sim	Sim
14	Enseada	9	39	1	Sim	Sim	Sim
15	Clarisse	11	42	1	Sim	Sim	Sim
16	Bebela	11	45 e 40	2	Sim 2	Sim 2	Sim 1
17	Safira	11	36	1	Sim	Não	-
18	Pérola	13	38	1	Sim	Não	-

De acordo com os resultados obtidos no experimento, dos 18 tratamentos, 13 obtiveram resposta positiva e 5 negativa, isto é, 72,2% de eficiência. Após o oitavo dia de administração de 6mg EPE e 6mg de GH, houve crescimento folicular, melhora de tônus uterino e início de formação de edema e ovulação. De acordo com a análise estatística, obteve-se diferença significativa em comparação aos animais que não ovularam, pois  $P < 0,0001$ , onde se  $P < 0,05$  a diferença é significativa.

Dentre os 13 animais que ovularam, em 8 houve recuperação embrionária. Sendo assim, não houve diferença significativa dos valores experimentais (61,5% de

recuperação) em relação aos valores citados por SQUIRES *et al* (1999), que encontraram uma variação de 29 a 75% de recuperação, pois  $P = 0,26$ .

Em relação ao número de embriões confirmados na receptora (taxa de gestação), dos 8 embriões recuperados, 6 foram confirmados. Não houve diferença significativa dos valores experimentais (75% de confirmação) em relação aos valores encontrados por CAIADO (2004) em seu experimento (68% de confirmação), pois  $P = 0,67$ .

O resultado obtido com a comparação entre o número de ovulações duplas dos animais com tratamento em relação ao grupo controle foi de 2 ovulações duplas em 18 tratamentos. Houve diferença significativa dos valores experimentais (11,1% de ovulações duplas) em relação ao controle (0% de ovulações duplas), pois  $P < 0,001$ .

Em relação ao número de ovulações duplas das 13 éguas que ovularam, 2 obtiveram ovulação dupla, com uma percentagem de 15,4%. Ao se comparar com o resultado obtido em ovulações duplas espontâneas de éguas cíclicas encontrado por CORDEIRO (2008) que foi de 8,4 %, observou-se que não houve diferença significativa dos valores experimentais, já que  $P = 0,97$ .

Os animais que não obtiveram resultados positivos em nenhum dos tratamentos podem ser refratários a estas drogas ou talvez em um terceiro tratamento ou um tratamento com duração mais prolongada eles também responderiam. Estes resultados demonstraram que ainda há necessidade de se realizar mais estudos.

As taxas de recuperação embrionária, assim como a taxa gestação podem ser diretamente influenciadas pela experiência do técnico, do material usado e da receptora que está sendo utilizada.

A constatação de éguas em anestro na estação de monta sugere que estes animais apresentam alguma deficiência metabólica (idade, estado nutricional). Isto pode ter influenciado negativamente os resultados referentes às taxas de indução do estro, de ovulação e de recuperação embrionária. CHASE *et al.*, (1998) relataram que em animais subnutridos a concentração de GH, e IGF-1 é alterada.

O tempo de duração do tratamento variou de 8 a 13 dias, sendo que nos animais que responderam ao tratamento, o tempo médio do crescimento folicular até a ovulação foi de 10,6 dias, confirmando os resultados obtidos em éguas cíclicas

encontrados por GINTHER *et al.* (1992), que foram de 6,5 a 14,9 dias.

A qualidade embrionária foi 100% avaliada e considerada como grau 1 (1 a 5), corroborando com a afirmação de ZULU *et al.*, (2002), e YOSHIMURA, (1998), onde o desenvolvimento embrionário pode ser influenciado positivamente com a utilização do GH.

Após o terceiro dia do protocolo, já se observou nos animais que responderam ao tratamento o aumento de tônus uterino de 1 para 2, (1-4) já indicando o sucesso do tratamento final, com 8 dias, ou seja, os animais que no quarto dia não apresentaram mudança de tônus uterino, não responderam ao tratamento completo.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se concluir que a administração de um protocolo de 6mg de EPE e 6mg de GH obteve 72,2% de eficiência para a indução do estro em águas em anestro.

Em relação à recuperação de embriões e à taxa de gestação na receptora, o protocolo utilizado não influenciou nos resultados, que foram semelhantes àqueles encontrados na literatura, isto é a diferença não foi significativa.

Pode-se concluir também, que o protocolo foi eficiente quanto ao número de ovulações duplas obtidas em relação ao grupo sem tratamento, e ao se comparar com o número de ovulações duplas espontâneas descritas na literatura, o protocolo não influenciou no resultado.

A duração do período do estro foi a mesma encontrada por autores que descreveram o tempo de estro em éguas cíclicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W. R. Artificial control of the mare's estrus cycle. **Veterinary Record.**, p. 154 -166, 1977.

ALLEN, W.R. Equine embryo transfer: A brief up date on techniques and progress. **Ars Veterinária**, v. 10, p. 67-74, 1994

ALVARENGA, M. A.; LANDIN e ALVARENGA, F. C.; MEIRA, C. Modification in the technique used to recovery equine embryos. **Equine Veterinariae Journal**. Supplement. 15, p. 111- 112, 1993.

ALVARENGA, M. A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E. L. Improvement of Ovarian superstimulatory response in mares treated twice daily with EPE. In: Annual Conference of The Society of Theriogenology, 1999, Nashville. **Proceedings of the Annual Conference of the Society of Theriogenology**, p. 46-46, 1999

ALVARENGA, M. A.; McCUE, P.; SQUIRES, E. L.; NEVES NETO, J. R. Improvement of Ovarian Superstimulatory. Response and Embryo Production in Mares Treated with Pituitary Extract twice daily. **Theriogenology**, v. 56, p. 879-887, 2001.

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

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v. 39 p. 7-24, 2001.

ARRUDA, R. P.; FLEURY, J. J. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, pág. 233-239, 2001.

BACHELOT, A.; MONGET, P.; IMBERT-BOLLORE, P., COSHIGANO, K.; KOPCHICK, J.; KELLY, P.; BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 4104–4112, 2002.

BAO, B.; GARVERICK, H. A.; Changes in messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats, p.1158–1168, 1998.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 133-142, 1997.

BEZARD, J.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Preovulatory maturation of follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 261-271, 1995.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 6, p. 1115- 1128, 1996.

CAIADO, J. R. C. **Otimização de Receptoras e Avaliação de meios na Transferência de Embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador**. 2004. Tese (Doutorado em Produção Animal). Campos dos Goytacazes. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

CAIADO, J. R. C.; Fonseca, F. A.; Silva, J. F. S.; Fontes, R. S. Tratamento de éguas da Raça Mangalarga Marchador com progesterona (p4) ou altrenogest visando sua utilização como receptoras de embriões no segundo dia após ovulação **Biology of Reproduction**, v. 33, Supplement 1, p. 180, 2005.

CAIADO J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA J. F. S.; FONTES, R. S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 360-368, 2007.

CARMO, M. T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas**. 2003. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

CARMO, M. T.; ALVARENGA, M. A. Evolução da transferência de embriões em eqüinos no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae – Suplemento**. Beberibe. v. 31, p. 223-230, 2003.

CHASE, J. J.; KIRBY, C. J.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; LUCY, M. C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**. Savoy, v. 76, p. 212-219, 1998.

CORDEIRO, M. P. **Levantamento de ovulações múltiplas e espontâneas em éguas da raça Mangalarga Marchador**. Monografia de Conclusão de Curso - Campos dos Goytacazes. Universidade Estadual Norte Fluminense, 34 p., 2008

CURSIO B. R., **Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I**. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br>>. Acesso em 25 ago. 2009.

DOUGLAS, R. H. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally anovulatory mares with equine pituitary fraction. **Theriogenology**, v. 2, p. 133-142, 1974.

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.

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

DOWSETT, K. F. *et al.*, Seasonal variation in the estrous cycle of mares in the subtropics. **Theriogenology**, v. 39, p. 631-653, 1993.

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

ECHTERNKAMP, S. E. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 971-98, 1994.

FARINASSO, A. **Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas**. 2004. 68 p. Tese ( Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade de Brasília, Brasília.

FINDLAY, J. K. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 15-23, 1993.

FLEURY, J. J. O dia da coleta na taxa de recuperação embrionária em eqüinos em uma central de transferência de embriões comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS** Supl. Porto Alegre, v. 26, p. 268, 1998

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; SOUSA, F. A. C.; ANDRADE A. F. C.; ARRUDA R. P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 27-31, jan./mar. 2007.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

GINTHER, O. J. Occurrences of anestrus, estrus, diestrus and ovulation over a 12-month period in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 1173 - 1179, 1974.

GINTHER, O. J. Characteristics of the ovulatory season. In: Reproductive Biology of the Mare. 2<sup>o</sup> ed. Cross Plains: **Equiservices**, p. 173-232, 1992.

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

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

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

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

GLUCKMAN, P. D.; BREIER, B. H.; DAVIS, S. R. Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 442-466, 1986.

GOMES, G. M. **Uso do hormônio de crescimento (GH) em protocolos de superovulação em fêmeas domésticas**. Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Botucatu, 2004.

GONG, J. G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, p. 611-622, 1991.

GOUDET, G.; BEL, F.; BEZARD, J.; GERARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 563-570, 1998.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Editora Manole, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Feminina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, São Paulo: Ed. Manole, p. 21-58, 1995.

HARTSHORNE, G. M.; SARGENT, I. L.; BARLOW, D. H. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. **Human Reproduction**, v. 9, p. 1003-1012, 1994.

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

HOMBURG, R.; ESHEL, A.; ABDALLA, H. I.; JACOBS, H. S. Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotropins. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, p. 113-117, 1988.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceeding of the American Association of Equine Practitioners**, p. 119, 1972a.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Estrous cycle and ovulation in the mare. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 161, n. 11, p. 1367-74, 1972b.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. The estrous cycle of the mare and its uterine control. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, p. 415-419, 1975.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; KENNEDY, P. C. The estrous cycle and selected functional and pathologic ovarian abnormalities in the mare. **Veterinary Clinician of North America**, (Large Animal Practice.)v. 2 (2), p. 225-239, 1980

HUGUES, J. P.; TORRESANI, T.; HERVE, F.; MARTIN-PONT, B.; TAMBOISE, A.; SANTARELLI, J. Interest of growth hormone releasing hormone administration for improvement of ovarian responsiveness to gonadotropins in poor responder women. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 945-950, 1991.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, L. J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A.; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ , estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-226, 1995.

IMEL, K. J. *et al.* Collection and transfer of equine embryos. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 179, p. 987-991, 1981.

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 372-377, 1996.

IZADYAR, F.; VAN TOL, H. T. A.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 175-180, 1997.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 185-201, 2003.

LAPIN, D. R.; GINTHER, O. J. Introduction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with a equine extract. **Journal of Animal Science**, v. 44, p. 834-842, 1977.

LOFSTEDT, R. M.; PATEL, J. H. Evaluation of the ability of altrenogest to control the equine estrous cycle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 3, p. 361-364, 1989.

MACHADO, M. S. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com Extrato de Pituitária Equina e FSH Equino Purificado**. 2004. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1197-1203, 2002.

MARCHAL, R.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GERARD, N.; MERMILLOD, P.; GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1013-1022, 2003.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**, Philadelphia: Lea e Febiger, 1993.

MELO, C. M. **Indução de ovulação em éguas**. 2006. Disponível em <[HTTP://www.fmvz.unesp.br](http://www.fmvz.unesp.br)> Acesso em 18 set. 2009.

MONNIAUX, D.; PISSELET, C.; FONTAINE, J. Uncoupling between proliferation and differentiation of ovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 142, p. 497-510, 1994.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in the domestic ruminants. **Theriogenology**, v. 47, p. 3-12, 1997.

MORLEY, P.; CALARESU, F. R.; BARBE, G. J.; ARMSTRONG, D. T. Insulin enhances luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis by porcine theca cells. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 735-743, 1989.

OSBORNE, V. E. Analysis of the pattern of ovulation as it occurs in the annual reproductive cycle of the mare in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 42, p. 149-154, 1966.

PALMER, E. Recent attempts to improve synchronization of ovulation and to induce superovulation in the mare. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v. 3, p. 11-19, 1987.

PERES, K. R. **Emprego tópico de prostaglandina da família E ou de análogo com o intuito de acelerar a migração de embriões eqüinos para o útero e imunolocalização dos respectivos receptores**. 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, 2008.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 161-171, 1993.

PONCHIROLLI, C. B. **Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular**. Seminário do Curso de Pós-Graduação. 2003. São Paulo. SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. Campus Botucatu, 2003. 12p.

RAMOS, C. M. S. **Superovulação em Éguas Doadoras de Embriões**. Betim. 2005. 14p. Dissertação (monografia) - Pontifca Universidade Católica de Minas Gerais.

RIERA, F. L.; McDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. **R & W Publications**, 1993.

ROCHA FILHO, A. N.; LOPES, E. P.; ARAUJO, G. H. M.; ALVARENGA, M. A. Efeito de baixas doses de extrato de pituitária equina e FSH purificado equino nas taxas de ovulação e recuperação embrionária em éguas. **Animal Reproduction Science**, v. 33 (Suplemento 1), p.135-139, 2005.

ROOSDALE, P. D.; RICKETTS, S. W. 1980. Equine Stud Farm Medicine. (ed). Londres. **Baillière Tindall**, p. 564

SALAZAR, F.; SANINT, D.; ROBLEDO, L.; JARAMILLO, G. Sequential non-surgical embryo recovery in the equine in a tropical country. **Theriogenology**, Los altos. v. 13, p. 110, 1980.

SHARP, D. C. Environmental influences on reproduction in horses. **The Veterinary clinican of North American**. v. 2, p. 207-223, 1980.

SOUSA, F. A. C. **Efeito da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões**. 2006. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga. SP.

SPICER, L. J.; ENRIGHT, W. J. Concentrations of IGF-I and esteroïds in follicular fluid of preovulatory bovine follicles: effect of daily injections of a growth hormone releasing factor analog and /or thyrotropin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1133-1139, 1991.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, V. 70, p. 1223–1230, 1993.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 223-245, 1995.

SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91-104, 1999.

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

TAROUCO, A. K. *et al.* 1995. Estacionalidade reprodutiva de éguas abatidas em Pelotas-RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.23, p. 26-42.

TAROUCO, A. K.; 2006. **Fisiologia reprodutiva da égua**. Disponível em <<http://www.pucrs.campus2.br>> Acesso em 26 ago. 2009.

TAVEIROS, A. W.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; REZENDE, H. H. C.; ALVES, J. D. R. Diferentes receptoras na transferência de embriões eqüinos Mangalarga Marchador. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 391-393, 1999.

TISCHNER, M.; BIELANSKI, A. Non- surgical embryo collection in the mare and subsequent fertility of donor animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 58, p. 357-361, 1980.

VANDEHAAR, M. J.; SHARMA, B. K.; FOGWELL, R. L. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-1 in liver and corpus luteum of heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 832-841, 1995.

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

WEBB, R.; ARMSTRONG, D. G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v. 53, p. 95-112, 2004.

WEBB, R.; DUNGA, K.; QUINN, R. L.; FOULADI-NASHATA, A. A. Desenvolvimento folicular em espécies mono e poliovulatórias: do feto à fertilização. **Acta Science Veterinariae**, v. 34, p. 95-114, 2006.

WESSON, J, A.; GINTHER, O. J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse study. **Journal Animal Science**, v. 52, p. 119-129, 1981.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Recents studies relating to the collection of multiple embryos in mares. **Theriogenology**, v. 19, p. 101-108, 1983.

WU, J.; NAYUDU, P. L.; KIESEL, P. S.; MICHELMANN, H. W. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 320-327, 2000.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 24, p. 305-323, 1998.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H. A.; YOUNGQUIST, R. S.; LUCY, M. C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin- like growth factor ( IGF)-I, ( IGF-II), and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 55-63, 1998.

ZACZEK, D.; HAMMOND, J.; SUEN, L.; WANDJI, S.; SERVICE, D.; BARTKE, A.; CHANDRASHEKAR, V.; COSCHIGANO, K.; KOPCHICK, J. Impact of Growth Hormone Resistance on Female Reproductive Function: New Insights from Growth Hormone Receptor Knockout Mice. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1115–1124, 2002.

ZULU, V. C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor-1 as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. **Theriogenology**, v. 64, p. 657-665, 2002.