UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

ANA PAULA REWAY

Desenvolvimento de protocolo de sincronização da onda folicular e determinação do momento ideal para indução da ovulação na espécie equina

Pirassununga – SP
2017

ANA PAULA REWAY

Desenvolvimento de protocolo de sincronização da onda folicular e determinação do momento ideal para indução da ovulação na espécie equina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Área de Concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

De acordo:_____

Orientador

Pirassununga - SP

2017

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3439
FMVZ

Reway, Ana Paula
Desenvolvimento de protocolo de sincronização da onda folicular e determinação do momento ideal para indução da ovulação na espécie equina / Ana Paula Reway. -- 2016.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia do Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia do Animais Domésticos e Silvestres.

.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva.

1. Éguas. 2. Sincronização. 3. Estro. 4. Ovulação. 5. Hormônio. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de protocolo de sincronização da onda folicular e determinação do momento ideal para indução da ovulação na espécie equina.", protocolada sob o CEUA nº 6739040215, sob a responsabilidade de **Luciano Andrade Silva** *e equipe; Ana Paula Reway* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/11/2016.

We certify that the proposal "Development of a follicular wave synchronization protocol and establishment of the ideal time to ovulation induction in mares.", utilizing 10 Equines (10 females), protocol number CEUA 6739040215, under the responsibility of **Luciano Andrade Silva** *and team; Ana Paula Reway* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2015 a 05/2016 Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Origem:

Espécie:	Equídeos	sexo: Fêmeas	idade: a	N:	10
Linhagem:	Mestiças		Peso: a .		

Resumo: Este estudo é composto por duas fases. Na primeira, experimentos serão realizados com o objetivo de provocar a atresia folicular e posterior emergência de uma nova onda folicular de forma sincrônica em éguas. Serão testados implantes intravaginais de progesterona que, se necessário, terão sua dose de liberação diária de progesterona alterados. Outra procedimento a ser testado, se necessário, será a ablação de todos os folículos ovarianos no início do protocolo. Na segunda fase, o momento ideal da indução da ovulação e a eficiência do protocolo utilizado serão avaliados por escaneamentos ultrassonográficos periódicos.

Local do experimento:

São Paulo, 23 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676/0904 / fax: 55 (11) 3032-2224
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h as 17h : e-mail: ceuavet@usp.br
CEUA N 6739040215

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REWAY, A. P.

Título: **Desenvolvimento de protocolo de sincronização da onda folicular e determinação do momento ideal para indução da ovulação na espécie equina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

APROVADO EM: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e inteligência para superar todas as dificuldades e conseguir concluir esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, pelo apoio, auxílio, paciência e supervisão durante o processo de orientação.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, pelos ensinamentos e pela contribuição com o material necessário para execução deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, por colocar à disposição a área experimental.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha família e amigos pela ajuda, paciência, carinhoe incentivo.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência. Obrigada por me tornarem uma pessoa e profissional melhor a cada dia. Qualquer coisa que possa fazer para retribui tamanho amor nunca será o suficiente para expressar minha gratidão por todos os momentos e experiências vividas.

A todos que de certa forma e em algum momento contribuíram para realização deste trabalho.

LISTA DE SIGLAS

BE – Benzoato de estradiol

CL – Corpo lúteo

DP – Desvio Padrão

DIP – Dispositivo intravaginal de progesterona

FIV – Fertilização in vitro

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH –Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

LH – Hormônio luteinizante

OV – Ovulação

P4 – Progesterona

PGF2α – Prostaglandina F 2-alfa

TE – Transferência de embriões

TETF - Transferência de embriões em tempo fixo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

2.1 Aspectos gerais relacionados à sincronização da onda folicular e da indução da ovulação em tempo fixo na espécie equina 13

2.2 Sincronização da onda folicular na espécie equina 14

2.3 Indução da ovulação em tempo fixo na espécie equina 16

3. OBJETIVOS 20

3.1 Objetivos gerais 20

3.2 Objetivos específicos 20

4. HIPÓTESE 20

5. MATERIAIS E MÉTODO 21

5.1 Animais e local 21

5.2 Coleta de dados 21

5.3 Análise estatística 22

5.4 Experimento I – Sincronização da onda de crescimento folicular em éguas com status reprodutivo desconhecido durante o período de transição de outono 23

5.5 Experimento II – Determinação do momento ideal de retirada do dispositivo de P4 em protocolos de sincronização do estro em éguas 24

5.6 Experimento III – Eficiência do protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular sua dependência da fase do ciclo estral e definição do melhor momento para a indução da ovulação 25

5.7 Experimento IV – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em diferentes fases do ciclo estral 26

5.8 Experimento V – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em éguas com status reprodutivo conhecido 28

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30

6.1 Experimento I – Sincronização da onda de crescimento folicular em éguas com status reprodutivo desconhecido durante o período de transição de outono 30

6.2 Experimento II – Determinação do momento ideal de retirada do dispositivo de P4 em protocolos de sincronização do estro em éguas 35

6.3 Experimento III – Eficiência do protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular sua dependência da fase do ciclo estral e definição do melhor momento para a indução da ovulação 41

6.4 Experimento IV – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em diferentes fases do ciclo estral..... 48

6.5 Experimento V – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em éguas com status reprodutivo conhecido 50

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 53

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

RESUMO

Foram realizados cinco experimentos com o objetivo de sincronização do estro e indução da ovulação em tempo fixo em éguas. **Experimento I:** avaliou a eficácia de um novo protocolo hormonal para a sincronização do estro, sendo realizado durante o período transicional em éguas cujo status reprodutivo era desconhecido. **Experimento II:** foi delineado para determinar o momento ideal para retirada dispositivo intravaginal de progesterona (DIP), sendo o dispositivo retirado no dia 7, 8 ou 9 do protocolo de tratamento hormonal. **Experimento III:** testou se a eficiência do protocolo é dependente da fase do ciclo estral da égua e definiu o melhor momento para indução da ovulação. **Experimentos IV e V:** as éguas foram submetidas ao protocolo completo de sincronização da onda folicular e indução da ovulação em diferentes fases do ciclo estral ou com status reprodutivo conhecido. A hipótese testada foi de que a sincronização do estro e indução da ovulação, com o uso do DIP de 1,44g provoca a supressão do crescimento folicular e através da indução da ovulação, com hCG e GnRH, promove a ovulação dentro de 42 ± 6 horas de no mínimo 75% dos animais. Para isso, os efeitos das prostaglandinas e progestágenos foram avaliados quanto à capacidade de sincronizar a onda de crescimento folicular. Um novo tratamento para induzir a ovulação em tempo fixo foi testado com uma combinação de GnRH e hCG em dois momentos estratégicos (D10 e D12) visando maximizar o número de éguas ovuladas. O protocolo com administração de prostaglandina no D0, D6 e D8 juntamente com a colocação do DIP mantido durante 8 dias (D0 ao D7) demonstrou ser eficaz para suprimir a taxa de crescimento folicular em éguas cíclicas. Nas éguas submetidas a este protocolo as ovulações que ocorreram naturalmente se concentraram entre os dias 10 e 13 do tratamento. Foi testada a eficiência da indução da ovulação no D10 e D12. Na maioria dos animais tratados, o folículo pré-ovulatório foi responsivo à combinação de GnRH e hCG promovendo o sucesso da indução da ovulação. A eficiência do protocolo hormonal testado para sincronização do estro e da ovulação foi de 76,73%, sustentando a hipótese deste estudo. Novos estudos devem ser realizados em um maior número de animais para possíveis adequações na terapia hormonal e verificação do resultado em um grande número experimental de animais.

Palavras-chave: éguas, sincronização, estro, ovulação, hormônio

ABSTRACT

Five experiments were conducted with the objective of estrus synchronization and fixed time ovulation induction in mares. **Experiment I:** evaluated the efficacy of a new hormonal protocol for estrus synchronization in mares whose reproductive status was unknown during the transitional period. **Experiment II:** was designed to determine the best time to remove the P4 intravaginal device (PID). The device was removed on day 7, 8 or 9 of the hormonal treatment protocol. **Experiment III:** tested if protocol efficiency depends on the stage of mare's estrus cycle and indicated the best time for hormonal induction of ovulation. **Experiments IV and V:** mares were submitted to the full protocol of follicular wave synchronization and ovulation induction at different stages of estrus cycle or at known reproductive status. The tested hypothesis was that the estrus synchronization and induction of ovulation, using an PID of 1.44g, causes suppression of follicular growth, and ovulation induction using hCG and GnRH promote ovulation within 42 ± 6 hours of at least 75% of treated animals. The effect of prostaglandin and progestagens at specific times were evaluated for the ability to synchronize follicular wave. A new treatment to induce fixed time ovulation was tested with GnRH and hCG combination in two strategic moments (D10 and D12) to maximize the number of ovulated mares. Administration of prostaglandin at D0, D6 and D8 together with PID maintained for 8 days (D0 to D7) proved to be effective to suppress follicular growth during reproductive period. In mares submitted to this protocol, ovulation occurred naturally and concentrated between D10 and D13. The ovulation induction efficiency was tested at D10 and D12. Most of the animals had preovulatory follicle responsiveness to GnRH and hCG, promoting the success of ovulation induction. The efficiency of the tested synchronization of estrus and ovulation induction protocol was 76.73% and supported the hypothesis of this study. Further studies should be performed on a larger number of animals for possible adjustments in hormonal therapy and verification of the result in a large number of animals.

Keywords: mares, synchronization, estrus, ovulation, hormone

1. INTRODUÇÃO

O crescente mercado de equinos no Brasil busca por melhores resultados de fertilidade gerando um maior interesse pelo aprimoramento das biotécnicas da reprodução. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA; 2013) a equideocultura nacional possui o maior rebanho da América Latina e o terceiro em âmbito mundial, com um total de aproximadamente oito milhões de cabeças, movimentando anualmente em torno de R$ 7,3 bilhões.

Atualmente, a transferência de embriões (TE) é considerada a ferramenta mais eficiente para o melhoramento genético em equinos. Segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS; 2013), o Brasil recuperou e transferiu 19.680 embriões equinos em 2013, um aumento de 17% em relação aos 16.800 embriões produzidos em 2012. Juntamente com a Argentina, o Brasil lidera a produção de embriões equinos no mundo. Este fato contribui para ressaltar a importância da criação de um protocolo de terapia hormonal eficiente de sincronização da ovulação a fim de atingir um nível de plantel no qual a receptora deixe de ser um gargalo limitante à eficiência dos programas de TE. O ideal seria atingir a máxima utilização possível das receptoras, e possuir apenas uma égua receptora para cada prenhez desejada. No entanto, no plantel de centrais de reprodução equina, um grande número de receptoras é mantido para que ao final da estação reprodutiva, tenha-se a garantia de não faltar animais para permitir o pleno desenvolvimento dos serviços de reprodução, principalmente as transferências de embrião (TE). Alguns proprietários de equinos são extremamente preocupados com suas doadoras e garanhões mas podem ser negligentes com os cuidados com as receptoras, por julgá-las animais de baixo valor. Para redução de custos e trabalho, as receptoras devem passar por rígido processo de seleção e excelente manejo sanitário afim de maximização de seu uso (LOPES, 2015). A utilização de um protocolo hormonal eficiente para a sincronização do estro e da ovulação minimizaria os problemas citados sobre o manejo das receptoras em centrais de reprodução.

O conhecimento detalhado sobre a terapia hormonal aplicada à reprodução equina é essencial para superação de desafios impostos por limitações reprodutivas nesta espécie como os efeitos da sazonalidade. No entanto, a variabilidade da resposta a esses tratamentos hormonais tem sido um obstáculo para sua utilização na rotina veterinária (FARIA & GRADELA, 2010). Em bovinos, estes protocolos são utilizados previamente às técnicas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e de transferência de embriões em tempo fixo

(TETF), permitindo o controle da dinâmica folicular e do momento da ovulação com precisão (MADUREIRA et al., 1997).

Em vacas, os protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF ou TETF já estão bem estabelecidos (MADUREIRA et al., 1997). No entanto, até o momento não existe um protocolo eficiente com este mesmo objetivo em éguas. Um bom protocolo é aquele capaz de estimular uma porcentagem considerável de éguas a ovularem dentro de um período de tempo determinado e com pouca variação entre elas (FARIA & GRADELA, 2010; GRECO, 2010). As maiores dificuldades na espécie equina para o desenvolvimento desses protocolos têm sido: 1) provocar a atresia folicular e a emergência sincrônica de uma nova onda folicular, e 2) o estabelecimento de um momento (em tempo fixo) para se proceder com a indução da ovulação. Além disso, o tamanho dos folículos em equinos são muito variados. Estes são apenas alguns dos entraves a serem superados para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de sincronização do estro e ovulação (LAMB et al., 2014).

A melhora dos métodos de sincronização entre doadoras e receptoras e demais matrizes permitirá um manejo reprodutivo programado com os garanhões, reduzirá a necessidade de manipulações, palpações, escaneamentos ultrassonográficos de grande número de éguas e trará benefícios em relação ao tempo estipulado para os procedimentos reprodutivos. A sincronização de fêmeas equinas deve ser um processo viável e acessível tanto para profissionais da área como para produtores rurais. Com base no exposto, este estudo almeja desenvolver um protocolo de terapia hormonal em éguas com a finalidade de sincronizar e induzir a ovulação das mesmas emtempo fixo. Acredita-se que a combinação de prostaglandinas (PGF2α), progestágenos, hCG e acetato de deslorelina em momentos estratégicos poderá resultar em um protocolo de terapia hormonal com eficácia mínima de 75% de sincronização do estro e da ovulação em tempo fixo em éguas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais relacionados à sincronização da onda folicular e da indução da ovulação em tempo fixo na espécie equina

O período mais longo de estro e a maior variabilidade no momento da ovulação dificultam o estabelecimento de um protocolo hormonal eficiente para a sincronização do estro e da ovulação em éguas. Por esse motivo, existem menos protocolos disponíveis nesta espécie em relação aos desenvolvidos para as fêmeas bovinas (BRADECAMP, 2011). Tem sido reportado em bovinos que tratamentos hormonais de sincronização do estro apresentam também um efeito estimulatório para o retorno à ciclicidade. Vacas e novilhas acíclicas têm sido utilizadas em protocolos de IATF apresentando fertilidade próxima aos animais cíclicos (BARUSELLI et al., 2003). Os métodos atuais utilizados para a sincronização do ciclo estral em éguas apresentam razoável precisão para sincronizar o período do estro. No entanto, o momento exato da ovulação é variado. Normalmente são necessárias frequentes avaliações das éguas, no mínimo diárias, por palpação e ultrassonografia para se precisar o momento da ovulação (LARSEN & NORMAN, 2010).

Vários fatores podem ocasionar variações na resposta ao tratamento hormonal em éguas como, por exemplo: o padrão de crescimento folicular e o diâmetro dos folículos pré-ovulatórios, a idade do animal e o período da estação reprodutiva (BEAL et al., 2011).

Por meio do estudo da dinâmica folicular compreende-se que no momento da remoção do implante de P4, que mimetiza a lise do corpo lúteo, se houver um folículo dominante, este pode progredir rapidamente para a ovulação. Caso haja apenas pequenos folículos no momento da remoção da progesterona pode demorar aproximadamente sete a dez dias para que o novo folículo cresça e atinja a dominância, com posterior ovulação. Se todos os folículos possuíssem tamanho semelhante no início do tratamento, isso favoreceria a sincronização da ovulação (LARSEN & NORMAN, 2010). A investigação sobre a dinâmica folicular e a administração de hormônios que modulem a onda de crescimento folicular será realizada neste estudo.

2.2. Sincronização da onda folicular na espécie equina

A sincronização da onda folicular, e consequentemente do estro, objetivam induzir um maior número de fêmeas ao cio, num determinado período de tempo, e são dependentes da

utilização de tratamentos hormonais. Um bom protocolo hormonal é aquele com o qual uma boa sincronização da onda folicular resulta em uma fase de crescimento comum em que uma nova onda de folículos progride de forma semelhante em um grupo de éguas (LARSEN & NORMAN, 2010).

Um dos procedimentos mais simples para sincronização do estro em éguas é a indução da luteólise com o uso de PGF2α ou seus análogos. A luteólise provoca um retorno ao estro mais rápido do que ocorreria em uma égua não tratada. A resposta a este tratamento é diferente em um lote de fêmeas, pois nem sempre todas elas apresentam um corpo lúteo responsivo à PGF2α (FARIA & GRADELA, 2010). Maximiza-se o efeito desejável das sincronizações com utilização de prostaglandinas quando as aplicações são feitas em duas ocasiões com intervalo de 14 dias, independentemente da fase do ciclo estral da égua. Essa estratégia promove o efeito luteolítico na maioria dos animais na segunda injeção, caso o corpo lúteo não seja responsivo na primeira dose. Após a aplicação de PGF2α,o início do estro pode ocorrer em um intervalo de 3 a 4 dias e a ovulação após 8 a 10 dias (SAMPER, 2008). Ataman et al. (2000) demonstraram que a administração de PGF2α na ausência de CL, combinada com a administração de hCG, é efetiva na indução do estro e da ovulação em éguas na fase de transição. A administração de PGF2α pode ser responsável pelo aumento da secreção de FSH e LH e promover a ovulação.

A eficácia reduzida do uso das prostaglandinas no encurtamento do diestro se deve ao fato dos equinos possuírem diferentes padrões de crescimento dos folículos e, na maioria das vezes, apresentarem apenas uma onda de crescimento folicular aumentando a variação entre animais (LOFSTEDT, 2011). A eficácia de qualquer um dos tratamentos luteolíticos pode ser afetada pela fase do ciclo estral. A lise do corpo lúteo acarretará o aumento da concentração de hormônio luteinizante (LH), porém nem sempre haverá um folículo dominante capaz de ovular. O uso das prostaglandinas e seus análogos pode ser associado com a progesterona com o objetivo de melhorar a eficiência da sincronização (STAEMPFLI, 2011).

Tem sido descrito que a utilização dos progestágenos na manipulação do ciclo estral pouco interfere na taxa de crescimento folicular e durante o tratamento pode ocorrer desenvolvimento folicular e até ovulação (GINTHER, 1992). Um dos protocolos pioneiros para sincronização do estro em equinos foi a administração combinada de 150mg de progesterona com 10mg 17ß-estradiol durante 10 dias. Esses hormônios sincronizaram apenas o estro, mas as ovulações ocorreram esparsamente com variação de cinco dias (LOY et al., 1981).

A emergência de uma nova onda folicular também pode ser induzida pela ablação do folículo dominante por meio da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (GASTAL et al., 1997). Deve-se levar em consideração que este procedimento necessita de profissional treinado, pode trazer riscos de acidente ao animal e veterinário caso haja problemas na anestesia e pode ocorrer formação de tecido fibroso no parênquima ovariano quando realizado repetidas vezes (MONTECHIESI, 2009).

Larsen e Norman (2010) desenvolveram um protocolo em que 89% das éguas foram sincronizadas administrando-se no dia 0 (início do tratamento hormonal) 20 ml de benzoato de estradiol associado à inserção de implante intravaginal de P4 (1,72g). O dispositivo intravaginal foi mantido durante 10 dias e no momento da retirada foram administrados 7,5µg prostaglandina$F_{2\alpha}$ (cloprostenol). Neste estudo, 100% das éguas apresentaram atresia folicular após o início do tratamento, simulando o que ocorre quando se realiza a aspiração folicular, porém sem a necessidade do procedimento invasivo. Para indução da ovulação, a recomendação é utilizar os agentes indutores 48 horas após a remoção do implante P4 intravaginal. Caso a intenção seja programar a ovulação em um grupo de fêmeas, os autores recomendam palpação e rufiação 72 horas pós-remoção do dispositivo de P4. Neste experimento, as ovulações do grupo de fêmeas ocorreram em um intervalo entre 5 e 8 dias após finalizado o tratamento com a P4.

Compostos com base de estradiol foram testados em éguas cíclicas. A administração de 17ß-estradiol (50mg, IM) ou de cipionato de estradiol (50mg, IM) associados à prostaglandina (sem progesterona) no dia seguinte à ovulação provocou atresia folicular. Este tratamento proporciona resultados semelhantes aos obtidos quando se utilizam também os progestágenos (PINTO et al, 2004). Squires (1993) sugere a sincronização do estro com a aplicação da P4 intramuscular diariamente ou de seu derivado sintético ativo por via oral, durante períodos que variam de 8 a 14 dias é efetiva.

Newcombe et al. (2002) utilizaram dispositivos intravaginais de liberação gradual de P4 (2g) durante 10 dias em éguas em anestro e em período de transição, associados ao 17ß-estradiol e prostaglandina. Neste estudo, o estro iniciou dois dias após a remoção do dispositivo e folículos maiores do que 35mm foram detectados 2,9 dias pós remoção do dispositivo. A maioria das éguas apresentou secreção vaginal e vaginite com a utilização deste dispositivo.

Outros três protocolos de sincronização foram testados por Almeida et al. (2001). Diferentes fontes de progestágenos foram utilizadas durante nove dias. No primeiro grupo foi

utilizado 0,5 mg/animal/dia de acetato de melengestrol; no segundo grupo, 0,045 mg/kg peso vivo (PV) por via oral (PO) de altrenogest e no terceiro grupo, 3mg de norgestomet IM dose única mais implante subcutâneo (norgestomet 3mg). Os segundo e terceiro grupos obtiveram eficácia na sincronização do estro e os progestágenos nestas doses não alteraram as taxas de prenhez quando comparados a ciclos não manipulados artificialmente.

2.3. Indução da ovulação em tempo fixo na espécie equina

O controle farmacológico do ciclo estral também tem a função de preparar os animais para a indução da ovulação, ou seja, promover a programação de um grupo de fêmeas equinas para ovularem dentro de um intervalo específico de tempo. Fisiologicamente, as éguas apresentam um tempo muito variável na duração do estro e no intervalo até a ovulação. Por esse motivo, a utilização de fármacos indutores da ovulação tem sido uma ferramenta extremamente importante no manejo reprodutivo (BEREZOWSKI et al., 2004). A ovulação programada melhora a logística para as inseminações, pois se controla a hora mais adequada para depositar o sêmen, principalmente o congelado ou de garanhões com baixa fertilidade, no útero da fêmea (MCKINNON & MCCUE, 2011).

Éguas em transição podem ter seu ciclo controlado com uma combinação de luz artificial, progestágenos e agentes indutores de ovulação. Os fármacos usualmente empregados para a indução de ovulação na espécie equina são a hCG e análogos sintéticos de GnRH, como a deslorelina (GINTHER, 1990). A hCG é um hormônio proteico com atividade similar ao do LH e sua eficácia é afetada pela fase do ciclo estral, o tamanho e maturidade folicular (SAMPER, 2008). A hCG não é responsável diretamente pela ovulação, mas está relacionado com o aumento do LH e este sim é o responsável pela ovulação, da mesma maneira que ocorre nas ovulações espontâneas (GINTHER et al. 2008). O GnRH e seus análogos podem ser utilizados como uma alternativa ao uso da hCG na indução de ovulação em éguas, para iniciar um crescimento folicular e para induzir a secreção de FSH em éguas em anestro ou que não desenvolvem folículo pré-ovulatório durante a estação de monta (MCKINNON, 2011). Silva (2011), induzindo a ovulação em éguas com 1000UI de hCG (IV), 0,75mg de deslorelina (IV) e no grupo controle com aplicação de 1ml de solução salina (IV), obteve uma taxa de ovulação em até 48 horas de 96,9% (31/32 éguas), 90% (27/30 éguas) e 30,4% (7/23 éguas), para os grupos hCG, deslorelina e controle, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados, mas sim entre os grupos tratados e o grupo controle.

A hCG é um hormônio que se liga aos receptores de LH induzindo a maturação folicular e consequentemente a ovulação (GINTHER et al., 2009). Os folículos são responsivos ao hCG quando atingem aproximadamente 35mm de diâmetro, porém isso varia de acordo com a raça. Em pôneis o folículo pode ser responsivo a partir de 33mm e em raças maiores apenas quando atingem 40mm (WEBEL et al., 1977). Após a administração deste agente indutor, a ovulação é esperada para que ocorra em um período entre 36 e 48 horas (PALMER, 1993). Barbacini et al. (2000) concluíram que éguas com mais de 16 anos de idade demoram mais para ovular em resposta ao tratamento com hCG do que éguas mais novas. Beal et al. (2011) constataram que a maioria das éguas da raça Crioula ovulou em até 48 horas após a aplicação de hCG porém uma minoria, aproximadamente 10% das éguas, ovulou em até 24 horas.

A hCG é administrado intravenoso (IV) ou IM em dose única e pode variar de 1000 a 6000UI/animal (BERGFELT, 2000). Sieme et al. (2003) testaram a dose de 1500UI após detectar folículos de diâmetro ≥40mm e obtiveram ovulações em 97,5% das éguas em até 48 horas. A desvantagem da utilização da hCG é o fato de estimular a produção de anticorpos anti-hCG. Após sucessivas aplicações de hCG, estudos como o de McCue (2004) e Ginther et al. (2009) comprovaram a redução da sua eficácia. Diferentes resultados foram obtidos em 2011 por Jacob e colaboradores que constataram que doses baixas de hCG (1000UI) não alteraram a eficácia da droga quando utilizada durante quatro ciclos consecutivos. Beal et al. (2008) também obtiveram resultados satisfatórios utilizando 1000UI de hCG e detectaram ovulação em 92,3% (36/39) das éguas tratadas com esta dose.

O uso do hormônio liberador de gonadotrofinas ou GnRH como agente indutor de ovulação em éguas estimula a liberação hipotalâmica do LH e do FSH. Em éguas em anestro, o GnRH pode ser usado para estimular o crescimento folicular e em éguas cíclicas tem sido utilizado alternativamente à aplicação da hCG para desencadear a ovulação (MCKINNON, 2011). Os agonistas do GnRH utilizados para essa finalidade são: acetato de buserelina, acetato de deslorelina e acetato de fertirelina. Entretanto, o GnRH pode apresentar alguns efeitos adversos ocasionados pelo uso de múltiplos dispositivos, como afetar o crescimento folicular, aumentar o intervalo interovulatório e suprimir as concentrações séricas de LH e FSH por até 14 dias (FARIA & GRADELA, 2010).

Diferentes tipos de receptores para LH nas células da granulosa folicular de fêmeas bovinas já foram detectados; em equinos ainda não há estudos com estes relatos, porém, presume-se que a associação de hCG e análogos de GnRH proporcione benefícios quanto à

maturação folicular e qualidade oocitária. O uso da hCG e do acetato de deslorelina em conjunto induz e sincroniza a ovulação de maneira eficaz, porém Greco (2010) não observou efeito sinérgico entre estes indutores. Maio e colaboradores (2010) utilizaram doses de 750µg (G1) e 1000µg (G2) de deslorelina para induzir a ovulação e compararam com o hCG 2500UI (G3). Não houve diferença estatística entre os três tratamentos, sendo que 88,9% (32/36), 89,2% (33/37) e 88,6% (31/35) das fêmeas ovularam em até 48 horas, respectivamente.

Outros estudos (MCCUE et al., 2007; MAIO et al., 2010) compararam a utilização do hCG e do GnRH para indução da ovulação. McCue et al. (2007) verificaram que o percentual de éguas que ovularam dentro de 48 horas com o uso de um composto de deslorelina (1,5mg) e outro grupo com hCG (2500UI) foi de 36,8%, 90,1% e 88,3% para o controle, hCG e deslorelina, respectivamente. Maio et al. (2010) compararam duas doses diferentes de deslorelina (750µg; G1), (1000µg; G2) e hCG (2500UI; G3) e nos grupos experimentais as taxas de ovulação foram: 61,1% (22/36) no grupo controle com ovulações espontâneas, G1 88,9% (32/36), G2 89,2% (33/37) e G3 88,6% (31/35).

Na reprodução assistida em mulheres, a associação do GnRH com a hCG para indução da ovulação é utilizada rotineiramente e promove efeitos benéficos na fertilidade. Em humanos, a hCG é utilizado para que ocorra maturação dos oócitos (TEMPLETON et al., 1998). Sem o uso dos análogos do GnRH, ocorre a elevação precoce do LH em aproximadamente 20% dos casos e, como consequência, uma menor eficácia da terapia hormonal devido menor qualidade oocitária e menor produção de embriões. Portanto, para evitar os prejuízos da elevação precoce do LH, associa-se a hCG com o GnRH para melhorar a qualidade e produção dos oócitos e de embriões, e aumentar as chances de gravidez (TEMPLETON et al., 1998). Outro estudo mais recente de Kasum et al. (2016) analisou a combinação de GnRH com hCG em protocolos de fertilização in vitro (FIV). A combinação destes dois hormônios (GnRH e hCG) demonstrou taxas significativamente melhores de recém-nascidos vivos e um maior número de embriões de excelente qualidade e/ou embriões para serem criopreservados. Com base nesses resultados em humanos, este estudo utilizará a combinação de GnRH e hCG para indução da ovulação visando maximizar o efeito estimulatório da ovulação, concentrar as ovulações num menor intervalo horário e reduzir ao máximo a dose utilizada de hCG, minimizando a formação de anticorpos anti-hCG e reduzindo os custos do procedimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Criar e testar um protocolo de tratamento hormonal que visa sincronizar a onda de crescimento folicular e induzir a ovulação em tempo fixo, sem necessidade de detecção do cio ou de exames ultrassonográficos periódicos em éguas.

3.2. Objetivos específicos

- Testar se dispositivos intravaginais de 1,44g de progesterona suprimem o crescimento folicular.
- Determinar o número de dias ideal para manutenção intravaginal do dispositivo de progesterona.
- Determinar o momento (dia) ideal para a indução da ovulação com a utilização de GnRH e hCG após a retirada do dispositivo de progesterona e sem nenhum exame ultrassonográfico.

4. HIPÓTESE

- A sincronização do estro e indução da ovulação, com o uso de dispositivo intravaginal de 1,44g de P4 provoca a supressão do crescimento folicular e através da indução da ovulação, com hCG e GnRH, promove a ovulação em um período de 48 horas em no mínimo 75% dos animais tratados.

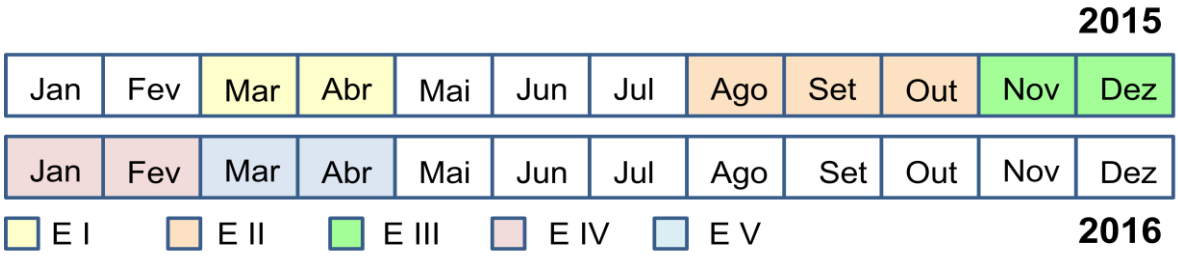
5. MATERIALE MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes para utilização de animais em experimentação do CONCEA e foi aprovado de acordo com as normativas da Comissão de Ética no uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (CEUA-FMVZ-USP). Protocolo nº 6739040215.

5.1. Animais e local

Este estudo foi realizado durante os meses de março de 2015 a março/abril de 2016 na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP, Campus Fernando Costa, em Pirassununga – SP, região Sudeste do Brasil, latitude 21.98/21°59'46' S e longitude 47.425/47°25'33'O. Foram utilizadas 20 éguas vazias provenientes do Laboratório de Teriogenologia Dr. O. J. Ginther, de 6 a 14 anos de idade esem raça definida. As éguas foram mantidas exclusivamente em regime de pastejo em capim Mombaça (*Panicum sp* var. Mombaça), com água e sal mineral *ad libitum*. As éguas receberam individualmente e diariamente suplementação concentrada proteica/energética de manutenção. O escore de condição corporal foi mantido entre 6 e 8, em uma escala de 1 a 9 (HENNEKE et al., 1983).

Os cinco experimentos (Experimento I – E I; Experimento II – E II; Experimento III – E III; Experimento IV- E IV; Experimento V – E V) foram realizados de acordo com o seguinte cronograma:



5.2. Coleta de dados

Neste estudo foram realizados cinco experimentos (I, II, III, IV e V). Em todos os experimentos foi realizado o monitoramento ultrassonográfico ovariano por via transretal (MyLab30 Esaote, Italy) a cada 24 horas para mapeamento da dinâmica do crescimento folicular com manutenção da identidade dos folículos. Os diâmetros dos três maiores folículos do ovário direito e esquerdo, o diâmetro do corpo lúteo (CL) quando presente e o edema

(ecotextura) uterino (escores de 1 a 4; GINTHER, 1992) foram anotados para as análises. O diâmetro do CL e dos folículos foram calculados automaticamente com o posicionamento do cursor do ultrassom perpendicularmente aos dois maiores diâmetros da estrutura em questão. O diâmetro médio era então calculado a partir desses dois valores.

Os dados foliculares coletados a campo foram plotados em gráficos individuais (software SigmaPlot 11.0) para observação da variação temporal do crescimento folicular, ou seja, para o estudo da dinâmica folicular (GINTHER, 1992). Algumas variáveis relacionadas à dinâmica folicular foram coletadas nestes gráficos, sendo elas listadas a seguir:

- Diâmetro do maior folículo no dia 0 (dia 0 = início do tratamento).
- Taxa de crescimento do maior folículo até o dia da retirada do dispositivo. Refere-se ao diâmetro do maior folículo no dia da retirada do dispositivo menos o diâmetro deste folículo no dia 0 dividido pelo número de dias com o dispositivo.
- Dia da ocorrência da divergência folicular. Dia da divergência folicular corresponde ao dia da dissociação da taxa de crescimento entre o maior folículo e seus subordinados, ou seja, o momento em que estes diminuíram sua taxa de crescimento enquanto o folículo maior continuou a crescer mantendo sua taxa de crescimento.
- Tamanho do maior folículo no dia da divergência folicular.
- Diâmetro do maior folículo no dia da divergência folicular.
- Dia em que o maior folículo atingiu 35mm de diâmetro (folículo pré-ovulatório; GINTHER, 1992).
- Ecotextura uterina no momento em que o maior folículo atingiu 35mm de diâmetro.
- Número de dias que o maior folículo levou para atingir 35mm de diâmetro após a retirada do dispositivo de P4.
- Número de dias que o folículo que atingiu 35mm levou até atingir o dia da ovulação.
- Dia da ocorrência da ovulação.
- Diâmetro do folículo pré-ovulatório um dia antes do dia da detecção da ovulação.

Com a coleta das variáveis acima descritas, as médias e seus respectivos desvios padrões (DP) foram calculados. Essas médias foram então utilizadas para comparações entre diferentes grupos nos experimentos II, III, IV e V.

5.3. Análise estatística

Análise de variância foi realizada para comparação das médias para detecção do efeito do tratamento. Teste T-student foi utilizado para a comparação das médias entre tratamentos. Comparações de proporções entre tratamentos foram realizadas pelo teste de Qui-quadrado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS. A probabilidade de significância de $P \leq 0,05$ foi utilizada para todas as análises.

5.4. EXPERIMENTO I – Sincronização da onda de crescimento folicular em éguas com status reprodutivo desconhecido durante o período de transição de outono

Este experimento foi realizado como um estudo preliminar com o objetivo avaliar a eficácia de um novo protocolo de terapia hormonal para a sincronização do estro em éguas cujo status reprodutivo era desconhecido e que estavam durante a fase reprodutiva de transição de outono.

Neste experimento foram realizados 21 tratamentos de sincronização do estro durante o período de 30 de março a 12 de abril de 2015. O protocolo de tratamento hormonal utilizado é apresentado na Figura 1. As éguas não foram examinadas previamente para determinação do status reprodutivo, ou seja, devido ao período do ano de realização deste estudo, três status poderiam estar ocorrendo, sendo eles: ciclicidade, transição de outono ou anestro estacional. No D0 (D0 = dia do início do tratamento hormonal) foram colocados dispositivos intravaginais contendo 1,44g de P4 (ProgestarLeite® Lote Piloto 1; Inovare Bioctenologia e Saúde Animal) que foram mantidos até o dia 8 (D8). No dia 7 (D7) e no dia 9 (D9) as éguas receberam 0,25 mg de PGF2α por via IM (Sincrocio®; Ouro Fino Saúde Animal). Todos os animais passaram pela coleta e análise de dados previamente descrita.

Figura 1. Desenho esquemático do protocolo de tratamento hormonal para sincronização do estro utilizado no experimento I. As éguas foram aleatoriamente selecionadas durante o período de transição de outono sem conhecimento prévio do status reprodutivo. D0 = dia do início do tratamento.

5.5. EXPERIMENTO II – Determinação do momento ideal de retirada do dispositivo de P4 em protocolos de sincronização do estro em éguas

O objetivo principal deste experimento foi determinar o momento ideal para retirada do implante de P4. No experimento anterior, o implante foi retirado no dia 8. Neste experimento, a eficiência de retirada do implante foi testada nos dias 7 e 9. Em bovinos, existem protocolos de sincronização que preconizam a retirada em diferentes dias após o início dos tratamentos, sendo os mais preconizados aqueles com retirada nos dias 7, 8 e 9 (MOREIRA et al, 2000; PFEIFER et al., 2005; RAMOS, 2006).

Neste experimento, 16 éguas cíclicas foram acompanhadas diariamente por ultrassonografia transretal para monitoramento da dinâmica ovariana. Após a detecção da ovulação (ovulação = dia 0 do ciclo estral), as éguas foram aleatoriamente distribuídas em dois diferentes grupos de tratamento hormonal quando no dia 10 do ciclo estral. Todas as éguas passaram por ambos os tratamentos (exceto um animal que foi retirado da coleta de dados para tratamento de ferimento). No D0 (início do tratamento hormonal), todos os animais receberam 0,25mg de PGF2α por via IM e um dispositivo de progesterona intravaginal (1,44g; ProgestarLeite® Lote Piloto 1; Inovare Bioctenologia e Saúde Animal).Em ambos os grupos foram administradas duas doses adicionais de 0,25 mg PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal) no dia anterior e posterior à retirada do dispositivo de progesterona. No grupo 1, o dispositivo intravaginal de progesterona foi retirado no D7 após inserção do implante intravaginal de P4 e no grupo 2, no D9. O desenho esquemático dos protocolos utilizados são mostrados nas figuras 2. No G1 e G2, 16 e 15 animais,

respectivamente, passaram pela coleta e análise de dados previamente descrita, totalizando 31 tratamentos.

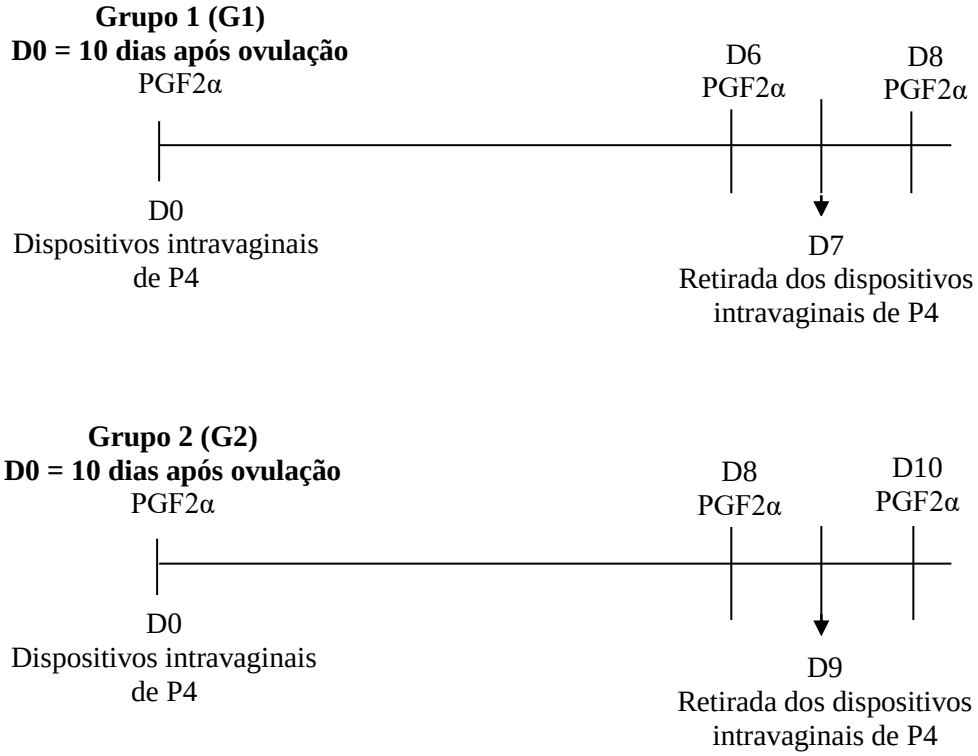


Figura 2. Desenho esquemático dos protocolos de tratamento hormonal para sincronização do estro utilizado nos grupos de tratamento do experimento II (GI e G2). As éguas foram aleatoriamente selecionadas após a detecção da ovulação (ovulação = dia 0 do ciclo estral); no dia 10 do ciclo estral foi iniciado o tratamento (D0) do tratamento = D10 do ciclo estral = dia do início do tratamento). No G1 a inserção do dispositivo de progesterona permaneceu até o D7 do protocolo de tratamento hormonal e no G2 até o D9.

5.6.EXPERIMENTO III – Eficiência do protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e sua dependência da fase do ciclo estral com definição do melhor momento para a indução da ovulação

Com base no experimento anterior, o dia 7 após o início do tratamento hormonal foi definido como o dia mais apropriado para a retirada do implante de progesterona em éguas submetidas ao protocolo de sincronização do crescimento folicular proposto nesta dissertação. O objetivo deste novo experimento foi testar se a resposta dos animais ao tratamento hormonal é dependente da fase do ciclo estral em que o tratamento foi iniciado e definir o melhor momento (dia) para os futuros experimentos com indução da ovulação.

Quatorze (14) éguas cíclicas foram aleatoriamente submetidas aos três protocolos experimentais diferentes, formando os grupos G1, G2 e G3. O grupo 2 (G2) deste experimento corresponde exatamente ao grupo 1 do experimento II, pois as éguas já haviam sido submetidas à mesma terapia hormonal aqui proposta. O início do protocolo (D0) correspondeu ao D10 do ciclo estral com a retirada do implante de P4 no D7. Os outros dois grupos (G1 e G3) tiveram o dia do início dos tratamentos nos dias 5 e 15 após ovulação (ovulação = dia 0 do ciclo estral; D0 = D5 ou D15 do ciclo estral = início do tratamento).

Em resumo, as éguas foram previamente monitoradas por ultrassonografia transretal para detecção do dia da ovulação. Nos dias 5, 10 ou 15 após a ovulação, os tratamentos hormonais foram iniciados conforme o desenho esquemático apresentado na Figura 3. No D0 do tratamento hormonal, 0,25 mg de PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal) foram administrados por via IM e o dispositivo de intravaginal de P4 inserido (ProgestarLeite® Lote Piloto 1; Inovare Bioctenologia e Saúde Animal). Duas doses de 0,25 mg de PGF2α por via IM foram administradas no dia anterior e um dia após a retirada do dispositivo de P4 que se deu no D7. Todos os animais passaram pela coleta e análise de dados previamente descrita.

G1, G2 e G3 - início do tratamento nos dias 5, 10 e 15 do ciclo estral

Figura 3. Desenho esquemático do protocolo de tratamento hormonal para sincronização do estro do experimento III. As éguas foram aleatoriamente selecionadas após a detecção da ovulação (ovulação = dia 0 do ciclo estral); nos dias 5, 10 e 15 do ciclo estral o tratamento hormonal foi iniciado (D0 = dias 5, 10 ou D15do ciclo estral = dia do início do tratamento).

5.7.EXPERIMENTO IV – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em diferentes fases do ciclo estral

Neste experimento, 15 éguas cíclicas foram aleatoriamente submetidas ao mesmo protocolo de tratamento hormonal para a sincronização do estro e indução da ovulação apresentado na Figura 4. O momento em que estavam durante o ciclo estral não foi determinado

previamente ao início do experimento. Este experimento objetivou simular uma situação de aplicação do protocolo de sincronização e indução da ovulação à campo, em lote de éguas onde o acompanhamento da dinâmica folicular não está sendo realizado, sendo o período das mesmas durante o ciclo estral desconhecido.Vale ressaltar que as éguas utilizadas neste experimento eram previamente monitoradas por ultrassonografia para detecção da ovulação (procedimento de rotina do laboratório), fato que permitiu precisar o dia do ciclo estral em que cada uma delas estava. No entanto, este dado não foi utilizado para determinar o início do tratamento hormonal neste experimento, mas foi útil como controle para informar a distribuição dos animais nos diversos dias do ciclo estral em que entraram em tratamento. Este dado se faz necessário para justificar o pequeno número de animais utilizado em um experimento deste tipo.

No D0, 0,25 mg de PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal) foram administrados por via IM e o implante de P4 intravaginal colocado (ProgestarLeite® Lote Piloto 1; Inovare Bioctenologia e Saúde Animal). Duas doses de 0,25 mg de PGF2α por via IM foram administradas no dia anterior e um dia após a retirada do dispositivo de P4 que se deu no dia 7. No D10, a ovulação foi induzida com a combinação de 1mL de hCG por via IM (1000UI Chorulon®, MSD Agroline) e 3mL de GnRH por via IM (750 µG Sincrorrelin®, OuroFino) em todas as éguas que apresentaram folículo pré-ovulatório com diâmetro ≥35 mm e útero com ecotextura ≥3 (GINTHER, 1992). No D12, foi realizada uma segunda indução da ovulação com 1mL de hCG por via IM (1000UI Chorulon®, MSD Agroline) e 3mL de GnRH por via IM (750µG Sincrorrelin®, OuroFino) nas fêmeas que não tinham apresentado os critérios acima descritos para características ovarianas e uterinas adequadas para a indução realizada no D10. Esta estratégia de dois dias alternativos para a indução da ovulação objetivou maximizar a eficiência do protocolo utilizado. A partir da indução da ovulação, os monitoramentos ultrassonográficos para a detecção da ovulação foram realizados a cada 6 horas de modo que o intervalo aproximado em horas entre o momento da indução e ovulação fosse determinado. A eficiência do protocolo utilizado foi avaliada de acordo com o número percentual de animais que responderam ao tratamento e ao o grau de sincronização de ovulação.

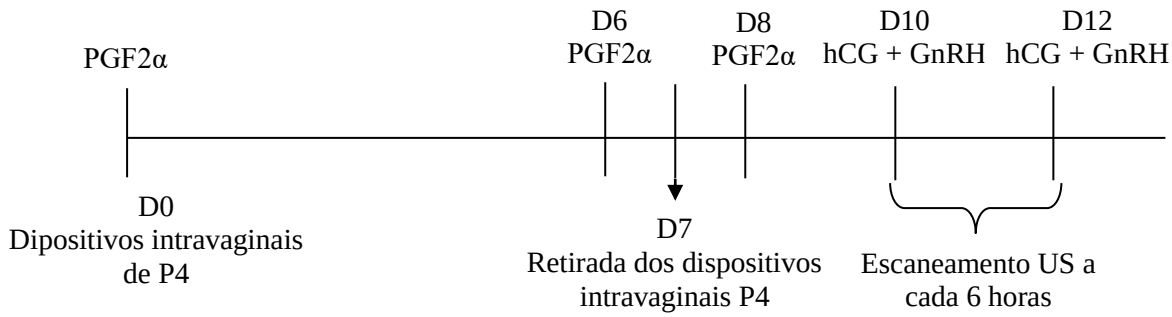


Figura 4.Desenho esquemático do protocolo de tratamento hormonal para sincronização do estro do experimento IV. As éguas foram aleatoriamente distribuídas e estavam em diferentes dias do ciclo estral no início do tratamento (D0 = início do tratamento) US = ultrassonografia, OV = ovulação.

5.8.EXPERIMENTO V – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em éguas com status reprodutivo conhecido

Este experimento teve como objetivo avaliar a eficácia do protocolo de sincronização estabelecido nos experimentos anteriores e verificar se sua eficiência é dependente da fase do ciclo estral em que os animais iniciaram o protocolo de tratamento hormonal. O protocolo experimental foi exatamente o mesmo utilizado no experimento III. No entanto, a indução da ovulação e a coleta de dados foram realizados exatamente como descritos no experimento IV. O desenho esquemático do protocolo hormonal utilizado pode ser visualizado na figura 5.

Quatorze (14) éguas cíclicas foram aleatoriamente submetidas aos três protocolos experimentais, formando os grupos G1, G2 e G3. O dia de início dos tratamentos corresponderam aos dias 5, 10 e 15 do ciclo estral (ovulação = dia 0 do ciclo estral; D0 = D5, D10 ou D15 do ciclo estral = início do tratamento).

Grupos 1, 2 e 3 - início do tratamento nos dias 5, 10 e 15 do ciclo estral

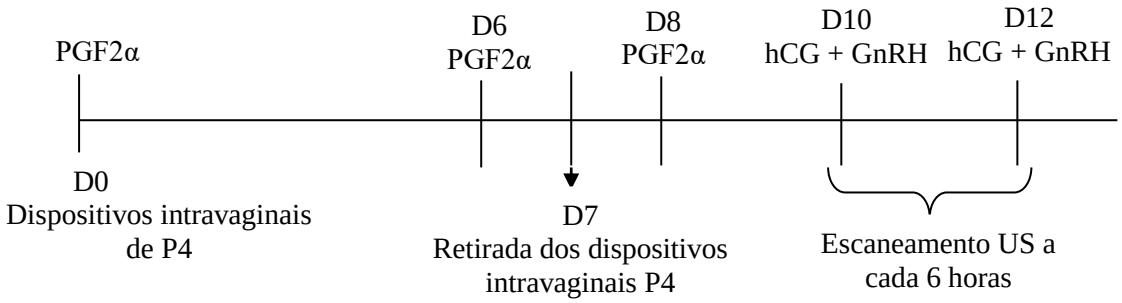


Figura 5. Desenho esquemático do protocolo de tratamento hormonal para sincronização do estro do experimento V. As éguas foram aleatoriamente distribuídas e foram selecionadas após a detecção da ovulação (ovulação = dia 0 do ciclo estral); (D0 = dias 5, 10 ou 15 do ciclo estral = início do tratamento). US = ultrassonografia, OV = ovulação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2. Experimento I - Sincronização da onda de crescimento folicular em éguas com status reprodutivo desconhecido durante o período de transição de outono

Neste experimento foram realizados 21 tratamentos de sincronização do estro em éguas com status reprodutivo desconhecido durante o período de transição de outono, sendo demonstrado que o protocolo utilizado não foi satisfatório quanto à eficiência de sincronização, de acordo com a hipótese principal deste trabalho. O protocolo utilizado não foi satisfatório quanto à supressão do crescimento folicular pelo efeito do DIP. A eficácia da supressão do crescimento folicular ocorreu em apenas 41,7% das éguas cíclicas no período de transição de outono.

Em nove tratamentos (43%, 9/21) não foi observado crescimento folicular durante todo o período experimental e o padrão de crescimento da população folicular ovariana era característico de éguas em transição estacional, com predominância de pequenos folículos em ambos os ovários e não ocorrência da ovulação (BLANCHARD et al., 1998). Nestes nove tratamentos, mesmo após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, não houve o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular, o que indica que o crescimento folicular ovariano provavelmente estava inibido pelo efeito da sazonalidade e não pelo efeito da ação da progesterona. Éguas em anestro sazonal que possuem ovários pequenos e inativos não respondem adequadamente aos protocolos de sincronização do estro para restabelecimento da atividade ovariana (WEBEL e SQUIRES, 1982; MCKINNON, 2009), fato que pode ter ocorrido nestes nove (9/21) tratamentos. Este fato justifica a importância do conhecimento prévio da atividade ovariana (tamanho dos folículos) para o início do tratamento hormonal. O anestro sazonal ocorre devido ao aumento da produção de melatonina, que é o hormônio regulador da sazonalidade reprodutiva em equinos. A melatonina é um importante inibidor da atividade hipotalâmica para a produção de GnRH e sua produção é aumentada na pineal durante os períodos longos de escuro que se inicia na transição de outono atingindo o máximo de sua produção durante o inverno (GINTHER, 1990; SHARP, 2011).

Em doze tratamentos (12/21) foi observado crescimento e a ovulação do folículo dominante. Em sete desses tratamentos (58,3%, 7/12), as éguas apresentaram o folículo dominante até o D6 (D0 = início do tratamento) e em cinco tratamentos (41,7%, 5/12) as éguas apresentaram o folículo dominante até o D12 (Figura 6). O dispositivo intravaginal de

P4 foi retirado em todos os animais no D8. Em sete tratamentos (58,3%, 7/12) foi verificada a presença de um folículo dominante antes da retirada do implante, de forma diferente ao efeito esperado que seria uma inibição ou retardo do crescimento folicular pela presença da P4 e aquisição de dominância folicular somente após a retirada do implante de P4. Os folículos ovarianos crescem a uma taxa diária similar até a dominância folicular. Em seguida, as taxas de crescimento começam a diferir entre os dois maiores folículos de modo que o maior folículo se torna dominante e continua a crescer, enquanto que os menores (chamados subordinados) diminuem sua taxa de crescimento (GASTAL et al., 1997). Tem sido descrito que o folículo que primeiro atingir 20 mm de diâmetro é aquele que se torna dominante em 93% das ondas foliculares eo futuro folículo dominante emerge em média um dia mais cedo do que o futuro maior folículo subordinado (GINTHER, 2000).

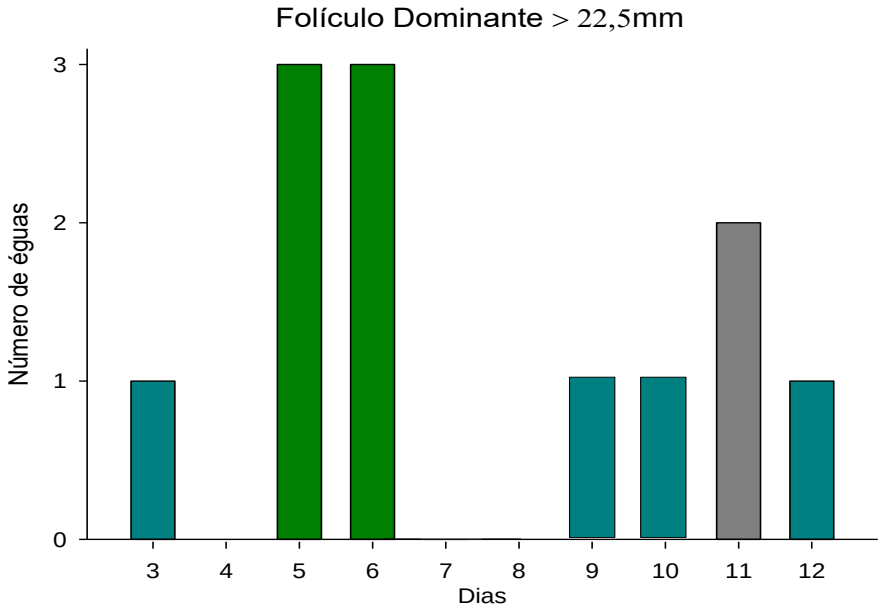


Figura 6. Distribuição do número de éguas pelos dias após o início do tratamento (D0 = início do tratamento) quando apresentaram dominância folicular (folículo dominante = maior folículo com diâmetro>22,5 mm).

Em relação ao intervalo em dias do início do tratamento até a primeira detecção do folículo pré-ovulatório (folículo >35mm), nove éguas (75%; 9/12) apresentaram um folículo pré-ovulatório até o dia 10 do tratamento (Figura 7). A constatação de que 75% dos animais submetidos ao protocolo teriam folículos pré-ovulatórios até o D10 foi um dado importante para continuidade dos próximos experimentos. Analisando os dados deste experimento, pode ser inferido que o D10 seria o dia mais adequado para as futuras induções das ovulações porque a maioria dos animais apresentaram folículos pré-ovulatórios (>35mm), estes folículos

são responsivos aos agentes indutores da ovulação (SAMPER, 2008) e um atraso em dias para a indução da ovulação poderia acarretar na perda de alguns animais pela ocorrência de ovulações naturais, ou seja, antes mesmo da indução hormonal exógena.

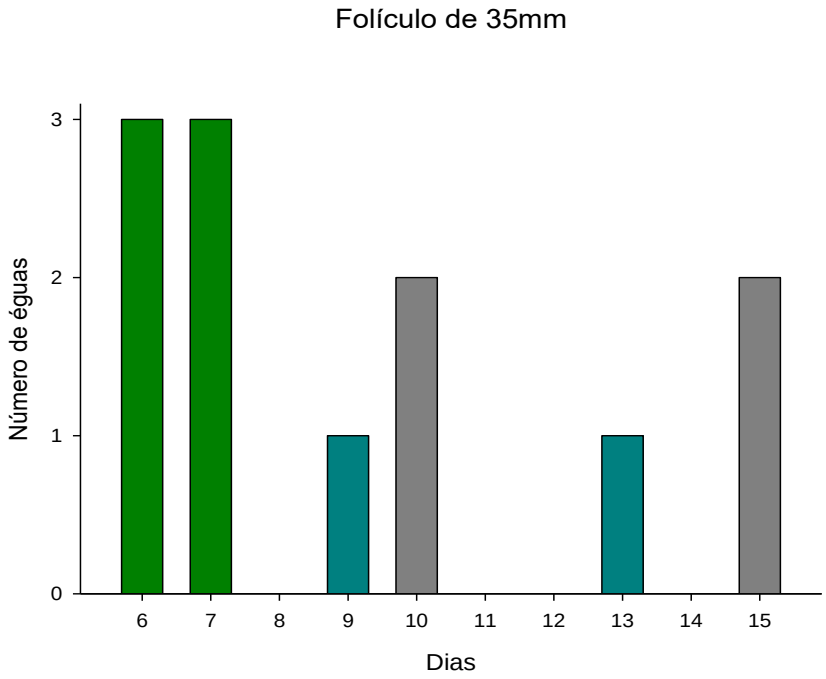


Figura 7. Distribuição do número de éguas pelos dias após o início do tratamento (D0 = início do tratamento) quando apresentaram folículos com tamanho ≥35mm (folículos pré-ovulatórios).

Este experimento também foi utilizado para verificar se o retorno precoce à ciclicidade na estação reprodutiva de transição de outono poderia ser estimulado pelo tratamento hormonal realizado. Alguns estudos (ALLEN et al.,1980; WEBEL & SQUIRES, 1982) demonstraram que, com o uso de altrenogest, foi possível antecipar o início da estação reprodutiva em éguas, demonstrando que esta droga pode ser utilizada no período transicional de primavera quando se almeja sincronizar a primeira ovulação do ano. Entretanto, o efeito da melatonina na modulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante o período de transição de outono pode apresentar diferenças em relação ao período de transição de primavera (SHARP, 2011). A aplicação do protocolo hormonal proposto neste estudo nas éguas que se apresentavam acíclicas não surtiu o efeito esperado porque estes animais provavelmente já estavam sob influência da melatonina que provoca a inibição da atividade hipotalâmica e consequentemente suprime a produção de GnRH. A duração do fotoperíodo modula a atividade reprodutiva pela regulação da secreção de GnRH. A influência dos dias mais curtos nas éguas também pode ter interferido na eficácia do protocolo. Em dias curtos a produção de melatonina suprime a liberação do GnRH, portanto, não ocorre a ovulação

(BLANCHARD et al., 1998). A diferença entre os resultados obtidos neste experimento durante a transição de outono em relação aos achados de literatura para o período de transição de primavera pode ser explicada pela interferência do efeito da melatonina, que na transição de outono está em fase ascendente de produção (GINTHER, 1990). A produção de melatonina aumenta no inverno devido à diminuição do período de luz. No período de transição de primavera, ocorre diminuição dos níveis de produção de melatonina porque os dias são mais longos e, inversamente a produção de GnRH aumenta possibilitando o desenvolvimento folicular nos ovários (SHARP, 2011).

Diferente da espécie equina, as fêmeas bovinas não apresentam sazonalidade reprodutiva e o sucesso da sincronização do estro é baseada em dois eventos: a presença de um corpo lúteo maduro e responsivo à aplicação de PGF2α em fêmeas bovinas cíclicas ou, em fêmeas em anestro, a queda dos níveis endógenos de progesterona e a emergência de uma nova onda folicular de forma sincrônica após a utilização do dispositivo intravaginal de P4 que mimetiza a ação da presença de CL no diestro (MOREIRA et al., 2000).

Durante o período de transição de primavera, Carmo et al. (2009) utilizaram dispositivos intravaginais de P4 para estimulação da ciclicidade em éguas e a eficiência de ovulação após 12 dias da retirada do implante foi de 60%, sendo observado apenas 20% de éguas ovuladas no grupo não-tratado. Além disso, tem sido sugerido que na fase transicional a progesterona tenha um papel foliculogênico. Quando o dispositivo é removido, as éguas rapidamente entram no estro e ovulam entre 4 a 8 dias (SAMPER et al., 2007). Entretanto, no período de anestro sazonal, Handler et al. (2006) não conseguiram estimular o reestabelecimento da atividade ovariana utilizando implantes de progesterona (PRID®) por 11 dias. Schutzer (2012) também não obteve um efeito significativo de estimulação da atividade ovariana em éguas em anestro com o uso exclusivo do implante de progesterona, contudo, foi observado aumento numérico na porcentagem de éguas que ovularam até 60 dias (47% tratadas *vs* 13% não tratadas) e no número médio de dias até a primeira ovulação (87 dias *vs* 115 dias, grupos tratado e não-tratado, respectivamente). Nagy et al. (2000) testaram uma combinação de progesterona associada ao 17β-estradiol e esta associação também não foi capaz de promover ovulação em éguas em anestro; mas observaram que os melhores resultados foram obtidos com o uso da progesterona isolada.

Em 41,7% (5/12) dos animais cíclicos, o protocolo de tratamento hormonal utilizado neste estudo demonstrou ser eficaz para retardar o crescimento da onda folicular porque, com a utilização da progesterona exógena, foi possível mimetizar o efeito de um corpo lúteo ativo

como ocorre em animais em diestro. A retirada do dispositivo de P4 mimetiza a luteólise e a partir deste momento os folículos crescem mais rapidamente (MOREIRA et al., 2000).

As éguas utilizadas neste estudo foram monitoradas por ultrassonografia para a detecção da ovulação conforme previamente descrito. As ovulações ocorreram esparsamente entre os dias 9 e 20 (Figura 8). Analisando esse achado, pode ser verificado que sete éguas ovularam até o D13 (58,3%; 7/12). Esta informação é importante para a decisão sobre o melhor dia para a indução hormonal da ovulação minimizando a ocorrência de ovulações espontâneas previamente às induções. Pode ser observado na figura 8 que até o dia 10 apenas uma égua tinha ovulado espontaneamente e pela figura 7 que a maioria das éguas apresentavam folículo pré-ovulatório até este dia. Estas duas observações reforçam a escolha do dia 10 como dia ideal para que as ovulações sejam induzidas quando da utilização do protocolo de sincronização proposto. Se a indução da ovulação fosse realizada no D10, até 75% de eficácia seria obtida com a utilização deste protocolo de sincronização.

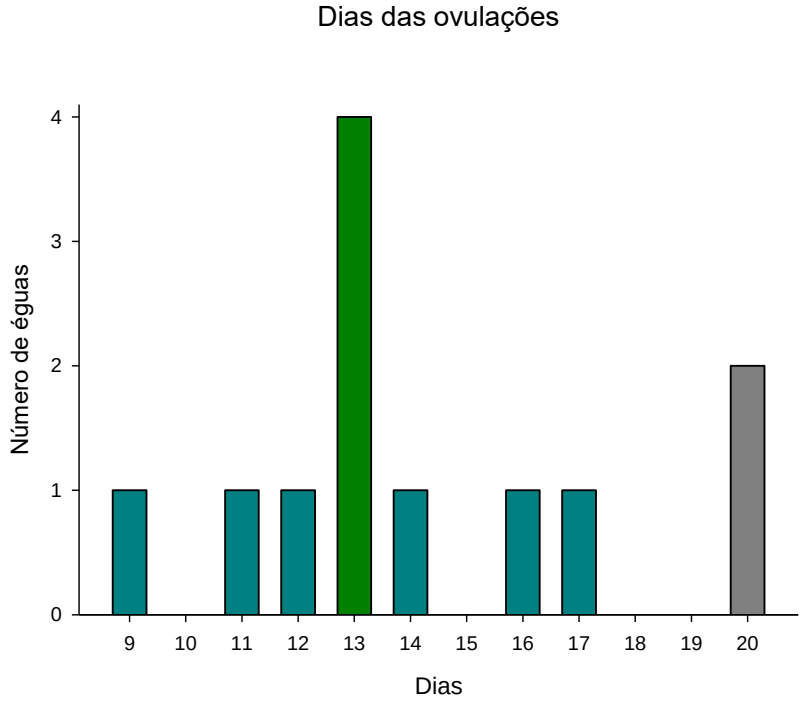


Figura 8. Distribuição do número de éguas pelos dias após o início do tratamento (D0 = início do tratamento) quando ocorreram as ovulações.

6.3. Experimento II - Determinação do momento ideal de retirada do dispositivo de P4 em protocolos de sincronização do estro em éguas

Este experimento foi realizado durante a estação reprodutiva para determinação do momento ideal da retirada do dispositivo de P4 e todos os animais utilizados estavam ciclando. A retirada do dispositivo de P4 foi realizada no D7 no grupo 1 (G1) porque foi observado no experimento I, em éguas durante o período de transição de outono, que o efeito do dispositivo de P4 provocou o retardo no crescimento folicular em 41,7% (5/12) dos tratamentos até o D6. No grupo 2 (G2), os dispositivos de P4 permaneceram até o D9. Os dias 7 ou 9 foram escolhidos para a retirada dos dispositivos de P4 com base nas descrições na literatura de protocolos hormonais para sincronização do estro em bovinos onde os dispositivos de P4 são inseridos no início do tratamento e permanecem durante sete, oito ou nove dias (RAMOS, 2006; PFEIFER et al., 2005). Tem sido descrito que o uso de dispositivos de P4 pode aumentar o número de folículos aspirados e oócitos recuperados, bem como a taxa de produção embrionária, além de sugerirem que a progesterona pode desempenhar função importante no desenvolvimento folicular e maturação final do oócito (RAMOS, 2006; PFEIFER et al., 2005). Em éguas, tem sido descrito que alguns dos dispositivos intravaginais comerciais e um sintético ativo oral da progesterona fazem com que éguas tratadas apresentem supressão do crescimento folicular e regressão do folículo dominante, mas em resposta a queda do nível de progesterona com a retirada do dispositivo ou cessamento do fornecimento oral, um novo folículo se desenvolve após 10 dias de tratamento e atinge 35 mm. Em consequência, as ovulações ocorrem de 9 a 12 dias após a retirada da fonte de progesterona (SAMPER et al., 2007).

Neste experimento, em ambos os grupos (G1 e G2), o implante de P4 foi capaz de promover supressão do crescimento folicular em todos os animais que possuíam folículos menores do que 27mm de diâmetro no momento da colocação do implante de P4, porém não provocou a regressão do folículo dominante como observado por Samper et al. (2007). A figura 9 exemplifica de forma gráfica a dinâmica folicular de dois animais submetidos ao protocolo hormonal descrito; além disso, pode-se observar o dia em que ocorreu a divergência folicular, o dia em que o maior folículo atingiu 35mm de diâmetro e o momento da ovulação. Outro dado bastante relevante deste estudo foi a observação da taxa de supressão do crescimento folicular que atingiu 90% (28/31) dos tratamentos realizados.

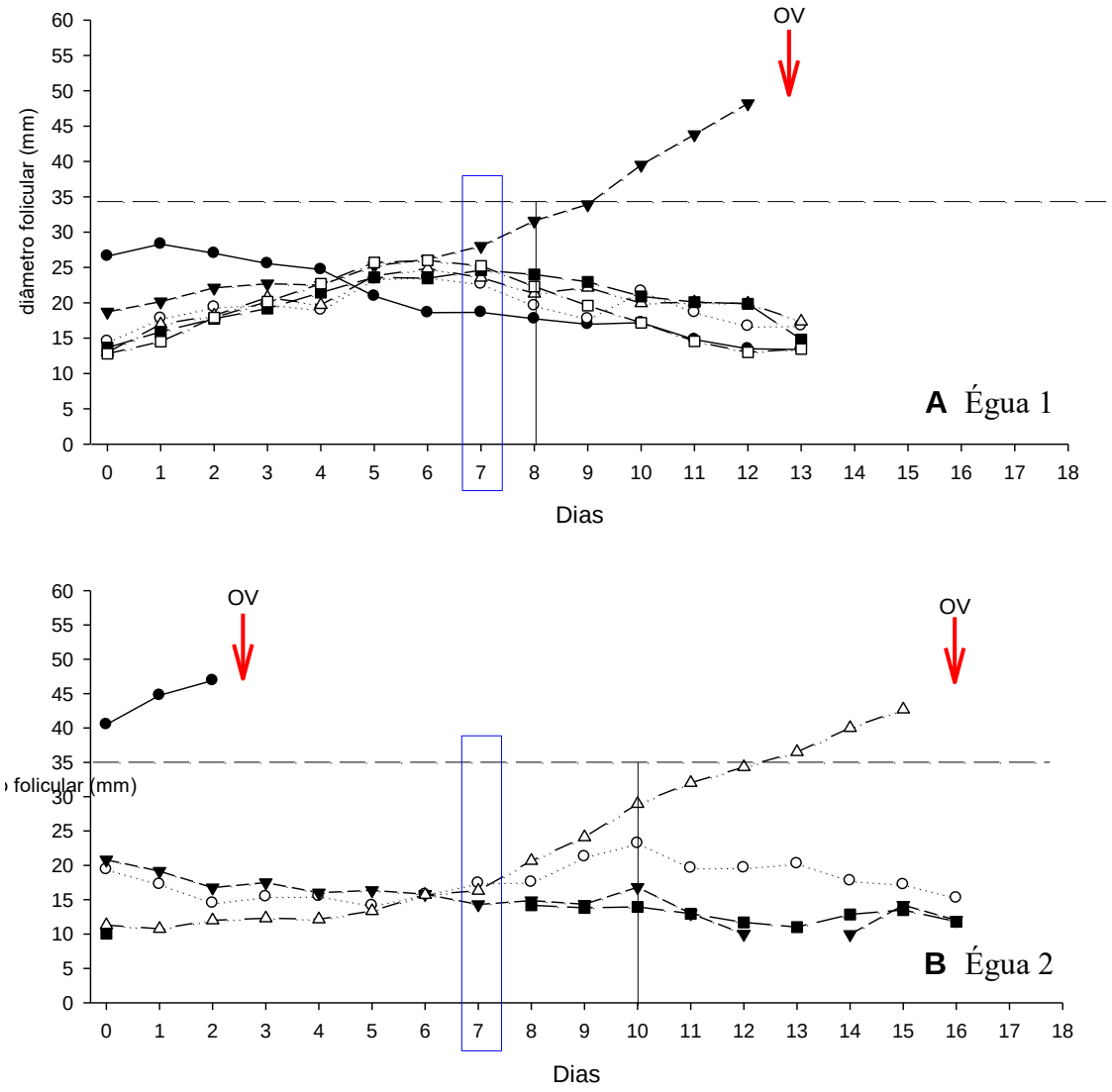


Figura 9. Representação gráfica do acompanhamento ultrassonográfico da dinâmica folicular de duas éguas utilizadas no experimento II. Os diâmetros dos três maiores folículos de cada ovário foram mensurados diariamente. A supressão do crescimento folicular com o uso do DIP pode ser visualizada em ambos os gráficos. Pode ser notado que esse efeito supressório ocorreu em ambos os animais até o D7. O DIP foi retirado nos dias 7 (gráfico A e no gráfico B). (A) Égua 1 - todos os folículos apresentavam tamanho menor do que 27 mm no D0 e ocorreu supressão do crescimento dos folículos. (B) Égua 2 - no D0 (D0= dia do início do tratamento) um folículo apresentava-se maior do que 27 mm. Neste animal o DIP não provocou supressão do crescimento deste folículo e ocorreu ovulação do mesmo durante o tratamento com a P4 exógena.

Outro critério utilizado neste experimento para se definir o momento ideal para retirada do DIP foi a avaliação da diferença na taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório. Tem sido descrito que o crescimento médio diário de um folículo de uma égua seja equivalente a 3 mm/dia (GINTHER, 1992). Neste estudo, o tratamento com a progesterona provocou uma desaceleração no crescimento dos folículos até o D7 e a partir deste momento, a P4 já não atuou como esperado porque os folículos cresceram mais rapidamente mesmo com a manutenção do implante. Após o D7, nos animais que ainda mantiveram o implante de P4 (G2), os folículos apresentaram crescimento acelerado e superior aos 3mm/dia (Tabela 1), ou seja, acima da média citada por Ginther (1992). As diferenças entre as taxas de crescimento do maior folículo nos períodos anteriores e posteriores à retirada do DIP em ambos os grupos, G1 e no G2, foram iguais a 1,02mm/dia (P>0,05; Tabela 1).

Tabela 1 - Médias ± DP (mm) da taxa de crescimento folicular durante a manutenção do implante de P4 em G1 (oito dias; D0-D7) e G2 (10 dias; D0-D9) e da retirada do implante de P4 no dia 7 (G1) ou dia 9 (G2) até o dia anterior à ovulação (OV-1) e média das diferenças individuais das taxas de crescimento folicular entre os dois períodos estudados. (B – A) e (D – C) representam as diferenças entre as taxas de crescimento do maior folículo em G1 e G2, respectivamente.

	G1			G2		
	D0 ao D7 (n=16; A)	D7 até OV-1 (n=15; B)	B – A	D0 ao D9 (n=15; C)	D9 até OV-1 (n=13; D)	D – C
Média	1,28	2,29	1,02	1,39	2,36	1,02
DP	0,61	0,42	0,79	0,58	0,43	0,83

A figura 10 exemplifica a dinâmica de crescimento folicular no mesmo animal em diferentes tratamentos nos quais o implante de P4 foi mantido respectivamente até os dias 7 e 9.

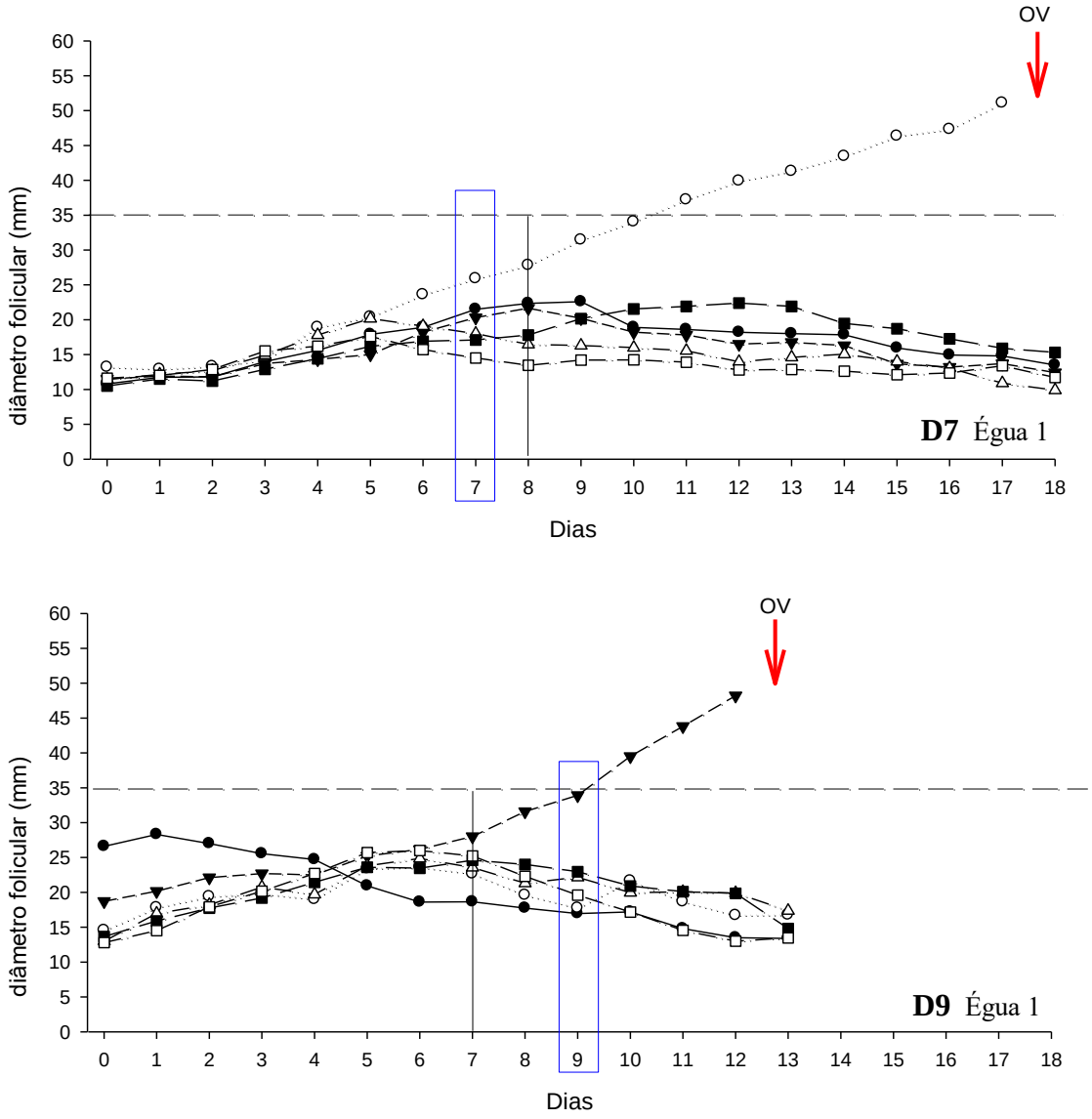


Figura 10. Representação gráfica do acompanhamento ultrassonográfico da dinâmica folicular de uma mesma égua utilizada no experimento II, sendo o DIP retirado nos dias 7 e 9 do tratamento. Os diâmetros dos três maiores folículos de cada ovário foram mensurados diariamente. (D7) Todos os folículos apresentavam menor do que 27 mm no D0. O DIP mantido do D0 ao D7 suprimiu o crescimento folicular até o momento da sua retirada (D7= dia da retirada). (D9)No D0 (D0= início do tratamento) um folículo apresentava-se maior do que 27 mm. O DIP não provocou supressão do crescimento deste folículo e ocorreu a ovulação durante o tratamento com a P4. O DIP mantido do D0 ao D9 não suprimiu o crescimento folicular após o D7. O folículo pré-ovulatório acelerou seu crescimento (mm/dia) entre os dias D7 ao D9 mesmo com o DIP sendo mantido. O retângulo azul indica a retirada dos implantes de P4. O dia em que ocorreu a divergência folicular é indicado pela linha cheia vertical. O diâmetro folicular de 35 mm está indicado pela linha tracejada horizontal. A flecha vermelha indica o dia da ovulação.

Mesmo que as diferenças nas taxas de crescimento do folículo maior no G1 e no G2 tenham sido as mesmas, houve uma grande variação individual entre os animais tratados (Tabela 2). Esta análise, considerando a variação individual, sustentou a decisão para que o D7 fosse escolhido como momento ideal para retirada do implante de P4.

Durante o recrutamento folicular, ocorre o crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela fase de seleção, na qual um ou alguns folículos mantém o padrão de crescimento, em detrimento dos demais que começam um processo de regressão ou atresia (DRIANCOURT, 2001). Nas éguas, o folículo que continua a crescer é considerado dominante (fase de dominância) e, em nossa hipótese inicial, a progesterona promoveria atresia deste folículo dominante e daria início a nova onda de crescimento folicular. No entanto, os achados deste estudo indicam que o DIP age desacelerando o crescimento dos folículos. A resposta do animal ao DIP difere individualmente, como pode ser observado na tabela 2. O crescimento folicular em resposta à P4 exógena praticamente cessa em algumas éguas, sendo a diferença na taxa de crescimento folicular antes e após a retirada do DIP consideravelmente maior quando comparada à taxa observada em éguas onde o DIP apresentou apenas um sutil retardo no crescimento dos folículos (achado exemplificado com três animais na Tabela 2). No entanto, um grupo controle sem a utilização do DIP poderia contribuir com os achados encontrados afim de verificar como seria a dinâmica folicular sem o efeito da progesterona.

Tabela 2 - Médias (mm) individuais de três animais da taxa de crescimento folicular durante a manutenção do implante de P4 em G1 (oito dias; D0-D7) e G2 (10 dias; D0-D9) e da retirada do implante de P4 no dia 7 (G1) ou dia 9 (G2) até o dia anterior à ovulação (OV-1) e diferença entre as taxas de crescimento folicular entre os dois períodos estudados. Uma grande variação individual é observada entre as diferenças das taxas de crescimento folicular.

	G1			G2		
	D0 ao D7 (A)	D7 até OV-1 (B)	B – A	D0 ao D9 (C)	D9 até OV-1 (D)	D-C
Égua 1	1.97	2,23	0,26	1,91	2,27	0,36
Égua 2	1,58	2,1	0,52	1,52	2.86	1,34
Égua 3	0,17	1,88	1,71	0,5	2,54	2,04

A tabela 3 mostra os valores referentes ao momento em que os maiores folículos do G1 e do G2 atingiram diâmetro ≥ 35 mm. Além da diferença na taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório, outro critério relevante para a definição da data de remoção do DIP foi a análise do momento em que os maiores folículos atingiram o diâmetro ≥ 35 mm. A queda nos níveis circulantes de progesterona após a remoção dos dispositivos é importante para ativação do centro hipotalâmico liberador de GnRH, que pelo aumento da concentração de estradiol e redução na progesterona, aumenta a frequência dos pulsos de liberação de LH, levando a um pico pré-ovulatório que desencadeia o processo da ovulação (GINTHER et al., 2001).

Tabela 3 - Percentual de animais nos dois grupos de tratamento hormonal em que o folículo maior atingiu o diâmetro ≥35mm em até 10 dias ou após 10 dias a partir do dia de início do protocolo e da inserção do implante de P4 (D0= dia de inserção implante de P4). G1 = retirada do implante de P4 no dia 7 e G2 = retirada do implante de P4 no dia 9.

Folículo ≥35mm	G1	G2
Até D10	63% (10/16)	46% (7/15)
Após D10	37% (6/16)	54% (8/15)

No G1 e no G2, os diâmetros médios dos maiores folículos no D0 (D0 = dia do início do tratamento) foram 32,8 e 31,6 mm, respectivamente, e não ocorreu ovulação em 90% (28/31) dos tratamentos enquanto os dispositivos intravaginais de P4 foram mantidos. As três éguas (3/31 = 10%) que apresentavam folículos maiores do que 32,2 mm ovularam antes da retirada do DIP, o que demonstra que nesses casos a concentração de P4 do dispositivo não foi suficiente para inibir o crescimento folicular e a ovulação. Foi observado que os folículos pré-ovulatórios não entraram em atresia e mantiveram sua dominância mesmo com o DIP e o efeito do progestágeno foi de retardo da taxa de crescimento folicular. Dessa forma, a definição do momento para a retirada do DIP levou em consideração os seguintes fatores: supressão do crescimento folicular, diferença na taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório e o momento em que os folículos atingiram o diâmetro ≥ 35 mm. A informação sobre o momento em que os folículos atingiram diâmetro ≥ 35 mm também foi importante para os experimentos seguintes, pois foi utilizada para se determinar as datas das induções das ovulações. Com os resultados apresentados neste experimento, o D7 foi identificado como o dia ideal para a retirada do DIP no protocolo hormonal proposto.

6.4. Experimento III – Eficiência do protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e sua dependência da fase do ciclo estral com definição do melhor momento para a indução da ovulação

Neste experimento, foi verificado que a resposta dos animais ao tratamento de sincronização não é dependente da fase do ciclo estral em que o tratamento é iniciado. O tratamento hormonal utilizado foi o mesmo para os três grupos experimentais com apenas a diferença no dia de início do protocolo (D0) que correspondeu aos dias 5, 10 e 15 do ciclo estral, respectivamente para os grupos G1, G2 e G3.O grupo G2 foi formado com as éguas estudadas no grupo 1 do experimento II, sendo os dados daquele experimento utilizados neste experimento para as comparações com os grupos G1 e G3.

A importância de testar a eficiência do protocolo de sincronização com início em diferentes fases do ciclo estral se justifica porque, nestes dias escolhidos (5, 10 e 15), o microambiente ovariano (população folicular e a presença e funcionalidade do CL) pode ser muito distinto (GINTHER, 1992) e a progesterona do dispositivo intravaginal poderia ter variações quanto ao seu efeito na supressão no crescimento folicular. Considerando a dinâmica ovariana durante o ciclo estral na égua, a ovulação corresponde ao início da fase luteal (dia 0) e o corpo lúteo originado deste evento produz progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia do ciclo estral. Esta secreção se mantém estável até o décimo segundo dia. A luteólise ocorre entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo estral provocando queda nas concentrações plasmáticas de progesterona (GINTHER, 1992). Esses eventos interferem diretamente nos padrões de crescimento folicular ovariano.

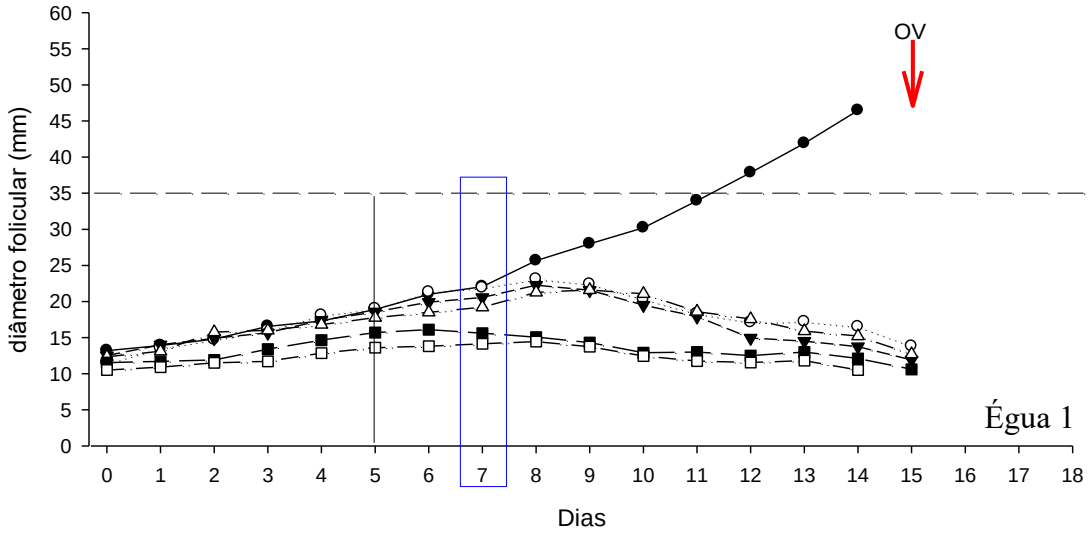
No decorrer do protocolo hormonal aqui utilizado foram aplicadas três doses de PGF2α. A primeira dose foi administrada no início dos tratamentos hormonais visando provocar a luteólise de corpos lúteos provenientes de ovulações anteriores, porém se estes CLs não fossem maduros e responsivos a esta primeira dose, uma segunda dose aplicada no D6 antes da remoção do DIP seria capaz de provocar alise destas estruturas. Ademais, algumas éguas apresentaram nos experimentos anteriores folículos grandes no momento da inserção do DIP e ovularam mesmo com o tratamento com a P4. Por esse motivo, optou-se pela administração de uma terceira dose de PGF2α no D8, um dia após a remoção do DIP, para garantir que a luteólise de um possível CL não responsivo à PGF2α que foi administrada no D6 ocorresse.

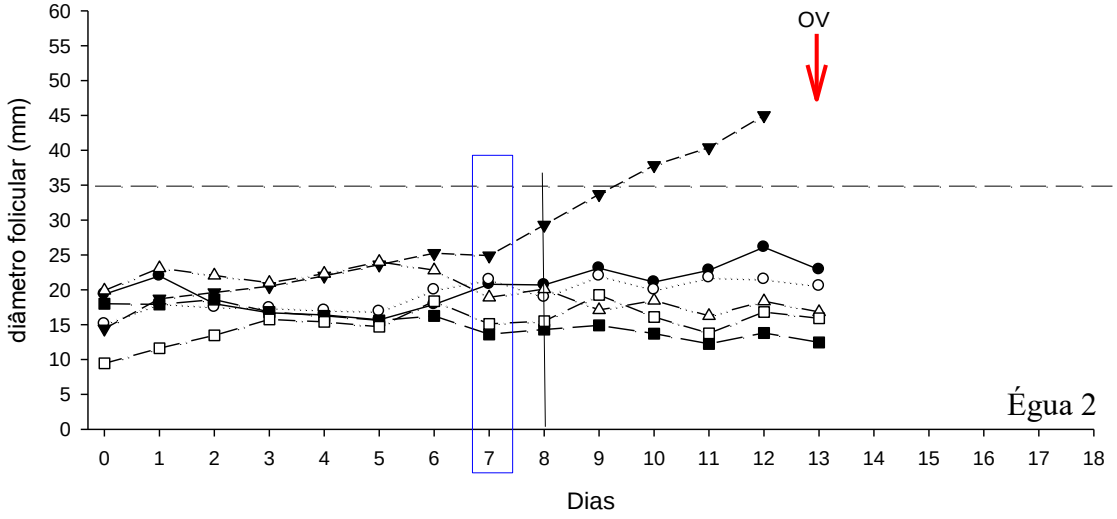
Os dados deste experimento reforçam os achados dos experimentos anteriores que indicam que a ação da progesterona do implante intravaginal utilizado não causou atresia dos folículos, mas foi capaz de retardar o crescimento dos mesmos quando iniciado 5, 10 ou 15 dias após a ovulação no período reprodutivo (Tabela 4). A diferença nas taxas de crescimento folicular entre os animais foi calculada durante a manutenção do DIP durante oito dias (D0 - D7) e após a retirada do DIP no dia 7 até o dia anterior à ovulação (OV-1). As diferenças nas taxas de crescimento folicular nos grupos G1, G2 e G3 foram semelhantes (P > 0,05) e os valores médios das mesmas foram respectivamente de 1,4mm/dia, 1,02 mm/dia e 1,3 mm/dia (Tabela 4). Esses dados sustentam a afirmação de que a ação da progesterona do dispositivo utilizado foi capaz de retardar o crescimento folicular de modo similar quando os tratamentos foram iniciados nos dias 5, 10 ou 15 após a ovulação.

Tabela 4 –Médias± DP (mm) da taxa de crescimento folicular durante a manutenção do DIP em G1 durante oito dias (D0 - D7) e após da retirada do implante de P4 e do dia 7 até o dia anterior à ovulação (OV - 1) e médias das diferenças individuais das taxas de crescimento folicular entre os dois períodos estudados.

	G1 (D5)			G2 (D10)			G3 (D15)		
	Antes da retirada do DIP (n=14;A)	Depois da retirada do DIP (n=14;B)	≠ (B – A)	Antes da retirada do DIP n=16;C)	Depois da retirada do DIP (n=15;D)	≠ (D – C)	Antes da retirada do DIP (n=14;E)	Depois da retirada do DIP (n=14;F)	≠ (F–E)
Média	1,25	2,65	1,4	1,28	2,29	1,02	1,12	2,42	1,3
DP	0,51	0,51	0,51	0,61	0,42	0,79	0,41	0,44	0,4

A dinâmica folicular em três animais que iniciaram o protocolo hormonal nos três tratamentos deste experimento é exemplificada na figura 11. Pode ser observado nos gráficos que não existe variação no padrão de crescimento folicular entre os animais exemplificados, ou seja, a resposta dos animais ao tratamento de sincronização não é dependente da fase do seu ciclo estral. Estes achados indicam que a P4 foi capaz de retardar o crescimento dos folículos nestas três éguas independentemente do momento em que o protocolo hormonal foi iniciado.


OV
diâmetro folicular (mm)
Égua 1
Dias


OV
diâmetro folicular (mm)
Égua 2
Dias

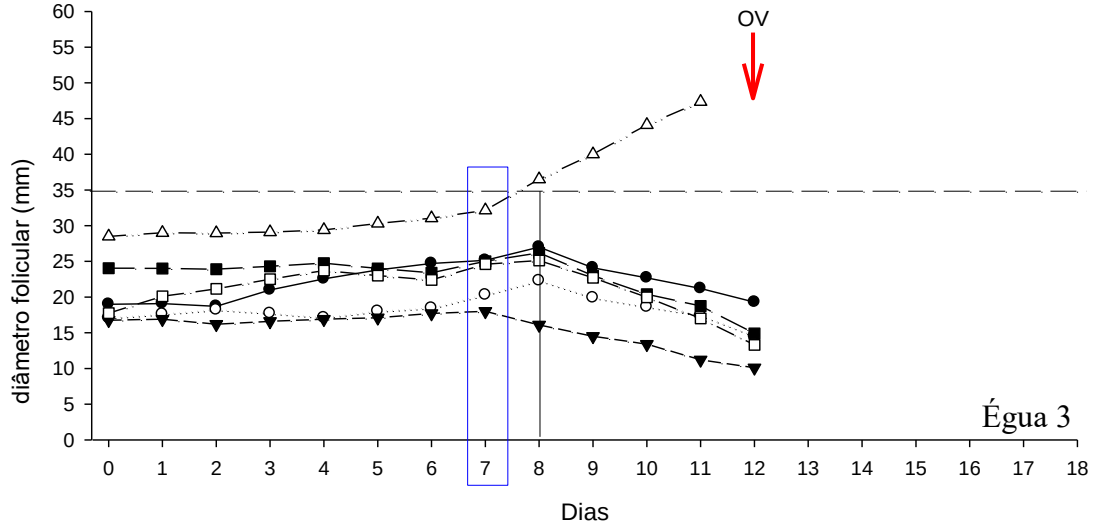

OV
diâmetro folicular (mm)
Égua 3
Dias

Figura 11. Representação gráfica do acompanhamento ultrassonográfico da dinâmica folicular de três éguas utilizadas no experimento III (Égua 1 – G1; Égua 2 – G2; Égua 3 – G3). Os diâmetros dos três maiores folículos de cada ovário foram mensurados diariamente. Os três gráficos exemplificam o efeito do implante de P4 na supressão do crescimento folicular em três animais que iniciaram os tratamentos em três momentos diferentes do ciclo estral. Nota-se que esse efeito modulador da progesterona sobre o crescimento folicular ocorre nos três grupos experimentais. O retângulo azul indica o dia em que os DIP foram retirados. O dia em que ocorreu a divergência folicular é indicado pela linha cheia vertical. O diâmetro folicular de 35 mm está indicado pela linha tracejada horizontal. A flecha vermelha indica o dia da ovulação.

Os diâmetros do maior folículo, segundo maior folículo e do folículo que ovulou foram mensurados no dia do início do tratamento (D0). As médias dessas variáveis são apresentadas na tabela 5 por grupo experimental e nenhuma diferença estatística ($P>0,05$) foi encontrada entre as médias de cada variável entre os grupos. Embora não significativos, pode ser observado que os diâmetros médios das três variáveis estudadas aumentam progressivamente de G1 para G2 para G3 (Tabela 5). Tem sido sugerido que o conhecimento prévio do tamanho dos folículos no início de tratamentos hormonais em éguas é importante (WEBEL e SQUIRES, 1982; MCKINNON, 2009). Estes estudos demonstram que protocolos de sincronização que também utilizaram a progesterona não são eficazes para a estimulação do estro em éguas em período de anestro que possuem ovários pequenos e inativos. McKinnon (2009) considera importante descartar éguas com ovários inativos para os protocolos de sincronização e selecionar apenas éguas com ovários contendo múltiplos folículos de aproximadamente 20mm. Vale ser ressaltado que os estudos citados foram realizados com éguas em período de transição ou anestro, diferentemente deste estudo que utilizou éguas cíclicas.

Tabela 5 - Diâmetro dos maiores folículos, do segundo maior e do folículo ovulatório no início dos tratamentos nos três grupos: G1: D0 = D5. D5 corresponde ao sexto dia após a ovulação. G2: D0 = D10. D10 corresponde ao décimo primeiro dia após a ovulação.G3: D0 = D15. D15 corresponde ao décimo sexto dia após a ovulação.

	Diâmetro folicular (mm) no D0								
	Folículo maior			2º folículo maior			Folículo que ovulou		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Média	18,7	20	23,5	15,3	16,6	17,8	15,8	16,7	22,2
DP	5,5	8,6	5,5	3,8	4,1	4,3	6,3	8,9	6,8
Variação	13,0-31,6	11,0-40,5	18,8-32,8	11,2-27,2	10,0-25,8	13,0-24,1	9,5-31,6	9,1-40,6	15,3-32,8

Os diâmetros do maior e do segundo maior folículo no momento da divergência folicular também foram mensurados em todas as éguas nos três grupos experimentais. A Tabela 6 contém os valores médios destas variáveis e nenhuma diferença estatística foi encontrada entre elas (P>0,05). No período da divergência folicular, o folículo dominante secreta inibina e causa uma redução nos níveis circulantes de FSH. Aparentemente, o aumento na produção de estradiol também atua em conjunto com a inibina para a redução nas concentrações circulantes de FSH. Esta diminuição do FSH o torna insuficiente para continuar a promover o crescimento dos folículos subordinados. A fase de divergência folicular se inicia quando o maior folículo atinge 22,5 mm de diâmetro e é caracterizada pelo momento onde ocorre uma manutenção da taxa de crescimento do maior folículo (folículo dominante) e uma diminuição da taxa de crescimento dos outros folículos (folículos subordinados; GINTHER, 2000). O folículo dominante adquire capacidade de utilizar baixas concentrações de FSH para o seu crescimento e desenvolvimento, devido a um aumento da expressão dos receptores de FSH (WEBB et al., 1999). Os dados apresentados na tabela 6 indicam que o diâmetro do maior e do segundo maior folículo no momento da divergência folicular não são influenciados pelo dia do ciclo estral o qual o tratamento hormonal é iniciado. Neste estudo, o dia da divergência folicular ocorreu após o D6 em 81%, 73% e 71,5% dos tratamentos nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente. Esses dados reforçam as observações anteriores de que o tratamento com o implante de progesterona foi eficiente para retardar o crescimento folicular.

Tabela 6. Diâmetros médios (mm) ± desvio padrão do maior e segundo maior folículo mensurados no dia da divergência folicular nos três grupos experimentais. D0 = início do tratamento = dias 5, 10 e 15 do ciclo estral respectivamente nos grupos G1, G2 e G3.

Diâmetro folicular no dia da divergência (mm)	Folículo maior			2º folículo maior		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Média	29,6	29,7	34,0	23,4	22,7	23,9
DP	3,8	5,1	6,6	3,1	4,2	4,1

Nos experimentos anteriores, o dia 10 do tratamento hormonal foi definido como o dia ideal para se proceder com a indução da ovulação por este dia concentrar um maior número de éguas que atendem aos critérios de possuir um folículo ≥ 35 mm e ecotextura uterina ≥ 3. Além disso, evitou-se a perda de animais ovulados naturalmente antes da indução. Utilizou-se o dia 10 do tratamento como o dia para a indução da ovulação para comparar dos dados coletados dos três grupos deste experimento. O número de animais que apresentaram folículo ≥ 35 mm e ecotextura uterina ≥ 3 até o dia 10 do tratamento, sendo eles responsivos aos agentes indutores da ovulação, são mostrados na tabela 7. Apesar de numericamente diferente, os grupos G1, G2, e G3 não diferiram (P > 0,05) e tiveram respectivamente 64,3%, 63,0% e 85,7% das éguas em condição de indução da ovulação até o dia 10. Outra observação importante foi que apenas duas éguas ovularam naturalmente até este dia do tratamento (Tabela 7).

Tabela 7 - Percentual de animais em que maior folículo atingiu o diâmetro ≥ 35 mm até e depois do dia 10 do tratamento hormonal. D0 = início do tratamento = dias 5, 10 e 15 do ciclo estral respectivamente nos grupos G1, G2 e G3.

Folículo ≥ 35 mm	G1	G2	G3
Até D10	64,3% (9/14)	63% (10/16)	85,7% (12/14)
Após D10	35,7% (5/14)	37% (6/16)	14,3% (2/14)

Após a detecção do folículo ≥35mm, as éguas não tiveram a ovulação induzida e foram monitoradas por ultrassonografia diariamente até a detecção da ovulação natural. A maioria das ovulações ocorreram em até quatro dias após a detecção do folículo ≥35mm (Tabela 8).

Tabela 8 - Percentual de animais que levaram até 4 dias ou mais para ovular naturalmente a partir do momento em que o maior folículo atingiu o diâmetro de ≥35mm nos três grupos experimentais. D0 = início do tratamento = dias 5, 10 e 15 do ciclo estral respectivamente nos grupos G1, G2 e G3.

Folículo ≥ 35 mm	G1	G2	G3
OV em até 4 dias	85,7% (12/14)	81% (13/16)	35,7% (5/14)
OV após 4 dias	14,3% (2/14)	19% (3/16)	64,3% (9/14)

Várias observações encontradas neste experimento foram essenciais para dar continuidade aos experimentos seguintes (IV e V) e na tabela 9 encontram-se os resultados obtidos com as detecções de ovulações que ocorreram naturalmente antes do dia 10, entre o dia 10 e 13 e após o dia 13 do tratamento hormonal. O maior número de ovulações, independentemente do grupo tratado, ocorreu entre os dias 10 e 13 (62%; 36/58) com apenas duas ocorrências de ovulação espontânea antes do previsto (3%; 2/58).

Tabela 9 - Percentual de animais em relação ao dia de ocorrência natural da ovulação nos três grupos experimentais. D0 = início do tratamento = dias 5, 10 e 15 do ciclo estral respectivamente nos grupos G1, G2 e G3.

Dia da ovulação	Antes do D10	Entre D10 e D13	Após o D13
G1	7,0% (1/14)	64,3% (9/14)	28,7% (4/14)
G2	6,0% (1/16)	57,0% (9/16)	37,0% (6/16)
G3	0,0 (0/0)	85,7% (12/14)	14,3% (2/14)
Total	3,0%(2/58)	62,0% (36/58)	35,0% (20/58)

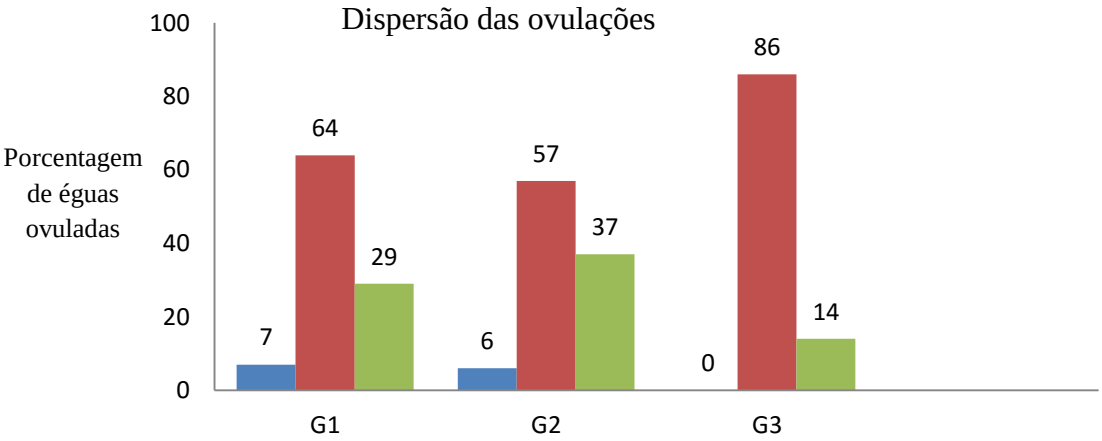


Figura 9. Percentural de animais em relação ao dia de ocorrência natural das ovulações nos três grupos experimentais: G1, G2 e G3 em três períodos: antes do D10 entre D10 e D13 e após o D13.

Os resultados acima quando analisados em conjunto com a avaliação da ecotextura uterina, dia em que o maior folículo atingiu 35 mm de diâmetro e com o número de dias que os folículos que atingiram 35 mm levaram para ovular, determinaram que a indução das ovulações deve ser realizada no D10 e no D12. No D10 a maioria das éguas responderia aos agentes indutores e poucas ou nenhuma teriam ovulação espontânea antes do previsto.

6.5.Experimento IV – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em diferentes fases do ciclo estral

Neste experimento, 15 éguas em fases aleatórias do ciclo estral foram submetidas ao protocolo de tratamento hormonal para sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação. O uso de animais escolhidos ao acaso objetivou simular um tratamento realizado à campo em um lote de animais cujo status reprodutivo fosse desconhecido. No entanto, o laboratório possuía todos os registros das ovulações desses animais e este dado possibilitou verificar a distribuição dessas éguas nas fases do ciclo estral em que se encontravam. Com esses dados foi possível verificar que, apesar do pequeno número experimental (n=15), as éguas utilizadas estavam equitativamente distribuídas em todas as fases do ciclo estral (Tabela 10). Essa distribuição homogênea foi importante para as análises dos dados deste experimento. Os resultados encontrados neste experimento simulam o que poderemos obter em testes futuros aplicando o novo protocolo de sincronização do estro e ovulação em um grande número de animais. Contudo, estas informações deverão ser interpretadas com cautela, já que o número de animais utilizados neste estudo foi limitado (n=15).

Tabela 10 – Distribuição dos animais aleatoriamente selecionados para o experimento IV em fases distintas do ciclo estral.

	D0 = início do tratamento		
Dias do ciclo estral	Dias 0 ao 5	Dias 6 ao 10	Dias 11 ao 16
Número de animais	5	5	5

As induções das ovulações foram realizadas no D10 e novamente no D12 para maximizar a eficiência do protocolo. A partir da indução da ovulação, os escaneamentos foram realizados a cada 6 horas até a detecção da ovulação. Na primeira indução da ovulação no D10, onze éguas (73,3%; 11/15) apresentavam folículo ≥ 35 mm e ecotextura uterina >3, sendo então submetidas à indução da ovulação com 1 mL de hCG por via IM (1000UI Chorulon®, MSD Agroline) e 3mL de GnRH por via IM (750 µG Sincrorrelin®, OuroFino). Neste grupo, três éguas (27%; 3/11 ou 20%; 3/15) ovularam em 30 horas após da indução, sete éguas (63%; 7/11 ou 46%; 7/15) ovularam em 42 horas após a indução e uma égua não ovulou em até 48 horas após a indução. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no trabalho de Ginther et al. (2008) que constataram que após a administração de uma dose de 1500-3000 UI de hCG em éguas com folículo maior que 35 mm de diâmetro a ovulação irá ocorrer em um intervalo entre 24 e 48 horas. Entretanto, neste experimento as ovulações ocorreram mesmo utilizando uma dose baixa de hCG (1000 UI Chorulon ®, MSD Agroline) em combinação com o GnRH (750 µg deslorelina, Sincrorrelin®, OuroFino).

No D12 a ovulação foi induzida em quatro éguas (26,7%; 4/15) e apenas uma dentre estas quatro apresentava folículo ≥ 35 mm, as outras três éguas apresentavam o maior folículo com diâmetros de 30,6, 31,5 e 32,3 mm. Neste grupo, duas éguas (50%; 2/4 ou 13%; 2/15) ovularam 42 horas após a indução e duas éguas (50%; 2/4 ou 13%; 2/15) não ovularam em até 48 horas após da indução. O diâmetro folicular médio 24 horas antes da indução da ovulação deve estar dentro do intervalo referido por Ginther (1992) de 34 a 70 mm. Melo (2006) promoveu ovulação em éguas induzidas com hCG (Chorulon®, 1500-3000 U.I. IM) e PGF2α (Dinolytic® 1,5 mL, 7,5 mg/égua IM) em folículos com diâmetro mínimo de 34,3mm. A associação de hCG e GnRH neste experimento ocasionou a ovulação de um folículo de diâmetro menor do que consta na literatura, um folículo de 32,3 mm ovulou em 42 horas após a indução.

Analisando as duas induções em conjunto (D10 e D12) podemos constatar que três éguas ovularam em 30 horas pós-indução (20%; 3/15), nove ovularam em 42 horas pós-indução (60%; 9/15) e três não ovularam em até 48 horas pós-indução (20%; 3/15).

Considerando-se que 91% das éguas induzidas no D10 (10/11) e 50% das éguas induzidas no D12 (2/4) ovularam em resposta ao protocolo hormonal utilizado, verificamos que a indução da ovulação apresentou uma eficiência de 80% (12/15) quando todos os animais tratados foram considerados. Apesar das induções terem sido realizadas exclusivamente com hCG e GnRH, deve-se lembrar que houve aplicação de PGF2α no D6 e no D8 (4 e 2 dias antes, respectivamente) e esse hormônio pode ter influenciado e/ou auxiliado na indução da ovulação. Vale ressaltar que PGF2α além da sua ação luteolítica também promove a liberação imediata de LH, e pode resultar na indução da ovulação em muitas espécies, incluindo a equina (NEWCOMBE et al., 2008).

6.6.Experimento V – Eficiência da sincronização da onda de crescimento folicular e indução da ovulação em éguas com status reprodutivo conhecido

Neste experimento, 14 éguas foram submetidas ao mesmo protocolo de tratamento hormonal com indução da ovulação do experimento IV, sendo o dia de início do protocolo nos dias 5, 10 ou 15 do ciclo estral, formando os grupos de estudo G1, G2 e G3.

No D10 do G1, dia da primeira indução, seis éguas apresentaram folículo com diâmetro ≥35mm e nestas foram administrados os agentes indutores da ovulação: 1 mL de hCG por via IM (1000UI Chorulon®, MSD Agroline) e 3mL de GnRH por via IM (750 µG Sincrorrelin®, OuroFino). Das seis éguas induzidas (42,9%; 6/14), uma égua ovulou em 30 horas após a indução (16,7%; 1/6 ou 7,1%; 1/14), quatro éguas ovularam em 42 horas após a indução (66,7%; 4/6 ou 28,6%; 4/14) e uma égua não ovulou em até 48 horas após a indução da ovulação (16,7%; 1/6 ou 7,1%; 1/14). No D12, momento da segunda indução da ovulação, oito éguas receberam os mesmos agentes indutores, e entre elas, apenas quatro apresentavam folículo com diâmetro ≥ 35 mm, e outras quatro éguas tinham folículo com diâmetro menor (17,95 mm, 28,6 mm, 31,1 mm, 32,5 mm). Destas oito éguas induzidas no D12, uma égua ovulou em 30 horas após a indução (12,5%; 1/8 ou 7,1%; 1/14), quatro ovularam em 42 horas após a indução (50%; 4/8 ou 28,6%; 4/14) e três não ovularam em até 48 horas após a indução (37,5%; 3/8 ou 21,4%; 3/14).

O G2 foi formado por um grupo de 13 éguas, porém foi realizada a indução da ovulação em apenas 12 animais, pois uma égua ovulou antes do D10. No D10, momento da primeira indução da ovulação, oito éguas (66,7%; 8/12) foram submetidas ao protocolo de indução da

ovulação. Deste grupo, quatro éguas ovularam em 24 horas após a indução (33,3%; 4/12), três ovularam em 42 horas após a indução (25%; 3/12) e uma égua não ovulou e seu folículo regrediu (8,33%; 1/12). Na segunda indução que ocorreu no D12, foram administrados os mesmos agentes indutores da ovulação nos quatro animais restantes (33,3%; 4/12). No D12, dois animais (16,7%; 2/12) apresentaram folículos de diâmetro menor do que 35mm, o folículo que apresentava 32,7mm no momento da indução não ovulou e o folículo com diâmetro de 34.9mm ovulou em 48 horas após a indução. As outras duas éguas (16,7%; 2/12) induzidas no D12 que apresentaram folículo com diâmetro ≥ 35 mm ovularam 30 horas pós-indução.

Pode-se considerar que a eficácia da indução das ovulações em relação ao número de animais submetidos a esse tratamento é de 83,3% (10/12). Porém, devido ao fato de que uma égua ovulou antes de ser submetida ao protocolo de indução, a eficácia do protocolo em relação ao número total de animais do grupo experimental (n=13) foi de 76,9% (10/13). Das 13 éguas que faziam parte do grupo experimental (G2), obteve-se sucesso da indução da ovulação em 10 animais (76,9%; 10/13).

O G3 foi composto por um total de 14 éguas, porém, duas éguas (14,3%; 2/14) ovularam antes de serem submetidas ao protocolo de indução da ovulação. Portanto, no G3 apenas 12 éguas foram submetidas à indução da ovulação.

No G3, seis éguas (50%; 6/12) foram induzidas com 100% de ovulação, ou seja, todos os folículos foram responsivos aos agentes indutores utilizados. Na primeira indução (D10), três animais (25%; 3/12) ovularam em 24 horas após a indução, dois (16,7%; 2/12) em 42 horas e um (8,3%; 1/12) em 48 horas após a indução da ovulação. No D12, momento da segunda indução das ovulações, seis éguas foram induzidas (50%; 6/12), e dentre estas, duas ovularam em 24 horas após a indução (16,7%; 2/12), três (25%; 3/12) em 42 horas e uma égua não ovulou em até 48 horas após a indução (8,3%; 1/12).

Do total das 12 éguas induzidas no G3, 11 éguas ovularam, o que resulta numa eficácia de 91,6% da indução da ovulação. Entretanto, considerando-se a eficácia do protocolo em relação ao número total de éguas no G3 (n= 14), o resultado obtido foi de 78,6% (11/14) de sincronização das ovulações, pois do número total inicial (n= 14), apenas 11 éguas ovularam devido à ocorrência de ovulações espontâneas antes do esperado.

Analisando os resultados obtidos nos experimentos IV e V, o intervalo de ocorrência das ovulações após a indução com hCG e GnRH foi entre 24 e 48 horas. A maioria das éguas tratadas com hCG ovulam até 48 horas após o tratamento (variação de 12 a 72 horas), enquanto a maior parte das éguas tratadas com GnRH ovulam entre 36 a 42 horas pós-tratamento (MELO, 2006).

No G1, dez éguas (10/14) éguas apresentaram folículos maiores do que 35 mm no momento das induções (D10 e D12), e 90% dos animais com esta característica (folículo ≥ 35 mm) ovularam (9/10). Uma égua (1/14; G1) apresentou folículo de 32,5 mm, todavia ovulou após a indução. No G2, dez éguas (10/13) apresentaram folículos maiores do que 35mm e 90% dos animais (folículo ≥35mm) ovularam (9/10). Uma égua (1/13; G2) apresentou folículo de 34,9 mm e também ovulou após a indução. No G3, nove éguas (9/12) possuíam folículos maiores do que 35 mm e 100% desses animais ovularam (9/9). Duas éguas (2/12; G3) que apresentaram folículos de 31,7 e 32 mm também ovularam após a indução. Ao analisar os três grupos (G1, G2 e G3) constatamos que 93,3% dos animais que possuíam folículos com diâmetro maior do que 35 mm ovularam. Inclusive, como não era esperado, quatro folículos de diâmetro menor do que 35 mm (31,7; 32; 32,5 e 34,9 mm) também foram responsivos aos agentes indutores (hCG + GnRH). Samper (1997) obteve eficácia semelhante ao realizar a indução da ovulação com hCG. Em seu estudo, 95% das éguas que apresentavam folículos entre 35 a 40 mm de diâmetro e edema uterino elevado ovularam após a aplicação de hCG.

Considerando-se os experimentos IV e V, no total foram realizados quatro protocolos de indução das ovulações (D10 e D12 – IV; D10 e D12 – V). A avaliação da eficácia do protocolo de sincronização do estro e indução da ovulação em éguas nestes experimentos foi de 76,73%.

Cada agente indutor, dose, ou associação de hormônios deve estimular uma porcentagem considerável de éguas a ovularem dentro de um período previsto. A principal aplicação da sincronização do estro e da ovulação em éguas é na transferência de embriões (TE), quando a ovulação da égua receptora deve ocorrer um dia antes a dois dias após a ovulação da égua doadora (SQUIRES, 1993). A sincronização da ovulação com o protocolo proposto também poderá facilitar o procedimento de inseminação artificial com sêmen fresco porque o intervalo entre a inseminação e a ovulação pode variar até 48 horas. O uso do sêmen congelado exige maior acurácia e o intervalo deve ser menor do que 24 horas (PALMER, 1993). A longevidade dos espermatozoides do sêmen equino submetido à congelação é menor do que do sêmen refrigerado e por essa razão recomenda-se realizar a inseminação dentro de 12 horas antes da ovulação ou em até seis horas após sua ocorrência (LOOMIS e SQUIRES, 2005). Para obtenção de resultados satisfatórios na TE e em éguas inseminadas com sêmen transportado sob refrigeração ou congelado é importante realizar a indução da ovulação. Neste protocolo, 100% das ovulações ocorreram no intervalo de 24 a 48 horas, o que permite atender às exigências de ambas as técnicas de manejo reprodutivo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dispositivos intravaginais contendo 1,44mg de P4 foram capazes de retardar o crescimento folicular no período reprodutivo independente da fase do ciclo estral em que as éguas se encontravam. No protocolo estudado o D7 foi definido como o momento mais adequado para a retirada do DIP; as aplicações de prostaglandina devem ser feitas no D0, D6 e no D8 e a indução das ovulações deve ser feita no D10 e D12.

Esse protocolo de sincronização do estro e da ovulação trará vantagem em relação ao procedimento de indução da ovulação individual como normalmente é realizado. A maioria dos animais apresentou responsividade do folículo pré-ovulatório ao GnRH e hCG promovendo o sucesso da indução da ovulação. Foi promovida a sincronização do estro e da ovulação em 76,73% dos animais submetidos ao tratamento hormonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W.R.; URWIN, V.; SIMPSON, D.J.; GREENWOOD, R.E.; CROWHURST, R.C.; ELLIS, D.R.; RICKETTS, S.W.; HUNT, M.D.; DIGBY, N.J. Preliminary studies on the use of an oral progestagen to induce estrus and ovulation in seasonally anestrous Thoroughbred mares. **EquineVeterinaryJournal**, v.12, p.141-145, 1980.

ALMEIDA, H.B., VIANA, W.G., ARRUDA, R.P., OLIVEIRA, C.A. Sincronização de estro e dinâmica folicular de éguas Crioulas submetidas a tratamentos com norgestomet, acetato de melengestrol e altrenogest. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n.6, 2001.

ATAMAN M.B., GÜNAY A., GÜNAY Ü., BARAN A., UZMAN M. Oestrous synchronization with progesterone impregnated device and prostaglandin F2α both combined with human chorionic gonadotropin in transitional mares. **Revue Méd. Vet**. 2000;151:1031-1034. 2000.

BARBACINI S, ZAVAGLIA G, GUILDEN P, MARCHI V, NECCHI D. Retrospective study on the efficacy of hCG in equine artificial insemination program using frozen semen. **EquineVeterinaryEducation**, v. 6, p. 404-408, 2000.

BARUSELLI, P.S., MARQUES M.O., NASSER, L.F., REIS, E.L., BO, G.A. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 214.2003a.

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

BEAL J, RUBIN MIB, DELACÔRTE FD, OLIVEIRA LSS, SILVA JHS,SILVA CAM. Ovulation induction with human chorionic gobadotropin in criollomares.Brazilian.**Journal of Veterinary Research and Animal Science** (Impresso), v. 48, p. 332-335, 2011.

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 EquineVeterinaryScience**, v. 24, n.6, p. 231-233, 2004.

BERGEFELT, D.R. Estrous synchronization.mare In: SAMPER J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. (2ed). Philaddelphia: Saunders, p. 195-228. 2000.

BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D., SHUMACHER, J. Reproductive Physiology of the Nonpregnant Mare. In: **Manual of Equine Reproduction.** 1ªed. St. Louis, Missouri:Mosby-Year Book, Inc., p.9-13. 1998.

BRADECAMP, E.A. Etta. Synchronization of Ovulation. In: MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E., VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell, p. 1870-1876. 2011.

BRASIL. **MAPAMinistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>Acesso em: 06 de janeiro 2016.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; ARAÚJO, G.H.M.; ARAÚJO, C.F.M.; MEIRA, C.; FILHO, N.P.; ALVARENGA, M.A. Use of intravaginal progesterone implant to hasten the first ovulation of the season in transitional mares. In: 11th Congress of the World Equine Veterinary Association – WEVA, Guarujá,**ANAIS…**2009.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.

FARIA DR, GRADELA A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **RevistaBrasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.114-22, 2010.

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.

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

GINTHER OJ.Sexualbehavior.Characteristics of the ovulatory season. In: **Reproductive Biologyof the Mare: Basic and AppliedAspects**, 2nd ed. Wisconsin: EditoraEquiservices, 1992.

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, p.197- 205, 2001.

GINTHER OJ, BEG MA, GASTAL EL, COOPER DA .Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science.** v.114, p.311–317, 2008.

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_-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311–317, 2009.

GRECO GM. **Avaliação de novos protocolos visando induzir e sincronizar a ovulação em éguas.** 2010. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Universidade Estadual Paulista – Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2010.

HANDLER, J.; SCHÖNLIEB, S.; HOPPEN, H-O.; AURICH, C. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDTM) in mares. **Theriogenology**, v.65, p.1145-1158, 2006.

HANLON,D.W.; EVANS, M.J.; FIRTH, E.C. Effect of intravaginal progesterone on follicular dynamic and FSH, LH and progesterone concentrations in transitional mares**. Animal Reproduction Science,** 121S, p.32-34, 2010.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L. AND YEATES, B.F. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, 15: 371- 372. 1983.

IETS International Embryo Transfer Society .2013 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS.Disponívelem: <http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf >Acessoem: 30 de novembro de 2015.

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.

KASUM, M., KURDIJA, K., ORESKOVIC, S., CEHIC, E., PAVICIC-BALDANI, D., SKRGATIC, L. Combined ovulation triggering with GnRH agonist and hCG in IVF patients. **Journal Gynecological Endocrinology,** v. 32, n. 11. 2016.

LAMB, G.C., DAHLEN, C.R., LARSON, J.E., MARQUEZINI, G., STEVENSON, J.S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. **Journal of animal science**, v.88, n. 13, p. E181-E192, 2014.

LARSEN, J.E.; NORMAN, S.T. The Synchronisation of Oestrus and Ovulation in the Mare.**RIRDC - Rural Industries Research and Development Corporation, Innovation for rural Australia**, v. 10, n.202, p. 7-31. 2010.

LOFSTEDT RM.DIESTRUS. In: Mckinnon AO, Squires EL, Waala WE, Varner DD. **Equine Reproduction**, 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell, p. 1728-1731. 2011.

LOY, R.G., PEMSTEIN, R., O'CANNA, D., DOUGLAS, R.H. Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin. **Theriogenology,** v.15, n.2, p.191-200. 1981.

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

LOPES, E.P. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.223-229, 2015.

MADUREIRA, E. H.; BARBUIO, J. P.; ARRUDA, R. P.; BERTAN, C. M.; MIZUTA, K.; BRAZZACH, M. L.; BARNABÉ, R. C.; RODRIGUES, P. H. M. Sincronização do estro em fêmeas bovinas com o uso de Acetato de Melengestrol (MGA) associado à prostaglandina F_{2a} e ao 17b-estradiol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 94-97, 1997.

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…**, Pernambuco, Acta Science Veterinariae,p.365. 2010.

MCCUE P, HUDSON JJ, BRUEMMER JE, SQUIRES EL. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 50, Denver, CO. **Anais**… Denver, CO: AAEP, p.1492-1507, 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. Hormonal control of equine reproduction. **Proceedings** of the 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practioners, Gold Coast, Austrália, 2009.

MCKINNON, A.O., MCCUE, P.M. Induction of Ovulation. In: MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E., VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell, p. 1858-1866. 2011.

MELO, C.M. **Indução de Ovulação em Éguas**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu - SP. 2006.

MONTECHIESI, D.F.**Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas cíclicas.** 2009. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Universidade Estadual Paulista – Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2009.

MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R.L.; T. DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science** v.78, p.1568-1576, 2000.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p.245–262, 2000.

NEWCOMBE, J.R., HANDLER, J., KLUG, E., MEYERS, P.J., JOCHLE, W. Treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or hCG to assist ovulations. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 2, p. 57-63. 2002.

NEWCOMBE JOHN R., JÖCHLE W., CUERVO-ARANGO J. Effect of Dose of Cloprostenol on the Interval to Ovulation in the Diestrous Mare: A Retrospective Study. **Journal of Equine Veterinary Science.** v.28, p.532-539, 2008.

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

PFEIFER, L. F.; SCHNEIDER, A.; CASTILHO, E. M.; LUZ E. M.; ATAÍDE P. F.; DIONELLO N. J. L.; PIVATO I.; RUMPF R.; CORRÊA M. N. Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e a produção in vitro de embriões. Reunião anual da sociedade brasileira de

tecnologia de embriões, Angra dos Reis, RJ. Porto Alegre:UFRGS, **Acta Scientiae Veterinariae,** v.33, Supl. 1, p.184. 2005.

PINTO CR, BURNS PJ, WHISNANT S. Effects of single estradiol administration on follicular dynamics and luteal function of cyclic mares.In: InternationalSymposiumonEquineEmbryoTransfer, 6, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: ISEET, 2004. p.92-94. Resumo.

RAMOS, A.F. **Efeito de progestesterona e benzoato de estradiol na dinâmica folicular e produção in vitro de embriões bovinos**, 40p. Dissertação (Doutorado). Programa dos Cursos de Pós-Graduação Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, MG. 2006.

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.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. The follicle: pratical aspects of follicle control. Current **therapy in equine reproduction.** Missouri: Saunders Elsevier, 19p, 2007.

SAMPER, J.C. Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not.**Theriogenology**, v.70, n.3, p.445–447. 2008.

SCHUTZER, C.G.C. **Utilização do implante de progesterona intra-vaginal e acetato de deslorelina em éguas acíclicas associados ou não a luz artificial para o controle da sazonalidade reprodutiva.** 2012. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de medicina veterinária e zootecnia Campus de botucatu – Reprodução Animal - Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2012.

SHARP, D.C. Melatonin In: McKinnon. A.O, SQUIRES E.L, WAALA W.E., VARNER, D.D.. **EquineReproduction**, 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell, p. 1669-1677. 2011.

SIEME, H.; SCHA¨FER, 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, P.C.A. **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) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

SQUIRES, E.L. Progestin, In: MCKINNON, A.O. & VOSS, J.L. **Equine reproduction.** Cap.33, p. 311-318. Philadelphia: Lea &Febiger. 1993.

STAEMPFLI SA. PROSTAGLANDINS. . IN: MCKINNON AO, SQUIRES EL, WAALA WE, VARNERDD. **EquineReproduction**, 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell, p. 1797-1801. 2011.

TEMPLETON A, MORRIS JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. **New EnglandJournal Medicine**, v. 339, p.573–577, 1998.

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

WEBEL SK, FRANKLIN V, HARLAND B, DZIUK PJ. Fertility, ovulation and maturation of eggs in mares injected with HCG. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 337-341, 1977.

WEBEL, S.K.; SQUIRES, E.L. Control of estrous cycle in mares with altrenogest. **JournalofReproductionand Fertility**. Suppl., v.32, p.193-198, 1982.