

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**(Patologia e Ciências Clínicas)**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação de Parâmetros Reprodutivos com o uso de  
Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e  
Deslorelina em um Programa de Transferência de  
Embrião Equino**

**Paula Cardoso de Almeida Silva**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(Patologia e Ciências Clínicas)**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS COM O USO DE  
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG) E DESLORELINA  
EM UM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO EQUINO**

**PAULA CARDOSO DE ALMEIDA SILVA**

*Sob a orientação do Professor*  
**Júlio Cesar Ferraz Jacob**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Julho de 2011

636.10824

S586a

T

Silva, Paula Cardoso de Almeida, 1985-

Avaliação de parâmetros reprodutivos com o uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e deslorelina em um programa de transferência de embrião equino / Paula Cardoso de Almeida Silva - 2011.

63 f.: il.

Orientador: Júlio César Ferraz Jacob.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 48-63.

1. Equino - Reprodução - Teses. 2. Égua - Fecundidade - Teses. 3. Égua - Embrião - Teses. 4. Ovulação - Indução - Teses. 5. Hormônios - Teses. I. Jacob, Júlio César Ferraz, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PAULA CARDOSO DE ALMEIDA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,  
no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências  
Clínicas

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/07/2011

---

Julio César Ferraz Jacob, Dr. UFRRJ  
(orientador)

---

José Antônio Dell'Aqua Júnior, Dr. UNESP

---

Marco Roberto Bourg de Mello, Dr. UFRRJ

*"A mente que se abre a uma  
nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original."  
ALBERT EINSTEIN*

*A minha mãe Thelma,  
pelo esforço, dedicação e  
infinito amor que sempre dedicou  
Aos amigos que sempre  
estiveram presentes  
Aos animais  
Inspiração profissional  
Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS por me dar vida, saúde, paz, equilíbrio e força nos momentos difíceis.

A minha mãe THELMA CARDOSO DE ALMEIDA que sempre esteve presente me apoiando, confiando e lutando pra que eu pudesse conquistar meus sonhos.

Ao meu pai ANTONIO MACEDO DA SILVA, que tem um jeito durão, mas sempre esteve por perto acreditando na minha capacidade.

As minhas avós ANA e ENEID, as minhas tias ADRIANA, VIRGINIA, CRISTINA, ROSELY e REGINA, aos tios GUSTAVO e LUIS, a minha madrinha TIA MARLI, a minha prima TATI, aos meus primos RAFA, FLÁVIO e PAULINHO, aos postigos TIO JÚ, NAJLA, MARCO e WAGNER, e ao meu querido VÔ DARCY, que não está mais entre nós, meu imenso agradecimento pela presença de vocês em minha vida.

Ao meu orientador professor JÚLIO CESAR FERRAZ JACOB, pela oportunidade, por seus ensinamentos e também pelos gritos, que não em todos, mas que em muitos momentos também ensinaram alguma coisa.

Aos amigos SÁVIO, CARLOS, RENATINHO, DIOGO, que me ajudavam às cinco da manhã ou meia noite, esse trabalho também é de vocês.

Aos amigos MARCUS SÁ e LUCIANA BEZERRA, que me receberam de braços abertos e me auxiliaram nas diferentes fases desse trabalho.

Ao professor MARCO MELLO que sempre esteve disposto a me ajudar.

Aos demais amigos do DRAA, ao “pessoal” da parte de equinos e também ao “pessoal” da parte de bovinos, que estiveram por perto me dando apoio e tornando os dias mais suaves com suas histórias.

A todos os funcionários do setor em especial seu ZICO e ZEZINHO, sempre disponíveis a ajudar.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, bem como o corpo docente da veterinária e da zootecnia pelo aprendizado e apoio durante a realização deste trabalho.

As minhas amigas de casa MIRIAM, NATÁLIA, CAROL (JAPA), pela paciência, por me agüentarem nos momentos de stress, pelas festas e pela preocupação.

Aos meus amigos que não participaram diretamente do meu trabalho, mas que fazem parte da minha vida, e são responsáveis por grandes momentos.

Aos animais, por fazerem bem as pessoas e por serem a parte principal do projeto experimental, sem eles o trabalho não teria sido realizado.

As empresas que apoiaram financeiramente CAPES, INTERVET SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH e BOTUPHARMA.

E a todos aqueles que de alguma forma fazem parte da minha vida e participaram desse trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

SILVA, Paula Cardoso de Almeida. **Avaliação de parâmetros reprodutivos com o uso de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e Deslorelina em um programa de transferência de embrião equino.** 2011. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A transferência de embriões (TE) é uma das técnicas de maior destaque na expansão da equideocultura, possibilitando a produção de maior número de produtos de uma mesma égua por ano, aumentando assim o número de animais com alto valor genético. O controle hormonal do momento da ovulação pode ser usado como uma ferramenta para otimizar os parâmetros reprodutivos e reduzir os custos em um programa de TE. O presente estudo comparou a eficiência de doses mais baixas do que as tradicionalmente utilizadas de hCG e Deslorelina avaliando o tempo entre a indução e a ovulação, as taxas de recuperação e fixação embrionária. O estudo foi desenvolvido no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal da UFRRJ. Foi realizado o acompanhamento de 85 ciclos estrais de éguas da raça Bretão Postier e Mangalarga Marchador, onde as éguas ao apresentarem um folículo ovariano  $\geq 35$  mm foram divididas de maneira aleatória em um dos três tratamentos: G1 (n = 32) – tratamento com 1000 UI (1,0 ml i.v.) de hCG (Chorulon® - Intervet Schering-Plough Animal Health), G2 (n = 30) – tratamento com 0,75 mg (0,75ml i.v.) de Deslorelina (Botupharma) e G3 (n=23) – tratamento com 1,0 ml i.v. de solução salina. Vinte quatro horas após a aplicação, a avaliação ultrassonográfica dos ovários passou a ser realizada a cada seis horas até a detecção da ovulação. As éguas doadoras foram inseminadas no dia seguinte a indução e as coletas de embrião aconteceram no dia 9 após a ovulação. Os embriões recuperados foram imediatamente transferidos para receptoras previamente sincronizadas, sendo o diagnóstico de gestação realizado aos 15 e 30 dias de idade embrionária. Os dados referentes ao tempo entre indução e ovulação e características do desenvolvimento folicular, foram analisados pelo método de Análise de Variância (ANOVA), sendo as médias desses dados analisadas quando necessário pelo teste de Tukey. Os dados referentes ao percentual de éguas ovuladas em diferentes períodos, foram analisados através do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) 5%. Em se tratando da taxa de recuperação embrionária, os dados foram analisados através do teste Exato de Fisher, já em relação a taxa de gestação não foi possível realizar análise estatística devido ao baixo número amostral. Os percentuais de ovulação em até 36 horas nos grupos G1, G2 e G3, foram 34,4 %, 13,3% e 8,7%, entre 36 e 42 horas, 62,5%, 56,7% e 8,7%, entre 42 e 48 horas, 0%, 20% e 13%, acima de 48 horas 3,1%, 10% e 69,6%, respectivamente. Havendo dessa maneira diferença significativa entre os grupos tratados e o controle ( $p < 0,05$ ). A taxa de recuperação embrionária foi de 75% (6/8) nos grupos G1 e G2 e 44,4% (4/9) no grupo G3; não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Já a taxa de gestação aos quinze dias de idade embrionária foi de 69,2% (9/13). Deste modo as doses inferiores às comumente utilizadas, dos agentes indutores em questão, foram eficientes em promover a ovulação em até 48 horas, mas o uso destes, não resultou em melhora significativa nos índices de recuperação embrionária.

**Palavras-chave:** égua, ovulação, agentes indutores.

## ABSTRACT

SILVA, Paula Cardoso de Almeida. **Evaluation of reproductive parameters with human chorionic gonadotropin (hCG) and Deslorelin in an equine embryo transfer program.** 2011. 63p. Dissertação (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Embryo transfer (ET) is one of the most prominent techniques in the expansion of horse breeding, enabling the production of more products of a single mare per year, thus increasing the number of animals with high genetic value. The hormonal control of ovulation can be used as a tool to optimize the reproductive parameters and reduce the costs in an ET program. This study compared the effectiveness of lower doses than those traditionally used of Deslorelin and hCG, evaluating the time between ovulation and induction, the recovery rates and embryo attachment. The study was conducted at the Department of Animal Reproduction and Evaluation of UFRRJ. We conducted follow-up of 85 estrous cycles of Breton Postier and Mangalarga Marchador mares, when the mares presenting an ovarian follicle  $\geq 35$  mm, they were divided randomly into one of three treatments: G1 (n = 32) - treatment with 1000 IU (1.0 ml iv) of hCG (Chorulon® - Intervet Schering-Plough Animal Health), G2 (n = 28) - treatment with 0.75 mg (0.75 ml iv) Deslorelin (Botupharma) and G3 (n = 28) - Treatment with 1.0 ml saline iv. Twenty four hours after application, ultrasound evaluation of ovarian was held every six hours up to ovulation. The donors were inseminated the day after induction and embryo collection took place in nine days after ovulation. The recovered embryos were immediately transferred to recipients previously synchronized, these pregnancy diagnosis was performed at 15 and 30 days old embryo. Data regarding the time between ovulation and induction and characteristics of follicular development were analyzed using analysis of variance (ANOVA), and the averages of these data were analyzed when needed by the Tukey test. The data regarding the percentage of mares ovulated in different periods, were analyzed using the Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) 5%. In the case of embryo recovery rate, the data were analyzed using the Fisher exact test, however in relation to pregnancy rate was not possible to perform statistical analysis due to low sample size. The percentage of ovulation in up to 36 hours for G1, G2 and G3 were 34.4%, 13.3% and 8.7%, between 36 and 42 hours were 62.5%, 56.7% and 8.7%, from 42 to 48 hours were 0%, 20% and 13%, more than 48 hours were 3.1%, 10% and 69.6% respectively. Having thus a significant difference between treated and control groups ( $p < 0.05$ ). The embryo recovery rate was 75% (6/8) in G1 and G2, and 44.4% (4/9) in group G3, there was no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ). The rate of pregnancy at fifteen days old embryo was 69.2% (9/13). Thus the lower doses commonly used with inducing agents in question, were effective in promoting ovulation within 48 hours, but the use of these didn't result in significant improvement in the rates of embryo recovery.

Keywords: mares, ovulation, ovulation inducers.

## LISTA DE TABELAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabela 1-</b> | Médias e desvio padrão do tamanho do folículo no momento do tratamento dos grupos.....                 | 42 |
| <b>Tabela 2-</b> | Médias e desvio padrão do tempo entre o tratamento e a ovulação após a administração dos fármacos..... | 44 |
| <b>Tabela 3-</b> | Médias do diâmetro do folículo pré-ovulatório (6 horas antes da ovulação).....                         | 45 |
| <b>Tabela 4-</b> | Médias do maior diâmetro atingido pelo folículo após a indução.....                                    | 46 |

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Distribuição percentual de éguas que ovularam nos diferentes intervalos de tempo após a aplicação de 1000 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana, 0,75mg de Deslorelina e no grupo Controle..... 45
- Gráfico 2-** Distribuição percentual de parâmetros reprodutivos como: taxa de recuperação embrionária, taxa de gestação aos 15 dias, taxa de gestação aos 30 dias e perda embrionária precoce (P.E.P.), comparando G1, G2 e G3..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| GnRH          | Hormônio Liberador de Gonadotrofinas            |
| FSH           | Hormônio Folículo Estimulante                   |
| LH            | Hormônio Luteinizante                           |
| eLH           | Hormônio Luteinizante Equino                    |
| hCG           | Gonadotrofina Coriônica Humana                  |
| PGF2 $\alpha$ | Prostaglandina F2 $\alpha$                      |
| PGE2          | Prostaglandina E2                               |
| P4            | Progesterona                                    |
| EPE           | Extrato de Pituitária equina                    |
| CL            | Corpo Lúteo                                     |
| I.A.          | Inseminação Artificial                          |
| TE            | Transferência de Embrião                        |
| P.E.P.        | Perda Embrionária Precoce                       |
| AMPc          | Adenosina Monofosfato Cíclico                   |
| Mo            | Mórula  |
| Bi            | Blastocisto                                     |
| Bl            | Blastocisto                                     |
| Bx            | Blastocisto Expandido                           |
| $\mu$ m       | Micromêtro                                      |
| mg            | Miligrama                                       |
| ml            | Mililitro                                       |
| mm            | Milímetro                                       |
| ng            | Nanogramas                                      |
| mHz           | Megahertz                                       |
| i.m.          | Intramuscular                                   |
| i.v.          | Intravenosa                                     |
| s.c.          | subcutâneo                                      |
| UI            | Unidades internacionais                         |
| h             | hora  |
| n             | Número de unidades experimentais                |
| ANOVA         | Análise de variância                            |
| IBGE          | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |

IGF

EUA

IETS

Insulin-like growth factor

Estados Unidos

International Embryo Transfer Society

## LISTA DE SÍMBOLOS

|    |                  |
|----|------------------|
| %  | Porcentagem      |
| /  | Por (1/100)      |
| ±  | Mais ou menos    |
| ≥  | Maior ou igual   |
| <  | Menor que        |
| □  | Maior que        |
| =  | Igual            |
| x  | vezes            |
| -  | Menos/negativo   |
| +  | Mais             |
| °  | Grau             |
| °C | Graus Celsius    |
| ®  | Marca registrada |

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                       | 16 |
| 2     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                            | 18 |
| 2.1   | Ciclo Estral da Égua.....                                     | 18 |
| 2.2   | Controle Endócrino da Função Ovariana.....                    | 19 |
| 2.2.1 | Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH).....              | 20 |
| 2.2.2 | Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....                      | 20 |
| 2.2.3 | Hormônio Luteinizante (LH).....                               | 20 |
| 2.2.4 | Estrógeno.....  | 21 |
| 2.2.5 | Inibina.....  | 21 |
| 2.2.6 | Progesterona.....   | 22 |
| 2.2.7 | Prostaglandina.....   | 22 |
| 2.3   | Crescimento Folicular (Foliculogênese).....                   | 23 |
| 2.4   | Dinâmica Folicular.....                                       | 24 |
| 2.4.1 | Ondas foliculares.....  | 25 |
| 2.4.2 | Ovulação.....   | 25 |
| 2.5   | Indução da Ovulação e os Agentes Indutores.....               | 27 |
| 2.5.1 | Deslorelina - Hormônio liberador de Gonadotrofina (GnRH)..... | 28 |
| 2.5.2 | Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).....                     | 30 |
| 2.6   | Transferência de Embrião.....                                 | 32 |
| 2.7   | Fatores que influenciam a Recuperação Embrionária.....        | 33 |
| 2.7.1 | Égua doadora.....   | 34 |
| 2.7.2 | Controle do ciclo estral.....                                 | 34 |
| 2.7.3 | Colheita de embriões.....                                     | 34 |
| 2.7.4 | Manipulação e avaliação do embrião.....                       | 36 |
| 2.7.5 | Qualidade do sêmen.....                                       | 36 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.8   | Fatores que afetam a Taxa de Gestação..... | 37 |
| 2.8.1 | Seleção de receptoras.....                 | 37 |
| 2.8.2 | Escolha da receptora no dia da TE.....     | 38 |
| 2.8.3 | Inovulação.....                            | 40 |
| 3     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....            | 40 |
| 3.1   | Período e Local de Execução.....           | 40 |
| 3.2   | Animais.....                               | 40 |
| 3.2.1 | Delineamento experimental.....             | 40 |
| 3.3   | Palpação retal e Ultrassonografia.....     | 41 |
| 3.4   | Inseminação Artificial (IA).....           | 41 |
| 3.5   | Coleta e Transferência dos Embriões.....   | 41 |
| 3.6   | Análise estatística.....                   | 42 |
| 4     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....        | 42 |
| 5     | <b>CONCLUSÕES</b> .....                    | 47 |
| 6     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                   | 48 |

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria eqüina brasileira apresenta grande diversidade de atividades de acordo com a aptidão de cada raça, proporcionando enorme impacto sócio-econômico através da movimentação de valores superiores a R\$ 7,5 bilhões anuais. São gerados 642,5 mil empregos diretos que somados aos empregos indiretos ocupa 3,2 milhões de pessoas (GUERRA; MEDEIROS, 2007). No Brasil, a população de equídeos é a quarta maior do mundo, estimada atualmente em 7.986.023 cabeças, sendo 5.541.702 equinos, 1.130.795 asininos e 1.313.526 muares (IBGE, 2008) incluindo os cavalos de passeio, exposição e os utilizados em trabalho a campo.

O cavalo não é um animal para produção de carne ou leite como os bovinos, mas é indispensável no manejo da pecuária de corte e mista. Antigamente os equinos desempenhavam apenas as funções de sela, carga e tração, hoje são utilizados para lazer, segurança de pessoas na área urbana e em atividades esportivas, como nas competições de marcha, no hipismo, em jogos de pólo entre outros. Os equinos também têm grande destaque no aspecto social, como nos casos da equoterapia, para tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócio-afetiva. Além de todas essas atividades o agronegócio equino também é fornecedor de insumos, produtos e serviços para a criação, como medicamentos, rações, selas e acessórios, e também no ensino e pesquisa.

Para ampliar o uso do cavalo nessas e em outras áreas, é desejável que o número de equinos aumente, o que pode contribuir para isso são as biotécnicas da reprodução.

Em equinos, desde o momento que se estabeleceram as primeiras gestações por inseminação artificial (IA), em 1898, diversas técnicas de reprodução assistida vêm sendo desenvolvidas e utilizadas, visando o melhor aproveitamento genético de animais de alto valor zootécnico. Em relação às éguas, a transferência de embriões (TE) é uma das técnicas de maior destaque na expansão da equideocultura, possibilitando a produção de maior número de produtos de uma mesma égua em um ano, aumentando assim o número de animais de alto valor genético. Embora a TE seja uma biotécnica já consolidada, existe ainda a possibilidade de incremento de seus índices, visto que, diversos são os fatores que influenciam o resultado final. A fertilidade, idade, ambiente uterino, grau de sincronia entre doadora e receptora, dia da coleta e transferência do embrião, além dos fatores relacionados ao macho tais como: qualidade e o tipo de sêmen (fresco, resfriado ou congelado) devem ser levados em conta no momento da implantação de um programa de TE, pois afetam de forma considerável os resultados.

Na indústria eqüina, em geral, existe um mercado interessado em promover o aumento da eficiência reprodutiva de seus animais de alto valor. O controle hormonal do momento da ovulação pode ser usado como uma ferramenta para otimizar os parâmetros reprodutivos e reduzir os custos do programa de TE. O uso de agentes indutores é capaz de elevar a taxa de concepção, visto que a chance de fertilização do oócito aumenta quanto mais próxima da ovulação à cobertura ou inseminação ocorrer. A utilização desses fármacos também permite um maior grau de sincronia entre doadora e receptora de embriões, o que pode contribuir para a melhora dos índices da TE.

Os hormônios comumente utilizados como indutores da ovulação em éguas, incluem a Deslorelina que é um análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) ou a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).

Considerando a ampla utilização desses hormônios em programas de reprodução eqüina e a escassez de informações sobre sua influência nas taxas de recuperação embrionária

e gestação, o presente estudo teve por finalidade comparar a eficiência de doses mais baixas do que as recomendadas de hCG e Deslorelina como agentes indutores da ovulação, verificar o tempo entre a indução e a ovulação, as taxas de recuperação embrionária e gestação, em um programa de transferência de embriões, visando a melhora dos índices reprodutivos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ciclo Estral da Égua

As éguas são classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais (McKINNON; VOSS, 1993). A atividade sexual sazonal é determinada pelo fotoperíodo (relação luz/escuro), e sua interação com os fatores ambientais (principalmente temperatura) que, de alguma maneira, estabelecem as condições nutricionais das éguas (FITZGERALD; McMANUS, 2000).

A maioria das éguas apresenta atividade sexual quando ocorre um aumento na duração da luminosidade diária (TAROUCO, 1992), ou seja, durante a primavera e o verão (fase denominada de estação de monta), enquanto que durante o final do outono e o inverno (estação de anestro) apenas algumas éguas são cíclicas (DAELS; HUGHES, 1993).

Porém além do fotoperíodo a condição nutricional das éguas tem importante participação na manifestação e regularidade dos ciclos estrais. 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, 1992).

As mudanças na duração dos dias são reconhecidas pelos receptores de luminosidade do nervo óptico, que estão ligados a glândula pineal. Esta por sua vez, em resposta ao estímulo modifica a secreção de melatonina provocando transformações apropriadas no hipotálamo (GINTHER, 1992). A baixa secreção de melatonina influencia o eixo hipotálamo – hipofisário – gonadal, onde vai ocorrer um aumento na secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), que é responsável pela produção do Hormônio Folículo Estimulante e Hormônio Luteinizante, que vão atuar nos ovários (MOREL, 2003).

Durante a primavera e verão as éguas possuem ciclos estrais regulares e repetidos, sendo essa denominada de fase de atividade reprodutiva ou ovulatória. A passagem da fase de anestro (ausência de atividade reprodutiva) para a fase de atividade reprodutiva denomina-se de transição de primavera. Sendo caracterizada por alterações ecográficas como ausência de corpo lúteo (CL) e presença de vários folículos com ritmo de crescimento lento. Outra característica da fase de transição é a presença de folículos com diâmetros maiores que 25 mm por mais de 10 dias e/ou folículos em constante crescimento e regressão sem que ocorra ovulação (GINTHER, 1990).

O anestro termina e tem início a fase de atividade reprodutiva quando ocorre a primeira ovulação do ano (ATAYDE, 2008). A ovulação é o resultado da sincronia de eventos comportamentais, anatômicos e endócrinos que representam o ciclo estral (LeBLANC et al., 2003).

O ciclo estral compreende o intervalo que vai de uma ovulação a outra, a duração de um ciclo estral equino varia de 19 a 22 dias (GINTHER, 1992). Pode ser dividido em duas fases: estro e diestro (SAMPER, 2008).

O estro, também conhecido como fase folicular ou estrogênica tem a duração média de 5-7 dias, mas pode variar bastante entre éguas, é caracterizado pela presença de um folículo dominante de 30 mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de

estrógenos pelas células da granulosa, tornando a fêmea receptiva ao macho além da formação do edema uterino (SAMPER, 2008). A presença do garanhão é o melhor meio para detectar o cio, e a maioria das éguas, além de permanecer voluntariamente junto do garanhão (LeBLANC et al., 2003) permite a aproximação e cobrição (SAMPER, 2008). Nesta fase, o comportamento da égua perante o garanhão incluem a elevação da cauda e adoção de posição de urinar mantida por longo período de tempo e sem evidência de esforço, movimentos repetidos dos lábios vulvares com eversão do clitóris, agachamento e frequente eliminação de urina (normalmente com um odor característico e aparência amarela opaca) (LeBLANC et al., 2003). Anatomicamente, na fase de estro, a égua apresenta relaxamento do útero e cérvix, presença de um folículo de grande dimensão (dominante) e edema endometrial (SAMPER, 2008).

A ovulação geralmente ocorre de 24 a 48 horas antes do final do estro, e corresponde ao ciclo, ao dia zero (MOREL, 2003).

A ovulação dá início ao período de diestro (fase lútea ou progesterônica) que se caracteriza por uma ativa resistência ao garanhão e formação de corpo lúteo, com maior secreção de progesterona (HUGHES et al., 1972, ALLEN, 1977, ROOSDALE; RICKETTS, 1980, DAELS; HUGHES, 1993). Nesta fase o ambiente uterino permite condições adequadas ao desenvolvimento embrionário (DAELS; HUGHES, 1993; MALINOWSKY, 2002). O diestro dura aproximadamente 15 dias (SAMPER, 2008), e durante esse período, na presença do garanhão, a égua baixa as orelhas, mostra os dentes e morde, escoiceia e afasta-se do garanhão (LeBLANC et al., 2003). No ovário está presente o CL, a cérvix apresenta-se fechada e não se verifica edema endometrial (SAMPER, 2008).

Nos casos em que não ocorre a fecundação, a fase lútea termina 14 a 15 dias após a ovulação, com regressão do corpo lúteo pela ação da prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) sintetizada pelo endométrio, e tem início um novo estro. Caso ocorra a fecundação, o embrião chega ao útero por volta do sexto dia após a ovulação, onde migrará com intuito de realizar o reconhecimento materno até que ocorra a nidação ao redor do décimo oitavo dia pós-ovulação. A regressão do CL só vai ocorrer ao redor dos 120 dias de gestação, quando a placenta vai ser responsável pela produção de progesterona (DAELS; HUGHES, 1993, MALINOWSKY, 2002).

## **2.2 Controle Endócrino da Função Ovariana**

As alterações no trato genital feminino, bem como o comportamento sexual são controlados através de interações complexas dos hormônios hipotalâmicos, hipofisários, ovarianos e uterinos (McKINNON; VOSS, 1993).

A atividade ovariana das éguas é determinada pelo fotoperíodo, os raios solares (fótons) incidem sobre a retina ocular, estimulando seus receptores (rodopsina) que enviam mensagens para a glândula pineal (REITER, 1973). A glândula pineal é responsável pela síntese e secreção de melatonina (N-acetil 5-metoxitriptofano) a partir do aminoácido triptofano presente na circulação (LINCORN, 1987). A melatonina é um hormônio que, nos animais que se acasalam durante fotoperíodos longos, exerce um efeito depressor ou antigonadal nos ovários, através da inibição da liberação do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (GINTHER, 1992). A taxa de síntese deste hormônio parece ser inversamente relacionada com a duração da luminosidade ambiental diária. Assim, durante o estímulo luminoso a taxa de liberação de norepinefrina na pineal está diminuída, inibindo a síntese e secreção de melatonina, acarretando a liberação do GnRH pelo hipotálamo que estimula a liberação dos Hormônios Folículo Estimulante (FSH) e

Luteinizante (LH) pela hipófise anterior, desencadeando alterações nos ovários (SHARP, 1980; NEELY, 1983; GINTHER, 1992).

Além desses hormônios os folículos ovarianos, corpo lúteo, córtex da adrenal, placenta e unidade fetoplacentária produzem os esteróides que podem ser divididos em estrógenos, progestágenos e andrógenos. Outros hormônios com funções importantes na reprodução da fêmea incluem inibina, ocitocina, prostaglandinas e relaxina (McKINNON; VOSS, 1993).

### **2.2.1 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)**

O GnRH é um decapeptídeo (10 aminoácidos) sintetizado e armazenado na base do hipotálamo. Este hormônio é responsável pela conexão entre o sistema nervoso e endócrino. A liberação de pulsos de GnRH através do sistema porta hipofisário estimula a síntese e liberação de FSH e LH pela hipófise anterior (HAFEZ; HAFEZ, 2000), os quais vão atingir os ovários através do sistema circulatório (McKINNON; VOSS, 1993). A frequência dos pulsos de GnRH é mediada através da liberação da melatonina. Uma baixa frequência ocorre durante o anestro devido a alta concentração de melatonina já que a luminosidade é menor nos períodos de outono e inverno. A frequência da liberação de GnRH também se encontra diminuída durante o diestro como resultado do *feedback* negativo exercido pelas elevadas concentrações de progesterona. A liberação de gonadotrofinas pela hipófise anterior é mediada pela frequência dos pulsos de GnRH (KNOTTENBELT et al., 2003).

### **2.2.2 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)**

O FSH é o hormônio responsável pelo crescimento dos folículos ovarianos ou de Graaf. Este hormônio na presença do LH estimula a produção de estrógeno (HAFEZ; HAFEZ, 2000) através de sua ligação às células da granulosa, inclusive dos folículos pré-antrais e o estradiol por sua vez estimula a produção de mais células da granulosa e aumenta a sensibilidade às gonadotrofinas. Sendo assim, o FSH através do estrógeno é um potente estimulante folicular (GINTHER, 1992).

A secreção de FSH é estimulada pelo comprimento do dia e suprimida pelo estrógeno e a inibina, hormônio liberado pelos folículos em desenvolvimento. Durante o ciclo estral a concentração de FSH é bifásica, com picos de 10 a 12 dias de intervalo. O primeiro pico de FSH ocorre próximo do final do estro e coincide com o pico de LH próximo ou após a ovulação. O segundo pico se dá na metade do diestro, aproximadamente 10 dias antes da próxima ovulação (EVANS; IRVINE, 1975), quando a atividade folicular encontra-se baixa, em teoria este pico é responsável pelo desenvolvimento de uma nova onda folicular a qual originará o folículo ovulatório durante o próximo estro (KNOTTENBELT et al., 2003).

Assim que o folículo em crescimento atinge o tamanho pré-ovulatório, produz um hormônio protéico, inibina, que inibe a secreção hipofisária do FSH. A ação inibitória da inibina sobre o FSH combinado com o efeito estimulatório do estrógeno na secreção do LH, cria o ambiente requerido para a maturação final do folículo de Graaf (alta secreção de LH) e previne posterior desenvolvimento de folículos imaturos (baixa secreção de FSH). A inibina não atua sobre os níveis de LH (BERGFELT; GINTHER, 1985).

### **2.2.3 Hormônio Luteinizante (LH)**

O LH é um hormônio glicoproteico composto de uma sub-unidade alfa e uma beta com peso molecular de 30.000 daltons e uma meia vida biológica de 30 minutos. Os níveis

tônicos e basais atuam em conjunto com o FSH na secreção ovariana de estrógeno. O limiar pré-ovulatório é responsável pela ruptura da parede do folículo e ovulação (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

As concentrações plasmáticas de LH são baixas nos dias 6 a 15 após a ovulação devido a ação do *feedback* negativo da progesterona no hipotálamo, causando a supressão do GnRH. O LH é considerado um agente luteotrófico, ou seja, responsável pelos processos da formação e manutenção do Corpo Lúteo (C.L.). Após a luteólise, ou seja, destruição do C.L. pela PGF<sub>2</sub>α liberada pelo útero, os níveis de LH começam a aumentar próximo ao início do estro (dia 17), quando não existe efeito da progesterona e provavelmente ao estímulo positivo do estrógeno na frequência do pulso de GnRH. O pico de LH ocorre 2 dias após a ovulação e então declina lentamente nos próximos 4 a 5 dias, voltando a valores mínimos durante a fase de diestro (KNOTTENBELT et al., 2003).

#### **2.2.4 Estrógeno**

As concentrações de estrógeno folicular atingem o pico 1 a 2 dias antes da ovulação. Após esta ocorrer, as concentrações deste hormônio, declinam até atingir níveis básicos de diestro, em 2 dias. Na ausência de progesterona (concentrações < 1ng/mL), o estrógeno secretado pelo folículo pré-ovulatório induz a receptividade sexual, relaxamento da cérvix e vulva, estimula produção de secreções do trato genital, permite a passagem e o transporte espermático, além de ter um papel importante na maturação folicular e ovulação (McKINNON; VOSS, 1993).

Quando estrógenos conjugados na urina são usados como parâmetro para avaliar a secreção ovariana, sugere que um segundo pico deste hormônio pode ocorrer durante o diestro, devido a presença de muitos folículos de tamanho médio durante esta fase. Ao final do diestro, estes folículos entram em atresia, contribuindo com o decréscimo do estrógeno durante a luteólise. Estudos sugerem que o CL pode também ser um menor contribuinte dos níveis de estrógeno durante a fase luteal (DAELS et al., 1991).

#### **2.2.5 Inibina**

Inibina é um hormônio gonadal não esteróide hidrófilo que regula o FSH através de *feedback* negativo (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Este hormônio glicoprotéico é composto de subunidades a e b (HAFEZ; HAFEZ, 2000; SENGGER, 2003) produzidas pelas células da granulosa de mamíferos durante a fase folicular (NAMBO et al., 2002). Atuam na pituitária como um sinalizador químico inibindo a liberação de FSH sem alterar a concentração de LH, conseqüentemente controla o desenvolvimento folicular (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

A manutenção do FSH em altas concentrações durante a fase folicular pode evitar a atresia dos folículos menores, e com isso resultar em múltiplas ovulações (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Algumas tentativas supressoras de inibina para indução de múltiplas ovulações em éguas têm sido estudadas, com o intuito de impedir o seu efeito através da imunoneutralização de inibina, que consiste na utilização de fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade - a, o que promove o bloqueio do mecanismo de *feedback* negativo da liberação de FSH, permitindo a elevação dos níveis de FSH endógeno durante a fase folicular (McKINNON et al., 1992).

### 2.2.6 Progesterona

Progesterona (P4) é um hormônio esteróide secretado pelo corpo lúteo, placenta e glândula adrenal. Este hormônio é transportado para a corrente sanguínea ligado a globulina, do mesmo modo que os andrógenos e os estrógenos (HAFEZ; HAFEZ, 2000). A concentração durante o estro encontra-se inferior à 1ng/mL (normalmente < 0,5 ng/ml). Após 24 a 48 horas da ovulação esta concentração eleva-se progressivamente, atingindo valores máximos em diestro (4 a 22 ng/mL) entre os dias 5 a 7 pós ovulação, permanecendo elevado durante a fase luteal (6 a 10 ng/ml) e declina rapidamente como consequência da regressão do corpo lúteo ao redor do 14º ou 15º dia do ciclo até atingirem os valores baixos, correspondente ao período de estro (GINTHER, 1992).

A progesterona inibe o comportamento de cio, mantém a cérvix fechada e prepara o endométrio para implantação e manutenção da gestação aumentando a atividade secretora das glândulas endometriais e inibindo a motilidade do endométrio; inibe o estro e o pico pré-ovulatório de LH, entretanto em contraste com outras espécies, não inibe completamente a foliculogênese e ovulação, podendo, durante a fase luteal, os folículos continuarem a crescer e ovular com níveis elevados de progesterona. Com isso, a progesterona é um importante regulador do ciclo estral (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

### 2.2.7 Prostaglandina

As prostaglandinas são secretadas por quase todos os tecidos do organismo. São classificadas como ácido graxo insaturado com um anel de ciclopentano. O ácido aracdônico, um ácido graxo essencial, é precursor das prostaglandinas PGF<sub>2</sub>α e PGE<sub>2</sub> (HAFEZ; HAFEZ, 2000). Este por sua vez é liberado na forma livre como resultado da hidrólise da membrana fosfolipídica pela enzima fosfolipase A (PLA). O ácido aracdônico é então convertido em prostaglandina e componentes relacionados à via ciclo-oxigenase, utilizando uma enzima do complexo microsomal denominada de prostaglandina sintetase. A PGF<sub>2</sub>α e PGE<sub>2</sub> são duas prostaglandinas intimamente relacionadas à reprodução, sendo liberadas no trato reprodutivo em função de estímulos endócrinos, neurais e físicos (ALLEN; COOPER, 1993).

A PGF<sub>2</sub>α atua como hormônio luteolítico primário em éguas, modulando a fase luteal, a função e a duração do ciclo estral em éguas. O aumento da liberação uterina de PGF<sub>2</sub>α está relacionado com a luteólise durante o ciclo estral. Na égua a liberação de PGF<sub>2</sub>α ocorre entre 14 e 17 dias pós-ovulação e o primeiro pulso de PGF<sub>2</sub>α precede o primeiro declínio dos níveis de progesterona, cerca de 4 horas e é seguida por uma liberação adicional de PGF<sub>2</sub>α durante e após a de luteólise (NEELY et al., 1979; STABENFELDT et al., 1972). As concentrações de P4 regridem a valores basais (i.e., < 1ng/mL) dentro de 24 e 48 horas, mas a liberação substancial pulsátil de PGF<sub>2</sub>α se mantém por 1 a 2 dias após a luteólise completa (ALLEN; COOPER, 1993).

Estudos recentes indicam o envolvimento da progesterona, estrógeno e ocitocina na liberação da PGF<sub>2</sub>α. Éguas ovariectomizadas tratadas com progesterona por 14 dias tiveram níveis aumentados desta prostaglandina no lúmen uterino. Acredita-se que uma prolongada exposição uterina à progesterona é necessária para a liberação, provavelmente pela produção de um sistema enzimático de síntese de PGF<sub>2</sub>α ou recrutamento de precursores. Tecido endometrial de éguas em diestro produziram grande quantidade deste hormônio *in vitro* na presença de estradiol. Éguas ovariectomizadas durante o final da fase luteal, tratadas com estradiol tiveram maior produção de PGF<sub>2</sub>α. O estrógeno talvez esteja envolvido no processo enzimático da produção desta prostaglandina e parece requerer um pequeno tempo de

exposição. Receptores da ocitocina aumentam no endométrio no final da fase luteal; o tecido endometrial responde a produção de  $\text{PGF}_2\alpha$  na presença de ocitocina *in vitro* e os níveis circulantes deste hormônio aumentam durante a luteólise (GINTHER, 1992).

A  $\text{PGE}_2$  tem papel importante no transporte de gametas e do embrião pelo controle da função da musculatura lisa do oviduto (WOODS et al., 2000). O embrião eqüino secreta quantidades detectáveis de  $\text{PGE}_2$  quando atinge o estágio de desenvolvimento de mórula compacta no dia 5 após a ovulação. Esse hormônio age localmente relaxando as fibras da musculatura circular lisa na parede do oviduto, permitindo um movimento progressivo rápido e entrada do embrião no útero 24 horas depois (ALLEN, 2001). A atividade eletromiográfica do oviduto da égua é estimulada pela administração intramuscular de  $\text{PGE}_2$  (TROEDSSON et al., 1995) e a administração local de  $\text{PGE}_2$  induz o relaxamento da musculatura circular do istmo do oviduto (WEBER et al., 1995).

### 2.3 Crescimento Folicular (Foliculogênese)

O crescimento folicular é um processo contínuo que acontece durante toda a vida reprodutiva das fêmeas, independente do seu estado fisiológico (DONADEU; GINTHER, 2002). Pode ser dividido em dois períodos: o primeiro ocorre independente da regulação hormonal e é quando os folículos primordiais começam a crescer. As células foliculares se dividem e multiplicam-se para diferenciar-se em células da teca e da granulosa. Ao mesmo tempo, os oócitos começam a maturar e aumentar de tamanho. Após várias semanas de crescimento, a secreção do fluido folicular é iniciada por disjunção das células e o folículo torna-se um folículo antral. Nesse momento se inicia um segundo estágio do crescimento folicular que se chama onda folicular, que ocorre uma vez por ciclo na maioria das éguas (CHAVATTE; PALMER, 1998).

A ativação dos folículos primordiais é necessária para que ocorra a passagem dos folículos quiescentes em uma reserva, para o pool de folículos em crescimento (RUSSE, 1983). O primeiro sinal desta ativação é o retorno da proliferação das células da granulosa, aumento do tamanho do oócito, ocorrendo a passagem do estágio de folículo primordial para o de folículo primário (HIRSHFIELD, 1985). O desenvolvimento folicular é caracterizado pela diferenciação e proliferação das células da granulosa. A formação de múltiplas camadas de células foliculares cúbicas indica a transformação de folículo primário em secundário. Acompanhando este processo está a formação da zona pelúcida ao redor do oócito. Folículos primários e secundários também são denominados como folículos pré-antrais (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, existem evidências de que o desenvolvimento de folículos pré-antrais independe da ação das gonadotrofinas, cuja participação é fundamental em estágios posteriores deste processo (MONNIAUX et al., 1997).

Quando os folículos ovarianos atingem aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro ocorre o desenvolvimento de um antro. Junto a esse processo, uma bainha de células, conhecidas como células da teca, forma-se ao redor das células da granulosa. As células da teca formam duas subcamadas: a teca externa, a qual está constituída, quase que totalmente, por tecido conjuntivo e a teca interna a qual é a camada vascular interna. Enquanto ocorre nova proliferação de células da granulosa, estas células se organizam em múltiplas camadas ao redor do oócito, formando o “cúmulus oóphorus”. Os principais produtos secretados pelas células da teca são os andrógenos esteróides, enquanto isso, as células da granulosa produzem

estrógeno e inibina. Todos estes eventos indicam a transição de folículo secundário a terciário, o qual inicia novo desenvolvimento, até ser eleito à ovulação (KENNEY et al., 1979).

## 2.4 Dinâmica Folicular

Dinâmica folicular é o processo contínuo de crescimento e regressão folicular que ocorre nos ovários das éguas, o qual é diretamente influenciado por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo. O termo “onda folicular” compreende um conjunto de fenômenos foliculares que obedecem à seguinte sequência: recrutamento, seleção, dominância e ovulação, em associação com a atresia dos folículos subordinados (GINTHER; BERGFELT, 1993; DRIANCOURT, 2001).

Durante o recrutamento, ocorre o crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela fase de seleção, na qual um ou alguns folículos mantêm o padrão de crescimento, em detrimento dos demais que começam um processo de regressão ou atresia. Nas espécies monovulatórias, normalmente, o folículo que continua a crescer é considerado dominante (fase de dominância); este secreta elevada quantidade de estrógeno e é sensível ao estímulo ovulatório desempenhado pela liberação do LH (DRIANCOURT, 2001). A concentração plasmática de estradiol começa a se elevar entre 5 a 7 dias antes da ovulação, atingindo pico 24 a 48 horas antes da ovulação (PYCOCK et al., 1995), quando começa a reduzir em sincronia com o pico de LH, isso mostra um impacto negativo do LH ao estradiol (JACOB et al., 2009)

A emergência de uma onda está associada ao surgimento do hormônio FSH (GINTHER et al., 2003), 7-11 folículos (representados por folículos de 6 mm de diâmetro) entram em uma fase comum de crescimento (GINTHER et al., 2001; et al., 2005). O futuro folículo dominante emerge em média, nas éguas, um dia mais cedo do que o futuro folículo subordinado (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001), com isso o dominante atinge 6 mm antes do futuro maior folículo subordinado e mantém uma média de 3 mm diâmetro de vantagem até o início do desvio (GINTHER, 2000). O pico da concentração de FSH ocorre quando o maior folículo atinge, aproximadamente, 13 mm de diâmetro e, então essa concentração começa a declinar (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2005).

O crescimento paralelo dos folículos finaliza quando o maior folículo alcança um diâmetro de 22 mm (GINTHER, 2000; MACHADO, 2002), e o segundo maior folículo alcança 19 mm com o desvio começando em 6,2 dias depois da emergência dos folículos de 6 mm. Ao final da fase de crescimento comum, uma mudança na taxa de crescimento tem início. Esse processo é conhecido como divergência e tem início quando o diâmetro dos dois maiores folículos tem em média 22,5 mm e 19,0 mm (GASTAL et al., 1997; et al., 1999; GINTHER et al.; 2004). O desvio entre as taxas de crescimento entre o futuro folículo dominante e os subordinados é um evento crucial durante a seleção do folículo ovulatório. Esse desvio coincide com a redução dos níveis de FSH e é precedido pelo aumento nas concentrações de LH (BERGFELT, 1998; GASTAL et al., 2000).

Com a diferenciação entre o folículo dominante e os subordinados, o folículo dominante adquire a capacidade de refratariedade aos níveis decrescentes de FSH, desencadeados pelo mesmo e por supressores do desenvolvimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994). Sendo assim, o futuro folículo dominante encontra-se apto a suprimir os níveis de FSH a concentrações inferiores as necessárias ao crescimento dos folículos subordinados e adquire a habilidade de utilizar baixas concentrações de FSH para prosseguir o seu desenvolvimento (GINTHER, 2000). Frente à diminuição dos níveis de FSH circulantes, a aquisição de receptores para LH pelas células da granulosa e as mudanças na vascularização

folicular e no sistema IGF parecem ser fundamentais para a continuação do crescimento e diferenciação celular resultando em ovulação (FORTUNE, 2001).

Após a divergência, o desenvolvimento do folículo dominante mantém uma taxa de crescimento constante até um ou dois dias antes da ovulação. Os folículos remanescentes (folículos subordinados) crescem a uma taxa reduzida e regridem (GASTAL et al., 2006).

#### **2.4.1 Ondas foliculares**

As éguas podem apresentar uma ou duas ondas foliculares, havendo uma maior predisposição a uma única onda, iniciando na metade da fase luteal (GINTHER, 1990). Porém, em torno de um terço das éguas pode ocorrer o desenvolvimento de outra onda folicular iniciada rapidamente após a ovulação (GINTHER, 1992). Há trabalhos que indicam tendência a duas ondas foliculares na primeira metade da estação reprodutiva e uma maior tendência a uma onda folicular na segunda metade da estação reprodutiva (PIERSON; GINTHER, 1987; GINTHER; PIERSON, 1989; GINTHER, 1990).

As éguas apresentam ondas maiores (caracterizadas por folículos dominantes e subordinados) e ondas menores (onde o maior folículo não atinge o diâmetro de um folículo dominante) (GINTHER, 2000), posteriormente as ondas maiores foram subdivididas em ondas primárias, cujo folículo dominante inicia o seu desenvolvimento na metade do diestro e ovula durante o estro e ondas secundárias, que apresentam folículo dominante que inicia seu desenvolvimento no final do estro, momento antes da ovulação, podendo ou não ovular no diestro, sendo denominada ovulação de diestro. (EVANS, 2003).

Ginther et al. (2003) demonstraram que os maiores folículos das ondas menores alcançam diâmetro inerente a divergência folicular (22,8 mm), mas, depois disso, param de crescer.

Ondas ovulatórias com dois folículos dominantes ocorreram em 8/11 ciclos estrais, a divergência entre o maior e o segundo maior folículo foi 2,5 dias após a primeira (JACOB et al., 2009)

As concentrações de LH no início da divergência foram maiores no momento correspondente às ondas maiores do que no período das ondas menores, concluindo que o futuro folículo dominante necessita de um estímulo adicional do LH no início da divergência folicular e também indica que o LH fornece o estímulo para conversão de uma onda menor para uma onda folicular maior (GINTHER et al., 2003).

Estudos não encontraram uma base hormonal para o desenvolvimento de dois folículos dominantes em éguas. Ondas com um versus dois folículos dominantes (sem dupla ovulação) tinham concentrações plasmáticas semelhantes de LH, estradiol e inibina, porém as concentrações de FSH foram menores em éguas com dois folículos dominantes (JACOB et al., 2009).

A ocorrência de dois folículos dominantes em uma onda ovulatória tem sido em torno de 20% na raça bretã (GINTHER et al. 2004). Essa incidência parece ser menor em éguas pequenas (pônei) uma vez que não foram observados dois folículos dominantes em 36 períodos periovulatórios (GINTHER et al., 2009a; JACOB et al., 2009).

#### **2.4.2 Ovulação**

O processo ovulatório resulta das interações entre o LH e o AMPcíclico, prostaglandinas e enzimas proteolíticas (GINTHER, 1992). A ovulação na égua ocorre na fossa ovulatória que se localiza no bordo côncavo ou ventral do ovário. Um folículo

recentemente ovulado é palpado como uma profunda depressão na superfície do ovário. Preenche-se com sangue oriundo da ruptura dos vasos da membrana basal e luteinização das células da granulosa, dentro de 8 a 14 horas, após a ovulação ocorrer (HUGHES et al., 1972).

A ovulação é o evento no qual ocorre a liberação do ovócito, acontece aproximadamente 24 a 48 horas antes do fim do estro (DAELS; HUGHES, 1993). Em estudo realizado por Hughes e colaboradores (1975) verificou que 59% das éguas, ovularam dentro das 24 horas antes do final do estro e 7% fora deste, indicando uma estreita relação entre ovulação e final da receptividade sexual. Em outro estudo, foi observado ovulações antes do final do estro em 46% com 24 horas e 44% com 48 horas, e 10% fora do estro (WITHERSPOON; TALBOT, 1970). Quanto ao horário da ovulação, um dos primeiros estudos mostraram que a maioria das ovulações (92%) ocorreram entre 23:00 e 07:00 horas (GINTHER, 1974), porém distribuição equivalente entre o dia e a noite já foram constatadas (GREENNHOFF; KENNEY, 1975; PALHARES, 1988)

A utilização da consistência folicular tem sido defendida por alguns pesquisadores e questionada por outros, por não ser uma avaliação suficientemente segura em prever o momento da ovulação (SAMPER, 1997). A determinação do momento da ovulação pode ser apoiada pela detecção de cio, pela consistência e tamanho do folículo pré-ovulatório através da palpação retal, e pela aparência do folículo e edema uterino a nível ecográfico (SAMPER, 1997; ENGLAND, 2005). Um distinto amolecimento do folículo ocorre cerca de 24 horas antes da ovulação, e com ligeira pressão da probe do ultrassom apresenta-se ligeiramente achatado. O aparecimento de edema uterino durante os primeiros dias de estro (SAMPER, 2008) e o seu desaparecimento que ocorre cerca de 24 horas antes da ovulação (ENGLAND, 2005) são fenômenos progressivos na maioria das éguas (SAMPER, 2008). Após o pico de estrógeno e com a aproximação da ovulação, a intensidade do edema começa a diminuir até ser inexistente na presença de progesterona (SAMPER, 1997).

Pierson e Ginther (1985) concluíram que o folículo pré-ovulatório cresce em média até 45,2 mm com uma taxa de crescimento diário de 2,7 mm, já Ivkov e colaboradores (1999) verificaram que a dimensão média atingida pelo folículo pré ovulatório um dia antes da ovulação é de 41,75 mm ( $\pm$  4.72 mm). A ovulação pode ocorrer nas éguas a partir de folículos pré-ovulatórios com diâmetro entre 34 e 70 mm (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2008). Por outro lado, Samper (1997) afirma que muitas éguas ovulam de folículos entre 40 e 45 mm de diâmetro apresentando uma consistência flácida. Entretanto, algumas éguas podem ovular com um folículo de 35 mm de diâmetro e com a consistência firme, considerando que outras não ovularão até que o folículo atinja 50 mm, podendo ainda esse folículo se transformar em um folículo hemorrágico (SAMPER, 1997).

Desse modo o diâmetro folicular é utilizado para estimar o momento em que a égua vai ovular, e grande parte ovula quando as dimensões estão entre os 40 e 45 mm, no entanto, muitas éguas ovulam fora destes limites e pode-se perder um ciclo se for considerado apenas este intervalo (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2008). Por isso, além de ter em conta o diâmetro do folículo pré ovulatório, podem-se considerar outras alterações características com o aproximar da ovulação: aumento do tamanho, alteração da forma, diminuição da pressão interna do folículo e separação das camadas da parede folicular além da ausência de tonicidade da cérvix (BRAGG et al., 2001).

Com relação a sensibilidade à palpação, esta é variável de acordo com a égua, a qual pode demonstrar vários graus de sensibilidade, sendo esses: elevação do membro próximo ao abdômen, movimentação das patas ou da cabeça em direção ao examinador. Eventualmente sinais temporários de cólica severa podem estar associadas a ovulação (GINTHER, 1992).

O aumento prolongado do LH, que promove a ovulação, também estimula as células da granulosa a se transformarem em células luteínicas, que invadem e proliferam no coágulo produzido dentro da cavidade folicular, para assim formar o corpo lúteo (McCRACKEN et al., 1999).

Geralmente as éguas ovulam de apenas um folículo durante um mesmo ciclo estral, porém, um segundo ou terceiro folículo podem ovular no período de estro. O intervalo dessas ovulações é comumente de 24 horas (sincrônicas) e quando excedem esse período são denominadas assincrônicas (HUGHES et al., 1975; DESKUR, 1985).

A incidência de ovulações múltiplas encontrada na literatura é bastante divergente, variando de 0,8% a 42,8%. Estas diferenças podem ser atribuídas a fatores como raça, repetibilidade, “status reprodutivo”, idade e a metodologia empregada para a sua identificação, sejam materiais de matadouro, palpação retal ou ultra-sonografia (GINTHER, 1992). O mesmo autor compilando vários dados da literatura cita uma maior incidência (15 a 22%) para as raças Puro Sangue Inglês e éguas de Tração, menor para as raças Appaloosa e Pônei (8 a 11%) e intermediária para a raça Trotadores (13 a 15%). Para a raça Árabe, encontrou-se uma incidência de apenas 0,8% (PIMENTEL et al., 1995).

## **2.5 Indução da Ovulação e Agentes Indutores**

Existem dois procedimentos muito comuns no manejo de éguas, um envolve a indução da luteólise e o outro a indução da ovulação (SAMPER, 2008). Devido à grande variação na duração do estro e no intervalo de ovulação entre as éguas, a indução farmacológica da ovulação é uma importante ferramenta para o manejo reprodutivo (BEREZOWSKI et al., 2004).

A indução da ovulação é uma importante ferramenta para qualquer atividade da reprodução equina (SAMPER et al., 2002). É rotineiramente usada em casos onde o garanhão apresenta alta requisição, quando o número de doses de sêmen disponível é limitada, ou se uma única inseminação é desejada, como em casos de éguas susceptíveis a endometrites (McCUE et al., 2007); permite realizar apenas um pedido de sêmen por ciclo para garanhões muito requisitados, planejar o transporte da égua, no caso da cobertura ser no local onde está o garanhão, além de reduzir os custos com veterinário (SAMPER, 2008). A indução da ovulação melhora as taxas de gestação ao utilizar sêmen resfriado, congelado ou de baixa qualidade, próximo do momento da ovulação, reduz o número de inseminações necessárias por ciclo, resultando em um programa reprodutivo mais eficiente (SAMPER et al., 2002). Também pode ser benéfica em inseminações com baixa dose na extremidade do corno (KOLLING; ALLEN, 2005) e também para a sincronização da ovulação entre doadoras e receptoras de embrião (McCUE et al., 2007).

Outro fato muito importante em que a indução da ovulação pode fazer a diferença é porque a longevidade do oócito é de 18 horas (LOOMIS; SQUIRES, 2005), muito curta quando comparada com a longevidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da égua que pode ser de 24 horas até 7 dias (MOREL, 1999; PYCOCK, 2008). No entanto, quando se trata de sêmen congelado, a sua longevidade no trato reprodutivo da égua é reduzida (TROEDSSON et al., 1998; SAMPER, 2001; PYCOCK, 2008). Para maximizar as taxas de gestação quando se utiliza sêmen fresco, a inseminação deve ser realizada nas 48 horas que precedem a ovulação. Quando se pratica IA com sêmen refrigerado, esta deve ser realizada nas 12-24 horas antes da ovulação, e no caso de ser sêmen de garanhões subfêrteis (SAMPER, 1997) ou sêmen congelado, os melhores resultados são alcançados se a inseminação for feita nas 12 horas que antecedem a ovulação e até 6 horas depois da ovulação (SAMPER, 2008).

O momento adequado para a realização da prática da indução da ovulação, consiste na utilização dos agentes indutores quando a égua apresentar um folículo  $\geq 35$  mm, momento esse em que o folículo encontra-se responsivo ao LH (PALMER, 1993). Após a indução da ovulação, a maioria das éguas irão ovular em um período entre 36 e 48 horas após a indução, demonstrando uma variação individual acentuada, a qual pode estar relacionada ao diâmetro que cada égua ovula (SAMPER, 1997).

Os fármacos mais utilizados para induzir as ovulações eqüinas são a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), sendo também utilizado o extrato de pituitária eqüina (EPE), o hormônio luteinizante equino (eLH) (CHAVATTE; PALMER, 1998).

### **2.5.1 Deslorelina - Hormônio liberador de Gonadotrofina (GnRH)**

O uso do GnRH e seus análogos no controle do ciclo estral de éguas vem sendo avaliado, permitindo um aumento nos níveis de LH por 12 a 24 horas após a administração do fármaco (BERGFELT, 2000).

A maioria dos análogos são produzidos pela substituição e/ou remoção dos aminoácidos da molécula natural de GnRH. A deslorelina é um análogo do GnRH produzido pela substituição da glicina na posição 6 pelo triptofano, retirando a glicina da posição 10 e adicionando uma amida na prolina da posição 9 (6-D-triptofano-9-(N-etil-L-prolinamida)-10-Desglicinamida LH-RH) que confere uma menor estabilidade estrutural e metabólica aumentando a meia-vida e a ação do análogo (MONAHAN et al., 1973).

A Deslorelina possui duas formas comerciais disponíveis, uma é o Ovuplant, um implante de curta duração que libera 2,2 mg a cada 2 a 3 dias. Este implante é eficiente em aumentar as concentrações de LH e induzir a ovulação em éguas cíclicas (McKINNON et al., 1993; SQUIRES et al., 1994; MUMFORD et al., 1995).

Farquhar et al. (2000) realizaram um estudo avaliando a taxa de indução da ovulação com acetato de Deslorelina em éguas de diferentes idades (2-4, 5-9, 10-14, 15-19 e  $\geq 20$  anos), onde as éguas de 10-14 anos tiveram as maiores taxas de ovulação (98,5%), no entanto as éguas com idade igual ou superior a 20 anos o intervalo entre o tratamento e a ovulação foi menor entre todos os outros grupos (1,7 dias).

O acetato de Deslorelina (1mg i.m.) foi utilizado em éguas com folículos entre 33 a 35 mm (G1) ou 36 a 38 mm (G2) e um grupo controle (G3) com a ovulação não induzida, o intervalo para indução da ovulação das éguas foi em média:  $44,9 \pm 3,1$  horas (G1) e  $45,5 \pm 2,9$  horas (G2) e no grupo controle (G3), as éguas ovularam, em média,  $67,6 \pm 1,9$  horas após a detecção de folículos pré-ovulatórios, e dessa maneira houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle ( $P < 0,05$ ) (MOYA-ARAUJO et al., 2010).

Em estudo realizado por Cox et al. (2009) as éguas foram tratadas com hCG (2000 UI) e Deslorelina (1,5 mg) quando apresentavam folículo de  $28 \pm 2$  mm as ovulações aconteceram em até 48 horas para 58% (7/12) tratadas com hCG e 43% (3/7) tratadas com Deslorelina, não houve diferença significativa entre os dois grupos ( $P > 0,05$ ). Nesse mesmo estudo um grupo foi tratado com hCG (2000 UI) quando as éguas apresentaram folículos com  $35 \pm 2$  mm, e a ovulação foi de 100% (8/8), e neste caso houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre esse grupo e os grupos em que o tratamento foi realizado quando os folículos tinham  $28 \pm 2$  mm.

Mumford et al. (1995) compararam o efeito do número de implantes subcutâneos de deslorelina. As éguas foram tratadas durante 3 ciclos consecutivos com 1, 3 ou 5 implantes de 2,2 mg de deslorelina injetados após a detecção de um folículo de 30 mm. Todas as doses

diminuíram o intervalo entre a indução e a ovulação (4 dias, 2,6 dias, 2,4 dias e 2 dias), aumentaram a proporção de éguas ovuladas em até 48 horas 20%, 83,3%, 73,3% e 85,7%, para o grupo controle 2,2 mg, 6,6 mg e 11 mg, respectivamente ( $P < 0,05$ ), não foi observado nenhum efeito deletério na administração da deslorelina durante três ciclos consecutivos.

Melo et al. (2005) compararam o uso de deslorelina (1 mg i.m.) com o extrato de pituitária eqüina (EPE) (10 mg i.v.) e constataram que ambos os agentes foram eficientes na indução da ovulação, sendo que o período ovulatório após a administração da deslorelina e do EPE, foram respectivamente:  $38,89 \pm 7,38$  e  $34,75 \pm 6,72$  horas, sendo observada diferença estatística entre esses valores ( $P < 0,05$ ).

Kolling e Allen (2005) utilizaram extrato de pituitária eqüina (EPE – 20 mg i.v.), hCG (3000 UI i.v.), Deslorelina Ovuplant (2,1 mg s.c. nos lábios vulvares) e BioRelease Deslorelina (0,75 ou 1,5 mg i.m.) como indutores da ovulação, nos quatro tratamentos 17,5% das ovulações aconteceram em até 24 horas, 80,4% entre 24 e 48 horas e apenas 2,1% ocorreram após 48 horas.

O uso da deslorelina (2,2 mg) foi comparado com o hCG (2500 UI) em um estudo realizado por Samper et al. (2002), no qual as éguas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos e a indução da ovulação realizada quando estas apresentavam edema uterino entre 2 e 4. Os resultados mostraram que o intervalo entre a indução e a ovulação foi maior para as éguas em que se administrou hCG (28 a 96 horas) em relação as que receberam Deslorelina (36 a 42 horas) ( $P < 0,01$ ).

McCue e colaboradores (2007) também comparam o uso de um composto de deslorelina (1,5 mg) com o hCG (2500 UI), onde o intervalo entre o tratamento e a ovulação foi  $3,1 \pm 1,6$  dias para o grupo controle,  $2,0 \pm 0,7$  para o hCG e  $1,9 \pm 0,7$  para deslorelina e o percentual de éguas que ovularam dentro de 48 horas do tratamento foi 36,8%, 88,3% e 90,1% para o controle, hCG e Deslorelina, respectivamente. Houve diferença estatística entre os grupos tratados com hormônios e o grupo controle ( $P < 0,05$ ).

Em estudo, McKinnon et al. (1993) compararam o Ovuplant (2,2 mg) e o hCG (2500 UI), onde o tempo observado pelos autores entre a indução e a ovulação foi de 1,98 dias para as tratadas com Ovuplant e 1,88 dias para as éguas tratadas com o hCG. Meinert et al. (1993) também estudaram o intervalo de tempo entre tratamento e a ovulação, comparando Ovuplant (2,25 mg) e o hCG (3000 à 5000 UI), obtendo 46,9 e 43 horas, respectivamente, resultado próximo ao intervalo de 2,2 dias encontrado por Vanderwall et al., (2001) para os animais tratados tanto com Ovuplant como com o hCG.

O hCG (2500 UI) e um outro análogo do GnRH, à lecirelina (10 mg), foram utilizados para indução da ovulação em jumentas, os hormônios foram utilizados em jumentas divididas em dois grupos, o primeiro apresentava folículos de 30-35 mm e o segundo 36-40 mm. O tempo entre o tratamento e a ovulação não teve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos hormonais, porém o tempo foi reduzido quando os hormônios eram utilizados em jumentas com folículos entre 36-40 mm (CARLUCCIO et al., 2007).

Duas diferentes doses de Deslorelina (750µg (G-D750) e 1000µg (G-D1000)) e o hCG (G-H2500 - 2500 UI) foram utilizados como agentes indutores da ovulação, o diâmetro do folículo no tratamento foi de  $36,6 \pm 0,2$  mm para o grupo controle (G-CN -não tratado);  $36,3 \pm 0,1$  mm para o grupo tratado com 750µg de Deslorelina;  $36,7 \pm 0,2$  mm para o grupo tratado com 1000µg de Deslorelina e  $36,3 \pm 0,1$  mm para o grupo tratado com 2500 UI de hCG, não havendo diferença significativa ( $P = 0,10$ ). Porém, verificou-se diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos experimentais para o diâmetro do folículo ovulatório (G-CN =  $42,9 \pm 0,3$  mm; G-D750 =  $41,2 \pm 0,3$  mm; G-D1000 =  $41,5 \pm 0,3$  mm e G-H2500 =  $41,2 \pm 0,2$  mm;  $P = 0,001$ ), intervalo entre o tratamento e a ovulação (CN = 60,0

$\pm 2,2h$ ; G-D750 =  $46,1 \pm 1,4h$ ; G-D1000 =  $46,2 \pm 1,4h$  e G-H2500 =  $45,7 \pm 1,2h$ ;  $P = 0,001$ ) e taxa de ovulação (G-CN = 61,1% (22/36), G-D750 = 88,9% (32/36), G-D1000 = 89,2% (33/37) e G-H2500 = 88,6% (31/35);  $P = 0,007$ ) (MAIO et al., 2010)

### 2.5.2 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

Gonadotrofina Coriônica Humana foi o primeiro hormônio utilizado como indutor da ovulação em éguas (DAY, 1939). Este hormônio luteinizante se liga aos receptores de LH do ovário induzindo a maturação e a ovulação do folículo dominante das éguas em estro (VOSS, 1993).

Segundo Samper (2008) o hCG é um hormônio proteico com atividade de LH em que a ovulação ocorre aproximadamente 36 horas após o tratamento, mas a sua eficácia é afetada pela fase do ciclo estral, o tamanho e maturidade folicular. Porém Ginther et al. (2009b) sugere que o hCG não seja responsável diretamente pela ovulação, o hCG estaria relacionado com o aumento do LH e este sim seria o responsável pela ovulação, da mesma maneira que ocorre nas ovulações espontâneas.

Ao administrar hCG na presença de um folículo dominante de 35 mm de diâmetro Bragg et al. (2001) avaliaram as alterações no folículo pré-ovulatório e concluiu-se que o hCG acelera a maturação folicular e cria alterações de pressão e histomorfológicas como a separação, na parede folicular. Gastal et al. (2006) também realizaram estudo sobre as alterações foliculares visualizadas no ultrassom após a aplicação do hCG, a partir da hora 0 até 36 horas do tratamento, evidenciou-se um aumento da espessura e ecogenicidade da camada granulosa.

O hCG tem sido utilizado visando a aceleração da ovulação. Dessa maneira aumenta a chance de ser realizado somente um serviço a cada ciclo ovulatório, o mais próximo possível da ovulação (VERONESI et al., 2003). Sua eficiência é amplamente demonstrada na indução da ovulação quando um folículo pré-ovulatório é detectado, a administração do hCG em éguas com um folículo pré-ovulatório de pelo menos 35 mm é capaz de induzir a ovulação em até 48 horas em 80% dos casos (BERGFELT, 2000).

O momento da administração do hCG normalmente é ditado pela associação de alguns fatores, dentre eles: período do ano, comportamento de estro, ecotextura uterina, tônus uterino e cervical, ecotextura da parede do folículo pré-ovulatório, diâmetro e formato do maior folículo. A administração do hCG é realizada quando um folículo atinge 35 mm de diâmetro durante a fase folicular. Uma única dose de hCG é utilizada para induzir a ovulação. Aparentemente não existe um padrão ou nível de dose, variando entre 1000 a 6000 UI ou mais, sendo que a maioria das doses utilizadas é entre 2000 a 3000 UI (BERGFELT, 2000).

O hCG na dose de 1500-3000 UI administrada por via intravenosa (i.v.) ou intramuscular (i.m.) induz a ovulação em 24 a 48 horas em éguas com folículo maior que 35 mm de diâmetro (BRINSKO et al., 2000; LeBLANC, 2006; GINTHER et al., 2008; PYCOCK, 2008; SAMPER, 2008).

Segundo Sieme et al. (2003) 97,5% das ovulações ocorrem em até 48 horas como uso de 1500 UI de hCG associado a um folículo de 40 mm. Resultado semelhante foi obtido por Camillo et al. (2004) onde a indução com 2500 UI de hCG na presença de folículos maiores que 32 mm a taxa de ovulação foi de 97,6% em até 48 horas.

Samper e colaboradores (2002) tiveram 83,3% de ovulação em 48 horas com a indução de ovulação quando os folículos tinham tamanho maior que 30 mm e em 96 horas 100% das éguas ovularam.

Em estudo realizado por Cox et al., (2009), o hCG foi utilizado em éguas com folículos de  $35 \pm 2$  mm e em éguas com folículos de  $28 \pm 2$  mm; o número de éguas que ovulou em  $48 \pm 2$  horas após o tratamento foi de 100% (8/8) e 58% (7/12), respectivamente.

Apesar de diversos resultados favoráveis Sullivan e colaboradores (1973) relataram uma redução na porcentagem de éguas respondendo favoravelmente a administração de hCG durante sucessivos ciclos e uma falha completa da indução foi encontrada no terceiro ciclo. Suspeitou-se de causa imunológica.

Roser et al. (1979) confirmaram a hipótese que éguas desenvolveram anticorpos após duas a cinco injeções em ciclos sucessivos. Os anticorpos não apresentaram reação cruzada com LH equino e os ciclos naturais não foram alterados pela imunização anti-hCG. Duchamp et al. (1987) mostraram que éguas imunizadas com anti hCG não responderam ao hCG dentro do tempo previsto para a ovulação ocorrer. Estes autores tentaram reduzir esta resposta imune através da administração de corticosteróides concomitantemente ao uso do hCG, mas não obtiveram sucesso. Sete de oito éguas apresentaram altas titulações de anticorpos anti hCG após quatro injeções de 2000 UI, com proporção idêntica em animais em que se administrou corticosteróides de longa ação. Segundo Smith (2007) a produção de anticorpos contra hCG, está associada a sua administração por via intramuscular.

Posteriormente estudo realizado por Blanchard et al. (2003) demonstraram que não houve diminuição nas taxas de resposta quando o hCG foi administrado durante mais que quatro ciclos estrais diferentes em uma mesma estação de monta.

O uso de hCG em éguas com presença de anticorpos hCG produzem uma quantidade menor de fluxo sanguíneo na parede do folículo, de progesterona no fluido folicular e na concentração do LH plasmático, já o estradiol do líquido folicular, o IGF-1 livre e o estradiol do plasma, têm maiores taxas nas éguas que possuem esses anticorpos do que nas éguas que não possuem. Além disso, éguas com anticorpos hCG têm uma quantidade menor de oócitos maduros do que éguas negativas para esses anticorpos (SIDDIQUI et al., 2009).

McCue et al. (2004) realizaram experimento em que as éguas foram tratadas em cinco ciclos, a taxa de ovulação até 48 horas foi de 85,1%, 77,2%, 78,3%, 75,6% e 73,4% para o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto ciclo, respectivamente.

Beal (2008), utilizou doses de 1000, 1500 e 2000 UI de hCG para induzir a ovulação, no intervalo do tratamento até 48 horas a ovulação aconteceu em 92,3% (36/39) das éguas tratadas com 1000 UI, 85,36% (35/41) das tratada com 1500 UI e 86% (37/43) ovularam quando tratadas com 2000 UI de hCG.

Em estudo realizado por Barbacini et al. (2000), detectaram que a incidência de éguas que receberam hCG e não ovularam foi maior no grupo das solteiras e velhas ( $> 16$  anos), também foi demonstrado que as éguas que receberam hCG em maio, junho e julho (final da estação) tiveram maior tendência de ovular antes de 24 horas após o tratamento, quando comparada as tratadas em fevereiro, março e abril (início da estação). Esses mesmos autores também concluíram que o uso repetido de hCG não diminuiu a resposta ovulatória das éguas tratadas.

Recente estudo realizado por Jacob et al. (2011) utilizando 1000 UI de hCG como indutor da ovulação em éguas cíclicas durante 4 ciclos estrais consecutivos, constatou não haver alteração na eficácia da droga em induzir a ovulação. As ovulações aconteceram em até 48 horas no primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclo em: 88% (55/62 ciclos), 90% (38/42 ciclos), 95% (23/24 ciclos) e 77% (10/13 ciclos), respectivamente.

Em outro estudo o tempo entre o tratamento e a ovulação foi similar no grupo tratado com 2500 UI ( $43.5 \pm 1.0$  h) e 1500 UI ( $44.0 \pm 1.0$  h) de hCG e foi maior ( $P < 0.0001$ ) nos grupos tratado com 500 UI de hCG ( $82.6 \pm 8.5$  h) e controle ( $98.2 \pm 5.6$  h). Nesse mesmo

estudo o tamanho do folículo pré-ovulatório (6 horas antes da ovulação) foi de  $38,3 \pm 0,2$  mm para éguas tratadas com 2500 UI e de  $39,1 \pm 0,4$  mm para as éguas tratadas com 1500 UI e menor ( $P < 0,0001$ ),  $43,6 \pm 0,4$  mm para éguas tratadas com 500 UI de hCG e  $44,9 \pm 0,4$  mm para o grupo controle. Além disso, após três ciclos consecutivos não houve alteração na eficácia do hCG (GASTAL et al., 2006).

O hCG têm ampla utilização para o avanço da ovulação nas éguas, mas ainda há pouca informação sobre a eficácia das doses. Em um estudo, utilizando 750 UI ou 1500 UI de hCG por via subcutânea mostrou que a dose de 750 UI é tão efetiva na indução da ovulação dentro de 48 horas como 1500 UI. Também ficou claro que 750 UI de hCG não têm efeito significativo sobre a ovulação, múltiplas ovulações, taxas de gestação ou sobre múltiplas gestações quando comparado com o grupo controle (MOREL; NEWCOMBE, 2008).

Em recente estudo, 1000 UI versus 1750 UI de hCG foram utilizadas para avaliação da resposta ovulatória, à dose de 1000 UI, 89,52 % das éguas ovularam em até 48 horas (111/124); 4,84% entre 48 e 96 horas (6/124) e 5,65% não ovularam ou apresentaram folículo hemorrágico (7/124). Para a dose de 1750 UI, 87,21% das éguas ovularam em até 48 horas (75/86); 4,65% entre 48 – 96 horas (4/86) e 8,14% não ovularam ou apresentaram folículo hemorrágico (7/86). Mostrando assim que a dose de 1000 UI de hCG foi tão efetiva quanto doses maiores (MORENO et al., 2010).

Cuervo-Arango e Newcombe (2008) verificaram que a incidência de folículos hemorrágicos nas éguas tratadas com cloprostenol foi maior do que nas éguas tratadas com hCG, essas últimas não tiveram diferença com éguas de ovulação espontânea.

Ginther et al. (2009b) utilizaram 2500 UI de hCG em folículos maiores que 35 mm. Nesse estudo dosou hCG, LH e estradiol, a ovulação aconteceu em  $81,2 \pm 6,1$  horas no grupo controle e  $45,6 \pm 1,3$  horas no grupo tratado. Porém os níveis de hCG diminuíram com 1 hora da aplicação, em  $11,6 \pm 0,4$  horas reduziu em 50% e após 48 horas a queda foi de 92%, o  $17\beta$ -estradiol também diminuiu entre 0 e 6 horas e continua a diminuir, já o LH aumentou em 12 e 24 horas. Desse modo, os autores sugeriram que o hCG não tem efeito direto na ovulação, ele estaria ligado com a onda de estradiol e LH, e está, com a ovulação espontânea.

Em éguas puro sangue foi realizado um estudo utilizando o hCG para verificar se seu uso como agente indutor da ovulação afeta o desenvolvimento do corpo lúteo e a sua função na gestação, foram utilizadas 2500 UI de hCG em éguas com folículos entre 35-42 mm, o tamanho dos folículos nas éguas submetidas ao uso da hCG foi de  $39,2 (\pm 2,7)$  contra  $51,0 (\pm 1,8)$  das éguas controle. Nas éguas gestantes o padrão de corpo lúteo foi semelhante para os dois grupos entre o 4° e o 35° dia, já nos dias 1-3 o corpo lúteo foi menor nas éguas tratadas, porém nas éguas não gestantes o corpo lúteo foi maior para as que haviam sido tratadas. As taxas de progesterona foram semelhantes em ambos os grupos (URQUIETA et al., 2009).

## 2.6 Transferência de Embrião

Na década de 70 obteve-se o primeiro resultado positivo de TE em equinos, o feito foi realizado no Japão por Oguri e Tsutsumi (1972), utilizando uma técnica de inovulação que evitava a manipulação cervical, e que tinha sido descrita primeiramente em bovinos por Sugie (1965). Já no Brasil a técnica foi descrita pela primeira vez por Fleury et al. (1987) adaptando a metodologia relatada por Douglas (1979). Trata-se do procedimento onde a égua concebe um produto e doa este embrião para uma égua receptora que levará esta gestação a termo (CARNEIRO, 2005)

A TE em equinos teve um aumento considerável nas duas últimas décadas (SQUIRES et al., 2003). Segundo último levantamento do Comitê de Estatística da Sociedade

Internacional de Transferência de Embriões (IETS) o Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de embriões (12.000 embriões recuperados) sendo ultrapassado somente pelos Estados Unidos da América (EUA) país no qual foram recuperados cerca de 14.000 embriões na estação de monta 2008-2009. O crescimento médio do número de embriões produzidos no Brasil tem sido de 20% ao ano nos últimos 5 anos (ALVARENGA, 2010).

As indicações para sua realização incluem: (1) obter vários produtos de uma única égua por ano; (2) obter potros de éguas problemáticas, mais velhas (3) obter produtos de éguas que se encontram em performance, sem a necessidade de parar as atividades devido a gestação e/ou lactação; (4) obter potros de éguas enfermas; (5) obter potros de éguas com problemas reprodutivos que impedem de levar a gestação a termo e (6) obter produtos de potras com 2 anos sem alterar seu desenvolvimento (CARNEIRO, 2005).

Segundo Alvarenga (2010) em média são necessários 2 a 4 ciclos para se obter uma gestação de uma égua doadora de embriões, conseqüentemente os custos para a produção de um potro proveniente de TE são bastante elevados.

A TE em equinos tem sido realizada, basicamente, por dois métodos: o cirúrgico e o não cirúrgico, nas últimas décadas, houve um grande avanço desta biotécnica aplicada à referida espécie, melhorando consideravelmente as taxas de gestação de 12,5% a 74,55% (VOGELSANG et al., 1979; OGURI; TSUTSUMI, 1980; FLEURY; ALVARENGA, 1999; PERES et al., 2002; ROCHA et al., 2004).

A utilização da técnica cirúrgica demonstra taxas de prenhez mais homogêneas, em torno de 65 a 80% (FLEURY; ALVARENGA, 1999; SQUIRES et al., 1999). Carnevale et al. (2000) compararam os métodos não-cirúrgico e cirúrgico de TE e obtiveram taxas de prenhez aos 50 dias de 47,4% (37/78) e 68,3% (381/558), e aos 120 dias de 39,7% (31/78) e 57,9% (323/558) respectivamente. No entanto, esses autores salientaram que os resultados superiores obtidos pela TE cirúrgica provavelmente tenham sido devido à melhor qualidade dos embriões utilizados.

Em programas comerciais de TE a taxa de recuperação embrionária está em torno de 60% a 70% nas éguas com ovulação única, o que não justifica a realização do procedimento cirúrgico (CARVALHO et al., 2001; JACOB et al., 2002, CARMO, 2003; GOMES et al., 2004; FILHO, 2005; MEIRA, 2007; ALVARENGA et al., 2008; MOZZAQUATRO, 2008; COSTA, 2010).

## **2.7 Fatores que influenciam a Recuperação Embrionária**

O sucesso de um programa de TE está intimamente relacionado à taxa de recuperação dos embriões a partir das éguas doadoras (SQUIRES et al., 1999). A taxa de recuperação depende de fatores como: dia da colheita do embrião, número de ovulações, características da doadora (condição uterina, idade) (ALONSO, 2008), manejo reprodutivo (controle de desenvolvimento folicular, ovulação), nutrição, sanidade, qualidade do sêmen, habilidade técnica e fatores como as variações climáticas e adaptação da doadora na central, estes podem exercer influência negativa sobre taxa de recuperação embrionária (GOMES; GOMES, 2008).

Antes de iniciar um programa de TE deve-se fazer um completo exame ginecológico nas doadoras e receptoras e exames no trato genital como: ultrassonográfico e palpação transretal, citologia e até um exame histopatológico (biópsia) do útero. Os resultados obtidos indicarão se existe necessidade de algum tipo de tratamento especial e se essas éguas podem ser utilizadas em um programa de TE (ALVARENGA et al., 2008).

### **2.7.1 Égua doadora**

A seleção da égua doadora para TE depende de vários fatores, como: idade da égua, histórico reprodutivo, conformação da vulva, valor genético, condição do útero, éguas subfértis (COSTA, 2010).

Em equinos é comum o uso de animais idosos tanto matrizes quanto reprodutores. Em nenhuma outra espécie de animais de produção existe um percentual tão elevado de animais idosos, o interesse pela continuidade do uso destes se prende ao fato do lento melhoramento genético observado em equinos pela pequena quantidade de descendentes produzidos anualmente (ALVARENGA, 2010). A égua permanece em atividade reprodutiva por um maior período de sua vida, sendo frequente encontrar uma grande parte do contingente de doadoras de embriões, com mais de 20 anos de idade, quando se tratam de éguas de genética superior previamente comprovada na reprodução pela progênie apresentada (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

O ambiente uterino poder ser considerado como um dos causadores de defeitos embrionários, mas também muitos destes problemas podem ser explicados por defeitos no oócito das éguas velhas e subfêrteis. A taxa de perda embrionária é maior entre os 35 e 50 dias em receptoras que receberam embriões de éguas infêrteis, sugerindo que esses embriões eram anormais antes da TE (SQUIRES, 1993).

### **2.7.2 Controle do ciclo estral**

Várias combinações de hormônios reprodutivos tais como prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF e análogos), gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH e análogos) são utilizados no controle do desenvolvimento folicular, indução do tempo de ovulação, ciclo estral, período pós parto e durante a transição da primavera em éguas (PINTO; MEYERS, 2007).

O controle folicular eficiente tem papel fundamental em um programa de TE, o exame detalhado através da ultrassonografia é necessário para realizar um melhor controle da ovulação, bem como avaliar se há resquício ou excesso de resposta inflamatória (fluido uterino) após a Inseminação Artificial. Este controle deve ser diário em se tratando de éguas doadoras de embrião (GOMES; GOMES, 2008).

### **2.7.3 Colheita de embriões**

Embriões equinos são seletivamente transportados da tuba uterina para o útero entre o quinto e o sexto dia pós ovulação, os quais estão na fase de mórula compacta. Após entrar no lúmen uterino, o tamanho do embrião aumenta desenvolvendo-se até blastocisto expandido. Embora embriões possam ser recuperados nos dias 6 a 9, o período ideal para sua colheita é nos dias 7 ou 8 após a fertilização. A indicação primária para recuperação embrionária no dia 6 é para congelamento do embrião (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

Embriões não são rotineiramente colhidos no dia 9, porque o sucesso destes nas taxas de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando da recuperação entre os dias 7 ou 8 (SQUIRES; SEIDEL, 1995) porém em éguas velhas nas quais o desenvolvimento embrionário e o transporte pelo oviduto podem ser retardados as colheitas em D9 são indicadas (SQUIRES et al., 1999). Em estudos recentes têm sugerido que quando as éguas são inseminadas pós-ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada que o esperado (LISA; MEADOWS, 2008). Assim, foi observado um retardo no desenvolvimento

embrionário, no qual vesículas embrionárias foram estimadas menores, equivalentes a 1 dia de crescimento, para éguas inseminadas neste período, em relação a éguas inseminadas antes da ovulação. Desta maneira, o lavado uterino não deve ser realizado menos que no dia 7,5 – 8 (CUERVO-ARANGO et al., 2009).

Vogelsang e colaboradores (1985), após 106 colheitas de embriões realizadas nos dias 5, 6, 7 e 8 após a ovulação (dia 0), obtiveram recuperação embrionária de 55, 51, 33 e 50%, respectivamente, indicando efeito não-significativo do dia da colheita sobre as taxas de recuperação dos embriões.

Ao realizar 654 lavados durante três estações reprodutivas Santos et al. (2008) recuperaram 62,7% de embriões. Após levantamento sobre quatro estações reprodutivas. Jacob et al. (2010) obtiveram 62% de taxa de recuperação embrionária. Os mesmos autores avaliaram as taxas de recuperação em diferentes dias de coleta, dia 6 (42%, 16/38), dia 7 (61%, 159/262), dia 8 (66%, 285/434), dia 9 (59%, 39,66) e dia 10 (56%, 09/05), a baixa recuperação de embriões foi observada no sexto dia ( $p < 0,03$ ), quando comparados com os outros dias. No entanto, as taxas de recuperação foram similares entre os dias 7, 8, 9 e 10.

Estudos tem sido realizados para verificar a influencia de agentes indutores da ovulação sobre as taxas de recuperação embrionária, Santos et al. (2010), avaliaram a taxa de recuperação embrionária utilizando 1000 ou 1700 UI de hCG, onde as taxas de recuperação embrionária para os grupos controle, 1000 UI e 1700 UI foram de 56% (51/91), 59,7% (52/87) e 62,2% (28/45), respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ) na taxa de recuperação embrionária quando se utiliza o hCG como agente indutor da ovulação. Kolling e Allen (2005) recuperaram 15 embriões de 40 lavados (37,5%) nas éguas tratadas com EPE, 26 embriões de 49 lavados para tratadas com Ovuplant (53%), nas éguas tratadas com a hCG obtiveram 44 embriões de 80 lavados (55%), 63 embriões de 92 lavados (68,5%) para éguas tratadas com 0,75 mg de BioRelease Deslorelina e de 182 lavados foram recuperados 126 embriões (69%) no tratamento com 1,5 mg BioRelease Deslorelina.

Os procedimentos para recuperação de embrião permaneceram essencialmente inalterados durante as últimas duas décadas (SQUIRES et al., 2003). A colheita do embrião é realizada pelo procedimento não cirúrgico transvaginal, descrito primeiramente em equinos por Oguri e Tsutsumi (1972), que utilizaram um cateter de três vias. A coleta de embrião era então realizada no corno ipsilateral à ovulação, inflando o balão do cateter na base desse corno.

Atualmente, a colheita de embrião é executada utilizando-se a lavagem uterina transcervical, usa-se um cateter ou sonda de silicone com balão (VEUF-80, Bivona, Inc., Gary, IN 46406) com diâmetro de 8,0 mm; porém, outros estilos de cateter estão disponíveis. Uma vez o cateter inserido no corpo do útero, o balão é inflado, aproximadamente com 60 mL de ar, no corpo do útero, tracionando o cateter caudalmente para se ajustar no óstio cranial da cérvix, lavando-se os dois cornos simultaneamente (FLEURY et al., 2001; SQUIRES et al., 2003; SILVA, 2003). O útero é lavado três ou quatro vezes com um litro de solução salina acrescida com fosfato puro modificado (DPBS), previamente aquecida (30 – 35 °C), contendo 1% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (VANDERWALL, 2000). Outra opção para o lavado uterino tem sido o uso de Ringer Lactato, obtendo taxas de prenhez de 64% quando comparadas a 57% obtido pelo DPBS em embriões coletados por estas soluções, conforme (ALVARENGA et al., 1992).

O volume recuperado representa normalmente de 95% a 98% do volume infundido (IMEL, 1981; CARVALHO, 2000; SILVA, 2003). Recentemente, foi proposto um quarto lavado adicional, onde logo antes do procedimento é administrada a ocitocina, devendo-se

permitir que o meio permaneça no útero da égua por aproximadamente 3 minutos, seguido de massagem uterina pelo reto. Isto resulta em um incremento da taxa de recuperação embrionária em torno de 10% (HUDSON; McCUE, 2004).

#### **2.7.4 Manipulação e avaliação do embrião**

A avaliação do embrião é subjetiva, e relativamente simples, não necessitando de equipamentos sofisticados. O rastreamento dos embriões é realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico sob aumento de 10X e a classificação embrionária é realizada utilizando-se aumento de 40X. A placa de petri deve estar previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 mL, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção TQC®, Ham F10, Encare®, dentre outros (LIRA et al., 2009).

A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society), descritas por McKinnon e Squires (1988). Em coletas realizadas entre 6 e 8 dias após ovulação, geralmente são encontrados mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e/ou blastocisto expandido (Bx).

A avaliação da qualidade embrionária leva em consideração a morfologia relacionando-a com sua viabilidade. É atribuído um escore de 1 a 5, avaliando-o quanto ao formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida (McKINNON; SQUIRES, 1988).

A qualidade do embrião apresenta o principal efeito sobre as taxas de prenhez. Embriões com escores de qualidade pobres (3) resultam em baixa taxa de prenhez (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Embriões que são menores que o normal para a idade deles, ou têm anormalidades morfológicas, também resultam em taxas de prenhez reduzidas (SQUIRES et al., 2003). Os mesmos autores reportam taxas de 70 – 75% de prenhez, com transferência de embriões de Grau 1, diagnosticado ao exame ultrassonográfico aos 12 dias.

Após avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção (FLEURY et al., 2001; CAMILO et al., 2003; DAELS, 2007). O objetivo desse procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida antes de aspirá-lo na palheta de inóculo. Neste momento, o embrião está pronto para ser transferido em uma égua receptora ou ser condicionado ao resfriamento para o transporte (DAELS, 2007). Cuidados devem ser tomados quanto ao tempo de armazenamento no meio de manutenção, uma vez que sua viabilidade diminui após três horas em meio DPBS (DOUGLAS, 1982). Além disso, toleram temperaturas entre 25 °C a 37 °C, porém deve ser dada importância às mudanças de temperatura extremas (VANDERWALL, 2000).

#### **2.7.5 Qualidade do sêmen**

A escolha dos garanhões normalmente esta associada a suas características morfológicas e seu desempenho atlético, raramente leva-se em consideração a questão da fertilidade, o que pode gerar baixas taxas de recuperação embrionária em função da utilização de sêmen de má qualidade (AMANN, PICKETT, 1987).

Outro fator de grande influência na fertilidade está ligado ao sistema o qual se encontra acondicionado o sêmen que será utilizado para inseminação nas doadoras, em um programa de TE utilizam-se sêmen fresco, refrigerado ou congelado, lembrando-se que os

índices de recuperação embrionária decrescem quando se utiliza sêmen congelado comparado ao sêmen a fresco (SQUIRES et al., 1999).

Fleury et al. (2001) avaliaram em equinos da raça Mangalarga em duas estações reprodutivas, a influência do garanhão e de três diferentes técnicas de inseminação (monta natural, inseminação artificial com sêmen diluído fresco ou resfriado) sobre os índices de recuperação de embriões e de prenhez, no primeiro ano encontraram diferenças significativas na taxa de recuperação, mas não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de gestação. No segundo ano não houve diferenças significativas nas taxas de recuperação e gestação.

A fertilidade do sêmen é extremamente variável entre garanhões. As taxas de prenhez por ciclo estral em éguas após inseminação artificial com sêmen fresco de onze garanhões variaram de 40 a 79% (AMANN; PICKETT, 1987). DOUGLAS (1979) reportou taxa de recuperação embrionária de 36% com a utilização de um garanhão e de 72% com outro. Segundo Squires e colaboradores (1999) o sêmen fresco geralmente fornece melhores resultados de recuperação de embriões do que o sêmen refrigerado ou congelado.

## **2.8 Fatores que afetam a Taxa de Gestação**

Para incrementar as taxas de gestação em programas de TE é fundamental a viabilização dos custos. A taxa de gestação é afetada pela receptora, pelo embrião e pela doadora. A receptora de embrião consiste no ponto crítico do programa de TE; sua seleção e manejo determinarão, em grande parte, o sucesso da técnica (ALONSO, 2008).

Estudos demonstram que os melhores índices de prenhez são obtidos quando as receptoras apresentam as melhores características de diestro e ausência de qualquer anormalidade uterina e vaginal (ARRUDA et al., 2001). Ao avaliar seis estações reprodutivas Rocha et al. (2007) obtiveram média geral para taxa de prenhez aos 15 dias de 73,4%.

### **2.8.1 Seleção de receptoras**

A seleção de uma receptora deve ser criteriosa, responsável e, sobretudo, visando à eficiência do programa de TE. Os critérios de seleção da égua receptora incluem tamanho, idade, temperamento dócil e bom desenvolvimento mamário, ter um ciclo estral normal, serem livres de problemas reprodutivos (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; SQUIRES et al., 2003), é importante também que não seja um animal agitado pois este representa um risco para os profissionais e para a futura gestação, devido ao estresse. Devem ser selecionados animais cabresteados e possíveis de serem manejados (SAMPER et al., 2007; BLANCHARD et al., 2003). Os requerimentos sobre o status reprodutivo variam entre os centros de reprodução, podendo variar desde éguas que tenham parido anteriormente (avaliação da habilidade materna), ou éguas virgens, eliminando a possibilidade de laceração cervical ou alterações uterinas prévias (HINRICHS, 1993; SAMPER et al., 2007).

Em relação a idade o ideal são éguas entre 3 a 10 anos, visto que a idade é um importante fator predisponente para a degeneração endometrial, que pode comprometer a habilidade de manter a gestação (SQUIRES et al., 1999; MORRIS; ALLEN, 2002; STOUT, 2006). Carnevale et al.(2000), observaram a taxa de prenhez de receptoras entre 2 e 9 anos e esta não diferiu estatisticamente das receptoras entre 10 a 18 anos. Porém, a taxa de perda embrionária foi maior nas receptoras entre 10 e 18 anos (13,3% versus 20,5%).

Stanton et al. (2004), relataram que a incidência de cisto endometrial aumenta com a parturidade e com a idade, pois a maioria das éguas afetadas são as que apresentam mais de

10 anos. Em uma população de éguas férteis e subférteis a expectativa para ocorrência de cistos é de 13% a 22%. Em um levantamento os autores avaliaram que 73,1% dos cistos que estavam presentes eram em éguas com mais de 14 anos, e apenas 29,1% dos cistos estavam presentes em éguas que apresentavam de 7 a 14 anos.

Um fator na seleção para o qual não se dá muita importância é o tamanho da receptora em relação à doadora e garanhão (STOUT, 2006). Uma série de estudos demonstraram que a discrepância entre o tamanho genético do embrião e a receptora afeta em vários aspectos o desenvolvimento intrauterino e pós natal. Tamanho materno inadequado pode levar a um maior ou menor crescimento fetal, apesar de um grau de compensação na vida pós natal, este tamanho é mantido na maturidade (ALLEN et al., 2002; 2004). Tanto o crescimento uterino aumentado ou retardado alteram a função pós natal cardiovascular, endócrina e metabólica (FORHEAD et al., 2004) e, aparentemente a utilização de receptora que difere marcadamente em tamanho com a doadora vai influenciar o tamanho do potro na maturidade, e em um caso pior, aumentar a morbidade durante a vida intrauterina, imediata pós natal e, possivelmente, na vida adulta (STOUT, 2006).

A sanidade da receptora tem vital importância, sendo que deve estar livre de quaisquer moléstias infectocontagiosas, em especial Anemia Infeciosa Equina, babesiose, leptospirose e adenite equina, que podem comprometer a sanidade de todo o plantel e posteriormente causar declínio nas taxas de prenhez e aumento nas taxas de perda embrionária (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Devem também apresentar boa condição corporal e passar por um exame reprodutivo completo (SQUIRES, 1993; SQUIRES; SEIDEL, 1995; McCUE et al., 1999; STOUT, 2006). Faz-se a observação da genitália externa, sendo necessário ter uma conformação vulvar normal. Qualquer sinal de alteração, como presença de fluido, cistos, ar ou debris no útero, tumores ou outras anormalidades ovarianas, deve determinar o descarte do animal. Aproximadamente 15 a 20% das éguas examinadas são descartadas. Apenas éguas com biópsias de graus IA e IB e sem evidência de endometrite crônica ou aguda deveriam ser usadas como receptoras (SQUIRES; SEIDEL, 1995). A égua deve ter uma cérvix íntegra e não muito torta (STOUT, 2006). Como o exame não é feito de uma forma completa, há uma grande quantidade de éguas aceitas e que não estão aptas reprodutivamente (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

### 2.8.2 Escolha da receptora no dia da TE

A escolha da receptora no dia da TE tem influência direta sobre a taxa de gestação. Alguns aspectos devem ser levado em consideração neste momento, sendo os mais importantes o dia pós ovulação e as características uterinas da receptora ao exame de palpação e ultrassonografia (WILSHER et al., 2006). As receptoras devem ser avaliadas anteriormente ao momento da transferência, devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião, entretanto, esta escolha é, muitas vezes, feita de forma subjetiva, sendo que cada veterinário possui um método próprio de avaliação (FLEURY et al., 2006). Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular) e não deve haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (CARNEVALE et al, 2000).

Nos resultados de Alonso (2007), os animais apresentando o útero mais tubular e de ecogenicidade mais homogênea apresentaram maiores taxas de prenhez comparando-se com aqueles com útero menos tubular e mais heterogêneo. Com isso, a avaliação da

[J1] Comentário: Retirei um parágrafo abaixo OK

morfoecogenicidade uterina deve ser considerada na seleção da receptora. A morfoecogenicidade uterina é o aspecto de tubularidade e homogeneidade à palpação retal e ultrassonografia.

A sincronia entre embrião e ambiente uterino é essencial para o estabelecimento da gestação. O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, sendo que um embrião em um útero assíncrono pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes a fase na qual ele se encontra, afetando o estabelecimento da gestação (WILSHER et al., 2006).

Atualmente, a sincronização entre doadora e receptora é uma técnica realizada de maneira relativamente simples em éguas cíclicas. Geralmente, administra-se uma única injeção intramuscular de PGF2 $\alpha$  ou análogo na égua doadora um a dois dias antes da aplicação do mesmo protocolo nas receptoras. Levando em consideração que ambas estejam entre o 6 $^{\circ}$  e 14 $^{\circ}$  dias do diestro e o exame ultrassonográfico dos ovários revele a ausência de um grande folículo pré-ovulatório que pode ovular rapidamente (ALLEN, 2001). Outra técnica de sincronização praticada consiste na administração de progesterona injetável ou sintética orais durante nove ou dez dias, iniciando nas doadoras de embrião um ou dois dias à frente das receptoras (DRIANCOURT; PALMER, 1982). Removendo-se a progesterona e aplicando-se a PGF2 $\alpha$ , as éguas exibirão estros em torno de três dias (BERGFELT, 1999).

Em todos os protocolos de sincronização empregados, monitora-se o crescimento folicular por ultrassonografia e utiliza-se hCG, GnRH ou EPE para induzir ovulação nas éguas receptoras dentro de 48 horas depois que a doadora for inseminada (DUCHAMP et al., 1987).

O grau de assincronia entre a ovulação da doadora e da receptora é entre -1 (ovulação um dia antes da doadora) a + 3 (ovulação três dias após a doadora), não sendo as taxas de gestação entre elas diferentes neste intervalo. Trabalhos mais recentes têm mostrado que a sincronia entre doadora e receptora pode ser mais flexível do que se pensava, até porque pode-se realizar a colheita do embrião em dias diferentes (JACOB et al., 2002; McKINNON; SQUIRES, 2007).

Um estudo realizado por Jacob e colaboradores (2010), mostrou as taxas de prenhez para o seguinte grau de sincronia foram: D-1 (71%, 05/07), D0 (77%, 20/26), D1 (68%, 48/71), D2 (63%, 61/97), D3 (66%, 57/87), D4 (76%, 63/83), D5 (61%, 36/59) e D6 (27%, 04/15), mostrando que o D6 para o grau de sincronia teve menor taxa de gestação que todos os outros dias, mas nenhuma diferença foi encontrada entre os dias D-1 a D5.

Muitos estudos já foram realizados para avaliar o dia ideal do ciclo para a TE e o uso de drogas para melhorar o perfil progesterônico da égua receptora. O foco dos estudos são os antiprostaglandínicos, progesterona e mais recentemente o hCG e análogos do GnRH (FLEURY et al., 2007).

Souza (2006) demonstrou que a aplicação de hCG no dia 0 ou 1 pós ovulação aumentou o número de receptoras com útero tubular e ecogenicidade uterina homogênea e tônus uterino bom e excelente. Sendo esta uma interessante ferramenta para melhorar a chance de a receptora apresentar características desejáveis quando o número de receptoras for limitado.

Na tentativa de utilizar receptoras que ovularam antes da doadora, Wilsher e colaboradores (2006), trataram com ácido meclofenâmico receptoras que ovularam de 2 a 5 dias antes da doadora, iniciando no dia 9 pós ovulação; taxas de 85% de gestação foram obtidas naquelas que ovularam 2 ou 3 dias antes.

### 2.8.3 Inovulação

O embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 ou 0,5 mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003).

Jacob e colaboradores (2002) e Gomes et al. (2004), em programas comerciais de TE, mostraram que o método transcervical, gera taxas de prenhez consistentes em torno de 70%.

Peres et al. (2002) não observaram diferenças significativas nas taxas de prenhez pós transferência com a utilização do transferidor Frances (59%), da pipeta de inseminação artificial (54%), do transferidor alemão (44%) ou do aparelho comum constituído por um tubo de aço inox, dentro do qual perpassava-se um tubo de polietileno contendo o embrião (62%).

Recentemente foi desenvolvido um método alternativo para se executar a inovulação de embriões equinos, consistindo em depositar o embrião no útero da receptora mediante uma injeção intra-uterina guiada por ultra-sonografia. Silva (2003) relata que essa nova técnica foi comparada ao método transcervical e não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez, as quais foram de 76,9% e 78,9%, respectivamente. Entretanto, trata-se de uma técnica mais onerosa e complexa cuja aplicação se restringe a situações especiais.

## 3 MATERIAL E METÓDOS

### 3.1 Período e local de Execução

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural d Rio de Janeiro, situado no município de Seropédica- RJ, latitude 22°44'38"S durante o período correspondente a estação de monta 2010-2011 no Hemisfério Sul (Outubro a fevereiro).

### 3.2 Animais

Foram utilizadas 7 éguas da raça Bretão-Postier como doadoras de embrião e 17 éguas da raça Mangalarga Marchador como receptoras de embrião. Todas as éguas estavam com escore corporal 5 (classificação de 1 a 9), ciclos estrais regulares e histórico reprodutivo normal. As doadoras apresentavam idade entre quatro e 15 anos e as receptoras na faixa etária de três a 14 anos.

As éguas foram mantidas em piquete com água fresca *ad libitum*, suplementadas com 2,0 kg de ração diariamente.

#### 3.2.1 Delineamento experimental

Foi realizado o acompanhamento de 85 ciclos estrais, onde 35 ciclos estrais eram de éguas doadoras (7 éguas) e 50 ciclos estrais de éguas receptoras (17 éguas). As éguas foram divididas de maneira aleatória em cada um dos seguintes grupos: G1 (n = 32) – tratamento com 1000 UI (1,0 ml i.v.) de hCG (Chorulon® - Intervet Schering-Plough Animal Health), G2 (n = 30) – tratamento com 0,75 mg (0,75 ml i.v.) de Deslorelina (Botupharma) e G3 (n=23) – tratamento com 1,0 ml i.v. de solução salina (controle). O tratamento foi realizado quando as éguas apresentavam folículos ovarianos  $\geq 35$  mm ( $37,2 \pm 1,72$  mm). O acompanhamento desses ciclos estrais serviu para determinar o tempo entre o tratamento e a

ovulação, diâmetro do folículo no momento do tratamento, diâmetro do maior folículo após a indução da ovulação e diâmetro do folículo pré ovulatório (6 horas antes da ovulação). Nas éguas doadoras foi realizada a inseminação artificial para posterior coleta de embrião, essas inseminações foram realizadas em 25 dos 35 ciclos estrais das doadoras usados nos tratamentos descritos acima, sendo oito ciclos no G1 (hCG), oito ciclos no G2 (Deslorelina) e nove ciclos no G3 (solução salina).

Foram realizadas 12 transferências de embriões para as éguas receptoras, sendo quatro transferências para éguas induzidas com hCG (G1), cinco para éguas tratadas com deslorelina (G2) e três para éguas do grupo controle (G3).

### **3.3. Palpação Retal e Ultrassonografia**

A atividade ovariana das éguas foi monitorada por meio de palpação retal e técnica de ultra-sonografia, com aparelho Sonovet 2000 equipado com transdutor linear de 5.0 MHz. As avaliações foram realizadas em intervalos de dois a três dias até a observação de folículos de 25 mm e edema uterino na escala de 1 a 4, quando passaram a ser avaliadas diariamente. Quando as éguas apresentaram folículos  $\geq 35$  mm ( $37,2 \pm 1,72$  mm) foi realizado um dos três tratamentos. Vinte quatro horas após a aplicação foi feita avaliação da atividade ovariana a cada seis horas até a detecção da ovulação.

Nas éguas receptoras de embrião a avaliação ultrasonográfica também foi utilizada para o diagnóstico de gestação aos 15 dias (contados da ovulação da doadora), e repetida aos 30 dias de gestação para avaliar a perda embrionária precoce (PEP).

### **3.4. Inseminação Artificial (IA)**

As éguas doadoras foram inseminadas com 500 milhões de espermatozoides com 60-80% de motilidade progressiva 24 horas após a indução da ovulação. Nos casos onde a ovulação não aconteceu em 48 horas da indução, a inseminação foi realizada a cada 48 horas até a detecção da ovulação. O semên utilizado foi de um único animal de fertilidade comprovada, pertencente a espécie *equus asinus*, da raça jumento Pêga.

### **3.5 Coleta e Transferência dos Embriões**

O lavado do útero para coleta do embrião foi realizado 9 dias após a ovulação. Para tanto, as éguas foram contidas em um brete para proceder a higienização da genitália externa. Em seguida, um cateter tipo *Folley* (Bivona<sup>®</sup>) foi introduzido, por via vaginal, através da cérvix até o corpo do útero, local onde foi inflado o *Cuff* com 40 a 60ml de ar. Em seguida a sonda foi tracionada em sentido caudal para que o “cuff” se ajustasse ao óstio cranial da cérvix, obstruindo assim sua abertura. Uma vez a sonda inserida no corpo do útero, foi infundido um litro de solução Ringer com Lactato pré-aquecida a cerca de 37°C. O líquido foi imediatamente drenado em um copo coletor com filtro milipore (75  $\mu$ m – apropriado para reter o embrião). Sempre que o embrião era visualizado no copo coletor o restante da solução contida no útero era drenada e a colheita encerrada. Caso o embrião não tivesse sido encontrado no primeiro lavado uterino, prosseguia-se com a colheita até terem sido realizados pelo menos três lavados com um litro de solução de Ringer com Lactato cada. Após a drenagem, o ar do *Cuff* foi retirado e o cateter removido do útero.

Encerrados os lavados, o fluido contido no filtro de coleta (aproximadamente 50 ml) foi rotacionado e vertido em uma placa de petri riscada e descartável de 100 x 20 mm. A placa

foi levada ao microscópio estereoscópio com aumento de 10x, para o rastreamento do embrião que, quando localizado, era avaliado em aumento de 40x e classificado segundo McKinnon e Squires (1988). O embrião foi transferido para uma outra placa de petri onde o mesmo foi submetido a 10 lavagens em pequenas gotas de meio próprio para embrião (TQC Bioniche®) para retirada de debris celulares.

Após a lavagem o embrião foi acondicionado em pipetas de I.A. na seguinte ordem: meio de embrião, ar, meio + embrião, ar e meio. A pipeta de I.A. foi protegida com camisa sanitária e esse conjunto foi utilizado para depositar o embrião no útero da égua receptora, sendo essa escolha de acordo com o melhor grau de sincronia de -1 a +5 e características uterinas, cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular) e ausência de evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico.

Após a colheita do embrião, a égua doadora recebeu uma aplicação intramuscular de PGF2 $\alpha$  (7,5 mg de Lutalyse®) para indução de um novo estro.

### 3.6 Análise estatística

Os dados relativos aos folículos como: tamanho do folículo no momento da indução, tempo entre a indução e a ovulação, diâmetro do folículo pré ovulatório (6 horas antes da ovulação) e maior diâmetro atingido pelo folículo após a indução foram analisados pelo método ANOVA (Análise de Variância), seguido pelo teste de Tukey quando necessário.

Para os dados relativos ao percentual de éguas ovuladas em  $\leq 36$  horas, 36 a 42 horas, 42 a 48 horas ou  $\geq 48$  horas as análises foram feitas através do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com nível de significância de 5%. Para análise estatística da taxa de recuperação embrionária foi realizado o Exato de Fisher e para os dados relativos a taxa de gestação não foi possível realizar análise estatística devido ao baixo número amostral.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos com agentes indutores foram realizados quando os folículos apresentavam tamanho  $\geq 35$  mm ( $37,2 \pm 1,72$  mm) e edema uterino entre três e quatro. O diâmetro dos folículos no dia do tratamento não tiveram diferença significativa entre os três grupos ( $P > 0,05$ ), e as médias foram 37,5 mm para o grupo controle, 37,1 mm para os ciclos tratados com Deslorelina e 36,9 mm para o grupo tratado com hCG (Tabela 1).

Nos grupos tratados (hCG e Deslorelina) a ovulação aconteceu em até 48 horas em 93,5% (58/62). Esses resultados corroboram com os resultados já descritos por outros autores que afirmam que o momento adequado para indução da ovulação deve levar em conta a associação de um folículo  $\geq 35$  mm e edema uterino, e desse modo a maioria das éguas irão ovular em até 48 horas (PALMER, 1993; SAMPER, 1997, BERGFELT, 2000; BRINSKO et al., 2000; LeBLANC, 2006; GINTHER et al., 2008; PYCOCK, 2008; SAMPER, 2008).

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão do tamanho do folículo no momento do tratamento dos grupos

| Tratamento       | Ciclos | Tamanho do folículo (mm) |
|------------------|--------|--------------------------|
| hCG (G1)         | 32     | $36,9 \pm 3,4$           |
| Deslorelina (G2) | 30     | $37,1 \pm 1,2$           |
| Controle (G3)    | 23     | $37,5 \pm 2,3$           |

Média geral = 37,2;  $p > 0,05$

O tempo entre o tratamento e a ovulação foi semelhante entre os grupos tratados com hCG e Deslorelina, 40,7 e 45,0 horas, respectivamente, mas apresentou diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle onde o tempo médio entre a indução e a ovulação foi de 74,9 horas (Tabela 2).

Resultado similar foi obtido por Maio et al., (2010), que ao utilizarem hCG e Deslorelina para induzir a ovulação, quando as éguas apresentavam tamanho folicular de  $36,3 \pm 0,1$  mm, a ovulação aconteceu em  $46,1 \pm 1,4$ h com o uso de 2500 UI de hCG e  $46,2 \pm 1,4$ h com o uso de 750 $\mu$ g de Deslorelina.

O mesmo aconteceu no estudo de Meinert et al. (1993) comparando Ovuplant (2,2 mg) e o hCG (3000 à 5000 UI), obtendo 46,9 e 43 horas, respectivamente. Mesmo utilizando diferentes doses de hCG e Deslorelina o tempo da aplicação da droga a ovulação foram semelhantes nos respectivos trabalhos.

Samper et al. (2002), também realizaram estudo comparando Deslorelina (2,2 mg) com o hCG (2500 UI), porém o intervalo entre a indução e a ovulação foi maior no grupo que recebeu o hCG (44,8 horas) em relação as que receberam Deslorelina (38,6 horas), diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo onde a ovulação com hCG aconteceu primeiro (40,7 horas) do que no grupo com Deslorelina (45 horas). Essa diferença entre os dois estudos pode ser pelo fato do estudo de Samper et al. (2002), ter utilizado 2,2 mg de Deslorelina e no presente estudo somente 0,75mg. Além disso, no estudo de Samper et al. (2002), a indução da ovulação foi realizada em éguas com foliculo  $> 35$  mm, porém em média o tratamento com hCG foi realizado quando as éguas apresentavam foliculos de  $40,5 \pm 2,4$  mm e o tratamento com Deslorelina foi realizado quando as éguas apresentavam foliculos com tamanho médio de  $39,1 \pm 3,7$  mm, desse modo o tratamento aconteceu quando as éguas apresentavam foliculos de tamanho superior as éguas tratadas no presente estudo.

Comparando diferentes doses de hCG como indutor da ovulação, Gastal et al. (2006), verificaram que o tempo entre a indução e a ovulação foi similar no grupo tratado com 2500 UI ( $43,5 \pm 1,0$  h) e 1500 UI ( $44,0 \pm 1,0$  h) de hCG e menor ( $P < 0,0001$ ) nos grupos tratado com 500 UI de hCG ( $82,6 \pm 8,5$  h) e controle ( $98,2 \pm 5,6$  h). Ginther et al. (2009a), também utilizaram 2500 UI de hCG e o tempo entre a indução e a ovulação foi maior  $45,6 \pm 1,3$  horas. A dose de 1000 UI de hCG utilizada no presente estudo é intermediária entre a dose eficaz (1500 UI) e a dose de 500 UI que não foi eficiente, e essa dose intermediária mostrou-se tão eficiente quanto as doses maiores e o tempo de 40,7 horas encontrado no presente estudo foi numericamente menor que nos demais.

O tempo em dias entre a indução e a ovulação foi de 3,12 dias para as éguas do grupo controle, 1,69 dias para o G1 e 1,87 dias para G2. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por McKinnon et al. (1993), ao comparar o hCG (2500 UI) e o ovuplant (2,2 mg) onde o tempo observado entre a indução e a ovulação foi de 1,88 dias para as éguas tratadas com o hCG e 1,98 dias para as tratadas com Ovuplant. Resultado parecido também foi obtido por McCue e colaboradores (2007), que compararam o uso de um composto de deslorelina (1,5 mg) com o hCG (2500 UI), onde o tempo entre o tratamento e a ovulação foi de  $1,9 (\pm 0,7)$  dias para o composto de deslorelina e  $2,0 (\pm 0,7)$  dias, para o hCG. Já Vanderwall e colaboradores (2001), tiveram resultado diferente, porém próximo, onde o intervalo entre o tratamento e a ovulação foi de aproximadamente 2,2 dias para os animais tratados com Ovuplant ou com hCG.

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão do tempo entre o tratamento e a ovulação após a administração dos fármacos.

| Tratamento      | Ciclos | Tempo do tratamento a ovulação (horas) |
|-----------------|--------|--|
| hCG (G1)        | 32     | 40,7 ± 11,0 a                          |
| Deslorelina(G2) | 30     | 45,0 ± 18,72 a                         |
| Controle (G3)   | 23     | 74,9 ± 29,8 b                          |

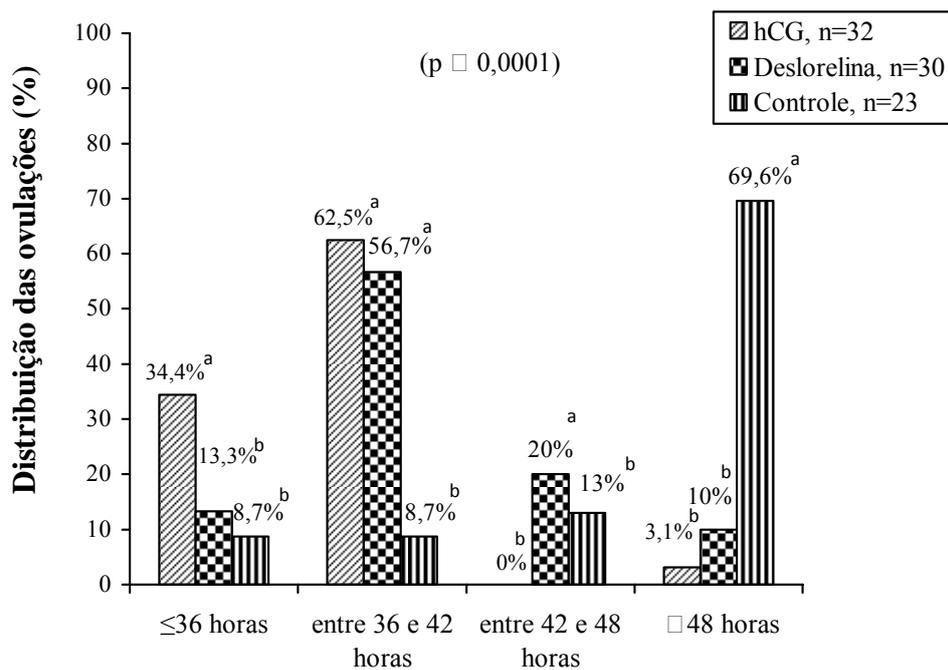
<sup>a,b</sup> Valores na coluna com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,001$ )

No presente estudo após a indução com 1000 UI de hCG 96,9% (31/32) das éguas ovularam em até 42 horas, onde 62,5% (20/32) entre 36 e 42 horas, 34,4% (11/32) ovularam em até 36 horas e, apenas uma égua (3,1%) não ovulou em até 48 horas, nesse caso a ovulação aconteceu 96 horas da indução. No tratamento com 0,75mg de Deslorelina, a porcentagem de éguas que ovularam em até 42 horas foi 70% (21/30) onde 56,7% (17/30) entre 36 e 42 horas, 13,3% (4/30) ovularam em até 36 horas, o restante das éguas ultrapassou o período de 42 horas após o tratamento, e 20% (6/30) ovularam entre 42 e 48 horas e 6,7% (2/30) até 96 horas, apenas uma égua de 30 (3,3%) ultrapassou o período de 96 horas. No grupo controle apenas 8,7% (2/23) das éguas ovularam em até 36 horas, e 8,7% (2/23) ovularam entre 36 e 42 horas, 13% (3/23) ovularam entre 42 e 48 horas e os 69,6% (16/23) restantes demoraram mais do que 48 horas para ovularem após a indução (Gráfico 1). Através do teste  $\chi^2$  verificou-se diferença entre os três grupos ( $p \leq 0,0001$ ) onde o número de éguas ovuladas até 36 horas e 42 horas aumentou significativamente com o uso do hCG, em relação aos demais grupos. Porém, no grupo tratado com Deslorelina o número de éguas ovuladas aumentou significativamente depois de 42 horas da indução, e no grupo controle houve um aumento significativo de animais ovulando mais tardiamente, acima de 48 horas. Resultado semelhante foi relatado por Sieme et al. (2003), com o uso de 1500 UI de hCG 97,5% das ovulações ocorreram em até 48 horas.

Camillo et al. (2004) também tiveram resultado parecido mas com dose de 2500 UI de hCG, 97,6% em até 48 horas. Assim como Beal (2008), onde a ovulação aconteceu em até 48 horas em 92,5% (36/39) das éguas tratadas com 1000 UI, 83,7% (35/41) das tratada com 1500 UI e 86% (37/43) ovularam quando tratadas com 2000 UI de hCG. Moreno et al.(2010), que avaliaram duas diferentes doses de hCG (1000 UI ou 1750 UI), à dose de 1000 UI, 89,52 % das éguas ovularam em até 48 horas (111/124) e para a dose de 1750 UI, 87,21 % das éguas ovularam em até 48 horas (75/86). O resultado de 96,8% corrobora com o resultado dos respectivos pesquisadores.

Quando comparamos a utilização de hCG x Deslorelina, os resultados do presente estudo também foram semelhantes aos de Maio et al. (2010), onde com a utilização de 750 $\mu$ g de Deslorelina, 2500 UI de hCG e no grupo controle a porcentagem de éguas ovuladas em até 48 horas da indução foi 89,2% (33/37), 88,6% (31/35) e 61,1% (22/36), respectivamente.

O tamanho do folículo pré-ovulatório 6 horas antes da ovulação não teve diferença entre os grupos tratados com hCG e Deslorelina, mas houve diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P \leq 0,0001$ ) (Tabela 3). O tamanho do folículo pré ovulatório, 6 horas antes da ovulação, foi de 42,1 mm no grupo controle, 39,4 e 38,9, para grupo Deslorelina e hCG, respectivamente. O tamanho do folículo pré ovulatório das éguas não tratadas foi semelhante ao diâmetro verificado por Ivkov et al., (1999), onde o diâmetro do folículo pré ovulatório um dia antes da ovulação foi de 41,7 mm ( $\pm 4.7$  mm).



### Tempo do tratamento a ovulação

**Gráfico 1:** Distribuição percentual de éguas que ovularam nos diferentes intervalos de tempo após a aplicação de 1000 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana, 0,75 mg de Deslorelina e no grupo Controle.

Em relação às éguas tratadas, os tamanhos dos folículos pré ovulatórios 6 horas antes da ovulação corroborou com os resultados de Gastal et al. (2006) onde as éguas foram tratadas com 2500 UI e 1500 UI, o tamanho do folículo pré-ovulatório (6 horas antes da ovulação) foi de  $38,3 \pm 0,2$  mm e  $39,1 \pm 0,4$  mm, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por Urquieta et al (2009), que utilizaram 2500 UI de hCG como indutor da ovulação e avaliaram que o tamanho médio dos folículos pré ovulatório nas éguas submetidas ao uso de hCG foi de  $39,2 (\pm 2,7)$  contra  $51,0 (\pm 1,8)$  das éguas controle, nesse caso o tamanho do folículo pré ovulatório das éguas não tratadas foi superior ao resultado do presente estudo.

**Tabela 3.** Médias do diâmetro do folículo pré-ovulatório (6 horas antes da ovulação)

| Tratamento       | Ciclos | Diâmetro folicular 6 horas antes da ovulação (mm) |
|------------------|--------|---|
| hCG (G1)         | 32     | 38,9 a  |
| Deslorelina (G2) | 30     | 39,4 a  |
| Controle (G3)    | 23     | 42,1 b  |

<sup>a,b</sup> Valores na coluna com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ( $p \le 0,0001$ )

Quanto ao maior diâmetro atingido pelo folículo após a indução da ovulação, houve diferença significativa ( $P \leq 0,0001$ ) entre os grupos G1 e G2, quando comparados com o grupo G3. (Tabela 4).

A taxa de recuperação embrionária foi de 64%, esse resultado é semelhante aos resultados de diversos trabalhos em programas comerciais de TE, onde a taxa fica em torno de 60 a 70% nas éguas de ovulação única (CARVALHO et al., 2001; JACOB et al., 2002, CARMO, 2003; GOMES et al., 2004; FILHO, 2005; MEIRA, 2007; ALVARENGA et al., 2008; MOZZAQUATRO, 2008; COSTA, 2010).

**Tabela 4.** Médias do maior diâmetro atingido pelo folículo após a indução

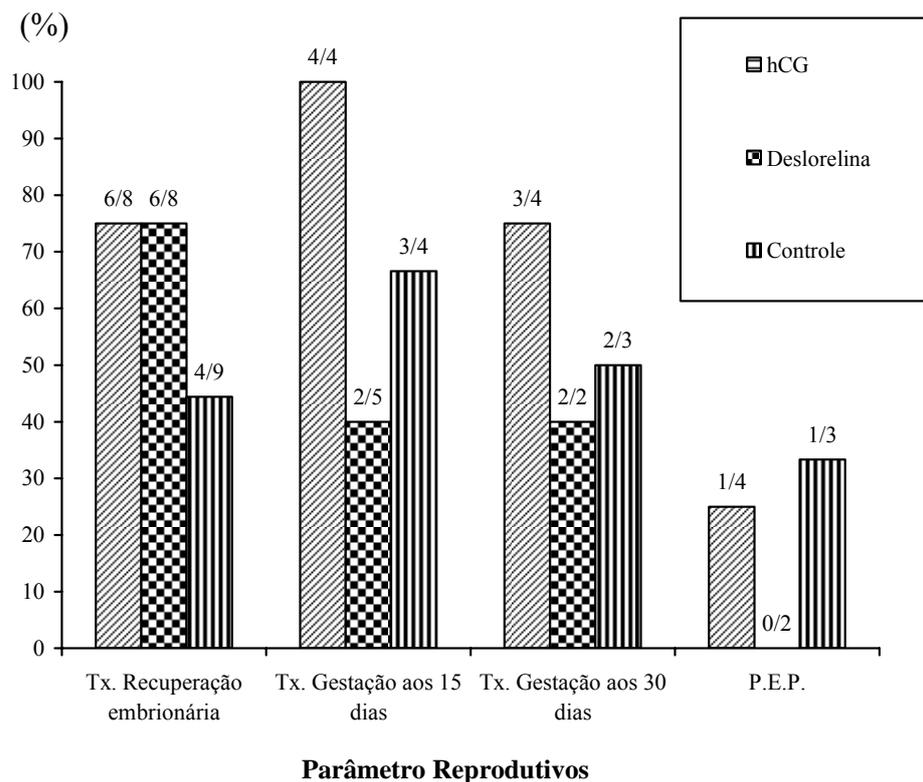
| Tratamento       | Ciclos | Maior diâmetro atingido pelo folículo após a indução (mm) |
|------------------|--------|---|
| hCG (G1)         | 32     | 40,3 a  |
| Deslorelina (G2) | 30     | 40,6 a  |
| Controle (G3)    | 23     | 44,8 b  |

<sup>a,b</sup> Valores na coluna com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,0001$ )

Hormônios comumente utilizados como agentes indutores, já foram avaliados em relação a melhora da taxa de recuperação embrionária por Santos e colaboradores (2010), que utilizou 1000 e 1700UI de hCG, e obteve uma taxa de 59,7 % (52/87) e 62,2% (28/45), respectivamente e em relação ao controle essa taxa foi de 56 % (51/91). Kolling e Allen (2005) recuperaram 44 embriões de 80 lavados (55%) nas éguas tratadas com a hCG, 63 embriões de 92 lavados (68,5%) para éguas tratadas com 0,75 mg de BioRelease Deslorelina, sendo assim, não houve melhora na taxa de recuperação embrionária com o uso desses agentes. Corroborando com os dos resultados do presente estudo onde, para o G1 e G2 a taxa de recuperação embrionária foi de 75% (6/8), enquanto que no G3 a taxa de recuperação embrionária foi de 44,4% (4/9), e não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 3).

A taxa de gestação aos 15 dias foi de 69,2% (9/13). Nas éguas em que foi administrado hCG a taxa de gestação aos 15 dias foi de 100% (4/4), para as éguas tratadas com Deslorelina 5 éguas receberam embrião e somente 2 ficaram gestantes (40%) e no grupo controle de 4 embriões transferidos apenas 3 éguas ficaram prenhez (66,6). Também foi verificada a taxa de perda embrionária precoce (P.E.P.), sendo essa de 25%, 0% e 33,3%, para G1, G2 e G3, respectivamente. Não foi possível realizar análise estatística desses dados, pois o número amostral não foi suficiente. Porém na relação entre os percentuais os resultados corroboram com o de Jacob e colaboradores (2002) e Gomes et al. (2004), em programas comerciais de TE, mostraram que o método transcervical, gera taxas de prenhez em torno de 70%.

Ao avaliar perda embrionária precoce em um programa comercial de TE não cirúrgica em éguas da raça Mangalarga Marchador durante seis estações reprodutivas, Rocha et al. (2007) obtiveram média geral para taxa de prenhez aos 15 dias de 74,3% e perda embrionária precoce (PEP) aos 30, 45 e 60 dias de: 4,8%; 9,0%; e 12,2%, respectivamente.



**Gráfico 2 :** Distribuição percentual de parâmetros reprodutivos como: taxa de recuperação embrionária, taxa de gestação aos 15 dias, taxa de gestação aos 30 dias e perda embrionária precoce (P.E.P.), comparando o G1, G2 e G3.

## 5 CONCLUSÕES

- Com base nas observações conclui-se que o uso de agentes indutores como hCG na dose de 1000 UI ou a Deslorelina na dose de 0,75 mg foram eficazes em promover a ovulação em até 48 horas, quando utilizados em folículos  $\geq 35$  mm de diâmetro e presença de edema uterino, reduzindo dessa maneira os custos com hormônios em programas reprodutivos de equino.
- Não houve diferença estatística na taxa de recuperação embrionária com o uso dos agentes indutores da ovulação, porém houve uma melhora numérica. Desta maneira devemos ter um número amostral maior para observar se existe melhora na taxa de recuperação embrionária com uso de hCG ou Deslorelina.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. Artificial control of the mare's oestrus cycle. **Veterinary Record**, v. 104, p. 166, 1977.
- ALLEN, W. R.; COOPER, M. J. Prostaglandins. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993. Cap. 8, p.69-80.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513- 527, 2001.
- ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse: I. Development in utero. **Reproduction**, v. 123, p. 445-53, 2002.
- ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TIPLADY, C.; BUTTERFIELD, R. M. The influence of maternal size on pre and post natal growth in the horse: III Postnatal growth. **Reproduction**, v. 127, p. 67-77, 2004.
- ALONSO, M. A. **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião**. 2007. 87p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embrião In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Guarujá. **Anais...** São Paulo: **Acta Science Veterinariae**, v. 36 (supl. 1), p. 207-214, 2008.
- ALVARENGA, M. A.; ALVARENGA, F. C. L.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. In: International Symposium on Equine Embryo Transfer, 13., 1992, Buenos Aires, Argentina. **Resumos...** Buenos Aires, p. 34-35, 1992.
- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; OLIVEIRA, J. V. Transferência de embriões na espécie eqüina. **Apostila de transferência de embriões na espécie eqüina**. Botucatu. 2008.
- ALVARENGA, M. A. Problemas e soluções em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Porto de Galinhas. **Workshop 2: Estratégias de otimização da produção de embriões em programas de TE em equinos**, Pernambuco: **Acta Science Veterinariae**, p.59-62, 2010.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ARRUDA R. P.; VISINTIN J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI E. C. C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 233-239, 2001.

ATAYDE, L. M. Características do ciclo reprodutivo da égua no norte de Portugal. **Trabalho de síntese, provas de aptidão pedagógica e capacidade científica**. ICBAS, p. 1-64, 2008.

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 6, p. 312-317, 2000.

BEAL, J. **Indução da ovulação em éguas crioulas com diferentes dose de Gonadotropina Coriônica Humana. 2008. 39p.** Dissertação (Mestrado) . Programa de pós graduação em Medicina Veterinária - Universidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

BEREZOWSKI, C. J.; STITCH, K. L.; WENDT, K. M.; VEST D. J. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n.6, p. 231-233, 2004.

BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. **Theriogenology**. v. 26, p. 733-747, 1985.

BERGEFELT, D.R. Ovarian follicular waves dynamics in mares. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 26, p. 104-124, 1998.

BERGEFELT, D.R. Estrous synchronization. In: Samper J.C. (Ed) **Equine breeding management and artificial insemination**. Saunders Comp, Pennsylvania., p.229-246, 1999.

BERGEFELT, D. R. Estrous synchronization. mare In: SAMPER J.C.; PYCOCK, J.; McKINNON, O. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: Saunders, p. 195 – 228, 2000.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; SCHUMACKER, J. **Manual of equine reproduction**. Publicado por: C.V. MOSBY, 2ªed., p.25-26, 2003.

BRAGG, N. D.; PIERSON, R. A.; BUSS, D. G.; CARD, C. E. Transrectal Tonometric Measurement of Follicular Softening and Computer Assisted Ultrasound Image Analysis of Follicular Wall Echotexture During Estrus in Mares. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 47, p. 242-245, 2001.

BRINSKO, S.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Transported Equine Semen. **Recent Advances in Equine Reproduction**, 2000.

CAMILO, F.; VANNOZZI, I.; LUZIO, B. D.; ROMANGNOLI, S.; ARIA, G.; ALLEN, W. R. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 380-385, 2003.

CAMILLO, F.; PACINI, M.; PANZANI, D.; VANNOZZI, I.; ROTA, A.; ARIA, G. Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mare. **Veterinary Research Communications**, v. 28 (Suppl 1), p. 169-72, 2004.

CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; TOSI, U.; FAUSTINI, M.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M. C. Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. **Theriogenology**, v. 68, p. 914-919, 2007.

CARNEIRO, G. F. Transferência de embriões em equinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, p. 1-6, 2005.

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

CARVALHO, G. R. **Estudos de alguns aspectos da transferência de embriões equinos**. 2000. 102p. Tese (doutorado) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

CARVALHO, G.R; FILHO, J.M.S; FONSECA, F.A; RUAS, J.R.M; BORGES, A.M. Influência da técnica de coleta sobre a taxa de recuperação de embriões equinos. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 5, 2001.

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

CHAVATTE, P.; PALMER, E. Induction of ovulation in the mare. **Equine Veterinary Education**, v. 10, n.1, p. 26-30, 1998.

COSTA, A.L.A. **Controle reprodutivo e transferência de embriões em equinos**. 2010, 33p. Relatório final de estágio Mestrado Integrado em Medicina Veterinária – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2010.

COX, T. J.; SQUIRES, E. L.; HONDACT; CARNEVALE, E.M. Effect of Follicle Size and Follicle-Stimulating Hormone on Ovulation Induction and Embryo Recovery in the Mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 4, 2009.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. How to reliable is to use the preovulatory follicular diameter of a previous cycle as a guide to optimize breeding time in the mare? In: **Proceedings of the European Equine Meeting of the Year SIVE FEEVA Congress**, Italy, p. 357-358, 2008.

- CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J.; NEWCOMBE, J.R. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. **Theriogenology**, v. 71, p. 1267-1275, 2009.
- DAELS, P. F.; STABENFELD, G. H.; HUGHES, J. P.; ODENSVIK, K.; KINDAHL, H. Effects of flunixin meglumine on endotoxin-induced prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion during early pregnancy in the mare. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 76-281, 1991.
- DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 121-132, 1993.
- DAELS, P. Embryo transfer tips and tricks. In: **Proceedings 5<sup>th</sup> European Veterinary Conference**, Voorjaarsdagen, Amsterdam, p. 213-215, 2007.
- DAY, F. T. Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after treatment with the gonadotrophic hormones. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 29, p.459-469, 1939.
- DESKUR, S. Twinning in the Thoroughbred mares in Poland. **Theriogenology**, n. 23, p. 711-718, 1985.
- DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Follicular waves and circulating concentrations of onadotropins inhibin and estradiol during the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v. 124, p. 975-885, 2002.
- DOUGLAS, R. H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, v. 11, p. 33-36, 1979.
- DOUGLAS, R. H. Some aspects of equine embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 405-408, 1982.
- DRIANCOURT, M. A.; PALMER, E. Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 283-291, 1982.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl. v. 35, p. 221 - 228, 1987.
- ENGLAND, G. C. W. Manipulation of Cyclical Activity. **Fertility and Obstetrics in the Horse V**, 3rd Ed, Blackwell Publishing, p. 43-50, 2005.

EVANS, M. J.; IRVINE, C. H. G. The serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycles and pregnancy in the mare. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl 23, p. 193-200, 1975.

EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 240-246, 2003.

FARQUHAR, V. J.; McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K.; SQUIRES, E. L. Efficacy of the GnRH agonist Deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 20, n. 11, p. 722 – 725, 2000.

FILHO, A. N. R. **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**. 2005. 64p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2005.

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A.; COSTA NETO, J. B. F.; PAPA, F. O. Transferência de embriões em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 485-487, 1987.

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 51, p. 261, 1999.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; CELEGHINI, E. C. C.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Efeitos do gananhão e técnica reprodutiva sobre os índices de recuperação e gestação em um programa de transferência de embriões na raça mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 34-37, 2001.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; BALIEIRO, J. C. C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, **Anais...** Araxá, Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, n. 1; p. 502, 2006.

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 eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n.1, p. 27-31, 2007.

FITZGERALD B. P.; McMANUS C. J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 335-340, 2000.

FORHEAD, A. J.; OUSEY, J. C.; ALLEN, W. R.; FOWDEN, A. L. Postanal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. **Journal Endocrinology**, v. 181, p. 459-67, 2004.

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

FORTUNE, J. E. Selection and maintenance of the dominant follicle: An introduction. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 637, 2001.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1320-1327, 1997.

GASTAL, E. L.; BERGFELT, D. R.; NOGUEIRA, G. P.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1492-1498. 1999.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O., NOGUEIRA, G. P., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH, and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 925-940, 2000.

GASTAL, E. L.; SILVA, L. A.; GASTAL, M. O., EVANS, M. J. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 186-190, 2006.

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

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 9, p. 4-12, 1989.

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

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare. 2<sup>a</sup> Ed. Wisconsin: Equiservices, p. 642, 1992.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Growth of animal follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 105-111, 1993.

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.; WOODS, B. G.; MEIRA, C.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v. 126, p. 653-660, 2003.

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

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 315-323, 2005.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction Science**, v. 1, n.1, p. 31-44, 2004.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 454-460, 2008.

GINTHER, O. J.; JACOB, J. C. F.; GASTAL, M. O. GASTAL, E. L.; BEG, M. A. Development of one versus multiple ovulatory follicles and associated systemic hormone concentrations in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2009a.

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

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B. Utilization of mares after first post partum ovulation as embryo recipients, In: 6<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2004, Rio de Janeiro, Brasil. **Proceedings...** Rio de Janeiro: 2004.

GOMES, G. M.; GOMES, L. P. M. Fatores que influenciam a produção de embriões em éguas doadoras. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Guarujá. **Anais...** São Paulo, Acta Science Veterinariae, v. 36 (supl.2), n.1, p. 199-206, 2008.

GREENHOFF, G.R.; KENNEY, R.M. Evaluation of reproductive status of pregnant mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, p. 449, 1975.

GUERRA, P.; MEDEIROS, S. A. F. O agronegócio da equideocultura no Brasil. In: I SIMPÓSIO MINEIRO DE EQUIDOCULTURA, Viçosa. **Anais...** Viçosa, MG, p. 1-7, 2007.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**, Philadelphia: Lea & Febiger, ed. 7, p. 509, 2000.

HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. **Animal Reproduction Science**, v. 33; p. 227-40, 1993.

HIRSHFIELD, A. N. Comparison of granulose cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepuberal and mature rats. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 979-987, 1985.

HUDSON, J. J.; McCUE, P. M. How to increase embryo recovery rates and transfer success. In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, p. 1473-1204, 2004.

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

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. The oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 23, p. 161-166, 1975.

IMEL, K.J. Recovery, culture and transfer of equine embryos. **MS Thesis**, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, 1981.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 24/5/2011.

IVKOV, V.; IVANCEV, N.; VESELINOVIC, S.; GRUBAC, S.; VESEKINOVIC, S.; DOVENSKI, T.; MICKOVSKI, G.; KOCOSKI, L.; POPOVSKI, K.. Ultrasonic Measurement of Follicle's Diameter in Estrus of Mares. In: 7th Conference for Ovine and Caprine Production & 5<sup>th</sup> Symposium on Animal Reproduction, Ohrid, **Proceedings ...** p. 1-3, 1999.

JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B.; GASTAL, E. L. et al. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 545, 2002.

JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CARVALHO, G. R.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle Deviation in Ovulatory Follicular Waves with One or Two Dominant Follicles in Mares. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 248-254 2009.

JACOB, J. C. F.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J.P.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E.L. Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. **Animal Reproduction Science**, v.121, n. 1, p. 305-306, 2010.

JACOB, J. C. F.; SANTOS, G. O.; SÁ, M. A. F.; OLIVEIRA, J. P. Uso clínico de HCG em um programa de transferência de embriões equino: mitos e verdades. **A Hora Veterinária**, Ano 30, n.180, março/abril, 2011.

KENNEY, R. M., CONDON, W., GARJAN, V. K., CHANNING, C. P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresia. **Journal Reproduction Fertility**, v. 27, p. 163-171, 1979.

KNOTTENBELT, D.C.; LeBLANC, M.; LOPATE, C.; PASCOE, R.R. **Equine Stud Farm Medicine and Surgery**, Saunders Elsevier Science, 1º ed, p. 402, 2003.

KÖLLING, M.; ALLEN, W. R. Ovulation induction for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue. Havemeyer Foundation Monograph Serie. n. 18, p. 54-55, 2005.

LeBANC M.; LOPATE, C.; KNOTTENBELT, D.; PASCOE, R. The mare. **Equine stud farm medicine and surgery V**. Saunders Elsevier Science, 1º ed, p. 113-212, 2003.

LeBLANC, M. M. Reproduction Deduction – Part 2. In: **Proceedings of North America Veterinary Conference**, Orlando, 2006.

LINCOLN, G. A. The pineal gland. In **Austin, G.R. & Short, F. R.S. (eds). Reproduction in Mammals, Hormonal control of Reproduction**. New York, Cambridge University Press, 2ºed, p. 52-75, 1987.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Transferência de embrião equino: Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n.4, p. 132-140, 2009.

LISA, H .M.; MEADOWS, S. Essential management practices in commercial equine embryo transfer. **Proceedings 7<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer**, Cambridge, UK, p. 101-102, 2008.

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

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M. A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. . In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Araxá. **Anais...** Araxá: Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, p. 39-49, 2006

MACHADO, M. S. Dinâmica folicular em éguas. *In*: Seminário do Curso de Pós-Graduação, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 20p, 2002.

MAIO, J.R.G.; FLEURY, P.D.C.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; TEIXEIRA, A.A.; SOUZA, E.D.F.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de éguas adultas cíclicas tratadas com diferentes indutores de ovulação. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Porto de Galinhas. **ANAIS...**, p.365, 2010.

MALINOWSKY, K. Recent advances in reproduction in horses. In: <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs717>, 2002.

McCRACKEN, J. A ., EDWARD, E. C.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A Neuroendocrine-mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n.2, p. 263-323, 1999.

McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K.; KEITH, S. L.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 267, 1999.

McCUE, P. M.; HUDSON, J. J.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: A new look at an old issue. In: **Proceedings of the 50 th annual convention of the American association of equine practioners**, p. 510-513, 2004.

McCUE, P. M.; MAGEE, C.; GEE, E. K. Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 27, n. 2, p. 58-61, 2007.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 305-330, 1988.

MCKINNON, A. O.; BROWN, R. W.; PASSION, R. L. Increased ovulation rate in mares after immunization against recombinant bovine inhibin  $\mu$ -subunit. **Equine Veterinary Journal**. London, v. 24, p. 144-146, 1992.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. The estrous cycles. In: Mckinnon, **Equine Reproduction.**, Malvern: Lea & Febizer, p. 114–189, 1993.

MCKINNON, A. O., NOBELLIOUS, A. M., TARRIDA DEL MARMOL FIGUEROA, S. SKIDMORE, J., VASEY, J. R., TRIGG, T. E. Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 321-323, 1993.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related technologies. In: **Current Therapy Equine Reproduction**, Saunders, Missouri, p. 319-334, 2007.

MEINERT, C. J. F.; SILVA, I.; KROETZ, E.; KLUG, T. E.; TRIGG, H. O.; HOPPEN; JÖCHLE, W. Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 65-68,1993.

MEIRA, C. Endocrinologia da reprodução, dinâmica folicular, superovulação e transferência de embriões na espécie eqüina. **Apostila do curso de inseminação e transferência de embriões em eqüinos**. Botucatu, Outubro/2007.

MELO, C. M.; PAPA, F. O.; MEDEIROS, A. S. L.; DELL'AQUA JR, J. A.; CARMO, M. T.; ARAÚJO, G. M.; ALVARENGA, M. A. Efeito da Deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 2005, Angra dos Reis. **Anais...** Rio de Janeiro: Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, p. 193, 2005.

MONAHAN, M. W., AMOSS, M. S., ANDERSON, H. A., VALE, W. Synthetic analogs of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor with increased agonist or antagonist properties. **Biochemistry**, v. 12, p. 4616-4620, 1973.

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

MOREL, M. D. "Mare Insemination", **Equine Artificial Insemination VIII**, Cabi Publishing, p. 302-336, 1999.

MOREL, M. D. Endocrine control of reproduction in the mare. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management III**, Cabi publishing, 2<sup>nd</sup> ed., p. 28-39, 2003.

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

MORENO, M. P.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, G. O.; SÁ, M. A. F.; ECKER, M. K. C.; JACOB, J. C. F. Avaliação da resposta ovulatória de éguas da raça mangalarga marchador a diferentes doses de hCG. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Porto de Galinhas. **ANAIS...** Pernambuco: Acta Scientiae Veterinariae, p. 381, 2010.

MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, v. 34; p. 51-60, 2002.

MOYA-ARAUJO, C. F.; BRAGA, J. T.; SCHIRATO, D.; ARAUJO, D. C.; DELL'AQUA JR., J. A.; ARAUJO, G. H. M. Indução da ovulação de folículos com diferentes diâmetros com deslorelin em éguas. . In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Porto de Galinhas. **ANAIS...** Pernambuco: Acta Scientiae Veterinariae, p. 412, 2010.

MOZZAQUATRO, F. D. **Aspiração folicular na égua para indução da função lútea**. 2008. 70p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

MUMFORD, E. L.; SQUIRES, E. L.; JÖCHLE, W.; HARRISON, L. A.; NETT, T. M.; TRIGG, T. E. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 129-140, 1995.

NAMBO, Y.; NAGAOKA, K.; TANAKA, Y.; NAGAMINE, N.; SINBO, H.; NAGATA, S.; YOSHIHARA, T.; WATANABE, G.; GROOME, N. P.; TAYA, K. Mechanisms responsible for increase in circulating inhibin levels at time ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 1707-1717, 2002.

NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mares. Physiological, pathophysiological and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 27, p. 181-189, 1979.

NEELY, D.P. Reproductive endocrinology and fertility in the mare. In: Neely, Liu, Hillman (eds). **Equine Reproduction**. Vet. Learning Systems Co., INC, p. 12-22, 1983.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 187-195, 1972.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical transfer of equine embryos. **Archives of Andrology**, v. 5, p. 108, 1980.

PALHARES, M. S. Inseminação artificial em equinos, incluindo transporte de sêmen. In: IV Simpósio Nacional de Reprodução Animal. Belo Horizonte. **Anais...** Campinas: Fundação Cargiul, 1988.

PALMER, E. Induction of ovulation. In: McKinnon, A.O. & Voss, J.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, p.344-347, 1993.

PERES, K. R.; TRINQUE, C. L. N.; LIMA, M. M.; DUARTE, M. C.; MEIRA, C. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology**, v. 57, p. 558-558, 2002.

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

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular population dynamics during the estrus cycle of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 14, n. 3, p.2 19-31, 1987.

PIMENTEL, C. A.; TAROUCO, A. K.; HAMMES, A. M. Ovulações Múltiplas Em Éguas Abatidas em Pelotas- RS. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 271-275, 1995.

PINTO, C. R. F.; MEYERS, P. J. Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Ed.) **Current therapy in large animal theriogenology**. Elsevier Science, St. Louis, p. 91-98, 2007.

PYCOCK, J. F.; DIELEMAN, S.; DRIFJIHOUT, P.; VAN DER BRUG, Y.; OEI, C.; VAN DER WEIJDEN, G. C. Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the cycling mare. **Reproduction Domestic Animal**, v. 30, p. 224-227, 1995.

PYCOCK, J.F. "Artificial Insemination" **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow**, p. 224-234, 2008.

REITER, R. J. Comparative physiology: pineal gland. **Annual Review Physiology**, v. 35, p. 305-328, 1973.

ROCHA, A. N.; LOPES, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; SIQUEIRA, J. B.; TORRES, C. A. A.; PINHO, R. O.; CARVALHO, G. R. Pregnancy rates and early embryo loss in a comercial embryo transfer program in Mangalarga Marchador Mares. In: 17º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba, **ANAIS...**, Paraná, p. 160, 2007.

ROOSDALE, P. D.; RICKETTS, S. W. **Equine Stud Farm Medicine**, Londres, Baillière Tindall, 2ºed, p. 564, 1980.

ROSER, J. F. The development of antibodies to human chorionic gonadotrofina following its repeated injection in the cyclic mares. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. V. 27, p. 173-179, 1979.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.

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

SAMPER, J. C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 219-228, 2001.

SAMPER, J. C.; JENSEN, S.; SERGEANT, J.; ESTRADA, A. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 22, n.7, p. 320-323, 2002.

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Saunders, 2007.

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

SANTOS, G. O.; NOGUEIRA, B. G.; DEVEZA, R. F. R.; SÁ, M. A. F.; JACOB, J. C. F. Avaliação do efeito de diversos parâmetros sobre a eficiência de um programa comercial de transferência de embriões em eqüinos. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Guarujá. **ANAIS...** Acta Science Veterinariae, v. 36, n.1, p.633, 2008.

SANTOS, G. O.; SÁ, M. A. F.; OLIVEIRA, J. P.; MORENO, M. P.; ECKER, M. K. C.; JACOB, J. C. F. Influência de diferentes doses de hCG sobre a recuperação embrionária em éguas da raça mangalarga marchador. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Porto de Galinhas. **ANAIS...** Pernambuco: Acta Scientiae Veterinariae, p. 371, 2010.

SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. Ephrata: **Current Conceptions**, 2ºed., p. 368, 2003.

SHARP, D.C. Environmental influences on reproduction in horses. **Vet. Clin. N. A.** v. 2, p. 207-223, 1980.

SIDDIQUI, M. A. R.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Effect of hCG in the Presence of hCG Antibodies on the Follicle, Hormone Concentrations, and Oocyte in Mares. **Reproduction Domestic Animals.** v. 44, p. 474-479, 2009.

SIEME, H.; SCHAFFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1153-64, 2003.

SILVA, L. A. **Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos.** 2003. 145 p. Tese (Doutorado), Departamento de Zootecnia a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2003.

SMITH, J. D. Drugs in equine reproduction: what you need to know and more. In: **Proceedings of the North American Veterinary Conference**, 21, Orlando, 2007.

SOUZA, F. A. C. S. **Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões.** 2006. 85p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

SQUIRES, E.L. Progesterone. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction.** Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 6, p. 57-64, 1993.

SQUIRES, E. L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; KEEFE, T. J.; MEYERS, S. A.; FIGUEIREDO, E.; McCUE, P. M.; JÖCHLE, W. Effect of dose of GnRH analog on ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 41, p. 757-769, 1994.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction and biotechnology laboratory.** Colorado State University, Bulletin 8, 1995.

SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51(1), p. 91-104, 1999.

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

STABENFELDT, G. H. HUGHES, J. P.; EVANS, J. W. Ovarian activity during the estrous cycle of mare. **Endocrinology**, v. 90, p. 123-129, 1972.

STANTON, M. B.; STEINER, J. B.; PUGH, D. G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 1, p. 14-9, 2004.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 5, p. 467-78, 2006.

SUGIE, T. Successful transfer of a fertilized bovine egg by nonsurgical techniques. **Journal Reproductive Fertility**, v. 10, p. 197-201, 1965.

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

TAROUCO, A. K. **Estacionalidade reprodutiva de éguas abatidas em Pelotas - RS**. 1992. 80p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas - RS. 1992.

TROEDSSON, M. T.; LIU, I. K. M.; ING, M. G.; PASCOE, J. Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F2a and prostaglandin E2 on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. **Biology Reproduction**, v. 1, p. 475-488, 1995.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; CRABO, B.G. Sperm Transport and Survival In The Mare. **Theriogenology**, v. 49, p. 905-915, 1998.

URQUIETA, B.; DURÁN, M. C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V. H. hCG-Induced Ovulation in Thoroughbred Mares Does Not Affect Corpus luteum Development and Function During Early Pregnancy. **Reproduction Domestic Animals**. v. 44, p. 859–864, 2009.

VANDERWALL, D. K. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: Ball B.A. (Ed.) **Recent Advances in Equine Theriogenology**. International Veterinary Information Service. Disponível na Internet <http://www.ivis.org>, 2000.

VANDERWALL, D. K.; JUERGENS, T. D.; WOODS, G. L. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with hCG or Ovuplant™ (deslorelin). **J. Equine Veterinary Science**, v. 21, p. 539-542, 2001.

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

VOGELSANG, S. G.; SORENSEN, A. M.; POTTER, G. D.; BURNS, S. J.; KRAEMER, D. C.. Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**. V. 27, p. 383-386, 1979.

VOGELSANG, S. G.; BONDIOLI, K. R.; MASSEY, J. M. Commercial application of equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal Suppl.*, v.3, p.89-91, 1985.

VOSS, J. L. Human chorionic gonadotropin. In: MCKINNON, A. O., VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febinger, Cap. 35, p. 325-328, 1993.

WEBER J. A.; WOODS G. L; LICHTENWALNER A. B. Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. **Biology Reproduction**, v. 1, p. 125-130, 1995.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 38; n. 5; p. 428-32, 2006.

WITHERSPOON, D. M.; TALBOT, D. V. M. The site of ovulation in the mare. . **Journal Reproduction Fertility**, Suppl 23, p. 329, 1970.

WOODS, J.; RIGBY, S.; BRINSKO, S.; STEPHENS, R.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. **Theriogenology**, v. 53, p. 1827- 1836, 2000.