

# Indução de múltiplas ovulações em éguas – revisão de literatura

## Marcus André Ferreira Sá

Mestre em Medicina Veterinária. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

## Thereza Fornazier Good Lima

Médica Veterinária autônoma, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

## Júlio Cesar Ferraz Jacob

Prof. Doutor do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

## Resumo

Diversos fármacos já foram utilizados com o objetivo de aumentar o número de folículos destinados à ovulação em éguas. Entretanto, os resultados obtidos utilizando alguns deles foram inconsistentes. Diante disto, a presente revisão de literatura visa debater os principais aspectos anatômicos e fisiológicos da espécie equina em resposta aos tratamentos para estimulação ovariana. FSH-p e a imunoneutralização contra a inibina tem suas aplicabilidades limitadas. O EPE pode apresentar diferentes concentrações de FSH e LH, dificultando sua repetibilidade. O eFSH tem apresentado bons resultados em induzir múltiplas ovulações. O FSH-re apresenta a vantagem de ser um produto puro e sintético. A partir da presente revisão de literatura foi possível observar que os tratamentos hormonais visando a estimulação ovariana em equinos ainda esbarram em limitações anatômicas e fisiológicas, mesmo com todos os avanços que ocorreram nos últimos 30 anos de pesquisas que concernem ao tema.

Palavras-chave: Superovulação. Transferência de embrião. Fisiologia ovariana.

## Abstract

Several products have been used in order to increase the number of follicles destined to ovulation in mares. However, the results obtained have been inconsistent. So, this review aims to discuss the main anatomical and physiological aspects of the equine species in response to treatments for ovarian stimulation. FSH-p and immunoneutralization against inhibin has restricted applicability. EPE can present variables FSH/LH concentration, which reduced repeatability. eFSH has shown good results in inducing multiple ovulations. FSH-re presents the advantage because it's a pure and synthetic product. With this review was possible to conclude that hormonal treatments to ovarian stimulation in mares shows anatomical and physiological limitations, despite all the advances that have occurred in the last 30 years of research about this subject.

Keywords: Superovulation. Embryo transfer. Ovarian physiology.

## Introdução

A equinocultura nacional movimenta algo em torno de 7,8 bilhões de reais anualmente, sendo necessário o aprimoramento constante de técnicas que permitam a expansão da produção e o ganho genético do plantel. Entretanto, os progressos nas biotécnicas da reprodução nesta espécie são lentos comparados a outras espécies. O uso da transferência de embriões (T.E.) já se encontra consolidado e vem progredindo anualmente. O Brasil é responsável por 43% dos embriões produzidos pelo mundo, ocupando o primeiro lugar em número de embriões transferidos (STROUD; CALLESEN, 2012). Por outro lado, novas técnicas começam a surgir de forma incipiente como opções para animais subférteis, tais como a Transferência de Oócito (T.O.), Transferência Intracitoplasmática de Gametas (GIFT), Injeção Intracitoplasmática de Gametas (ICSI) e a Clonagem.

Isto fez aumentar o desejo de obter mais embriões em uma mesma estação de monta oriundos de uma mesma égua. Um recurso que pode atender esse desejo é a indução de múltiplas ovulações. Normalmente, em éguas com ovulação simples a recuperação embrionária está em torno de 50 % por ovulação. Já éguas induzidas a múltiplas ovulações apresentam maior recuperação embrionária por ciclo, em torno de 1,9 embriões. Entretanto, o número de embriões recuperados para cada ovulação está próximo ao de éguas com ovulação simples, em torno de 0,5 embriões (SQUIRES *et al.*, 2003a). No caso de éguas que espontaneamente apresentam dupla ovulação, geralmente o número de embriões por ovulação aumenta, proporcionando ao menos um embrião por coleta.

Sendo assim, para aumentar o número de potros por doadora é necessário um tratamento consistente que estimule o desenvolvimento folicular, aumentando a taxa de ovulação e recuperação embrionária. Isto é importante até mesmo em caso de animais subférteis ou éguas idosas, que podem apresentar atividade ovariana prejudicada e menor número de descendentes. Além disso, o tratamento pode disponibilizar embriões extras que podem ser transferidos ou congelados para uso posterior, reduzindo o custo de manutenção com éguas receptoras que por vezes são preparadas para receber embrião, mas acabam não sendo utilizadas.

Outras vantagens da estimulação ovariana incluem um aumento no número de folículos que podem ser aspirados para a coleta de oócitos para fertilização in vitro ou a

transferência de oócitos, além da aplicação de biotécnicas como a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) (SQUIRES, *et al.*, 2003).

Diversos produtos já foram utilizados com o objetivo de aumentar o número de folículos destinados à ovulação em éguas. Entretanto, os resultados obtidos utilizando alguns deles foram inconsistentes. Diante disto, a presente revisão de literatura visa debater os principais aspectos anatômicos e fisiológicos concernentes às éguas durante os tratamentos para estimulação ovariana.

## Revisão de Literatura

### DINÂMICA FOLICULAR EQUINA

A égua se caracteriza por ser monovulatória, sofrendo influência da estação do ano, com ciclos estrais regulares, a cada 21/22 dias em média, no período de dias longos. O período interovulatório tem início no momento de uma ovulação associada ao estro até o final do estro seguinte, quando ocorre a próxima ovulação. Alguns tipos de ondas foliculares se desenvolvem durante a estação de monta. Na onda menor, o maior folículo não chega a se tornar dominante. Na onda maior, dividida em primária e secundária, o maior folículo se torna o dominante (GINTHER *et al.*, 2004; JACOB *et al.*, 2009).

A maioria das éguas apresenta desenvolvimento de uma onda folicular por ciclo, que inicia na metade da fase luteal. Porém, em torno de um terço das éguas pode ocorrer o desenvolvimento de outra onda folicular iniciada rapidamente após a ovulação (GINTHER *et al.*, 1992). Quando a emergência ocorre durante o estro, denomina-se onda folicular secundária e origina um folículo dominante de diestro, que pode regredir ou ovular. A emergência da onda no meio do diestro é chamada de onda folicular primária e produz um folículo dominante destinado a ovular durante o estro (GINTHER, 1993; EVANS, 2003).

A emergência da onda folicular se caracteriza pelo surgimento de um grupo de folículos com diâmetros variando entre 6 e 10mm, dando início a fase de crescimento comum que ocorre por volta de 6 dias após a ovulação (GINTHER *et al.*, 2002; 2005;

JACOB *et al.*, 2009). Em concomitância a esta fase, ocorre o aumento das concentrações séricas de FSH (Hormônio Folículo Estimulante). No momento em que os maiores folículos da onda atingem diâmetro  $\geq 13\text{mm}$ , a concentração de FSH começa a diminuir devido à produção de inibina por esses folículos (DONADEU; GINTHER, 2001; GINTHER *et al.*, 2005). O declínio da concentração de FSH desde o pico da onda até o início da divergência folicular tem sido descrito à medida que se aumenta a inibina e o número de folículos. A concentração de inibina total começa a aumentar antes do início do declínio da onda de FSH (DONADEU; GINTHER, 2001). Quando o maior folículo alcança o diâmetro aproximadamente de 21 a 23 mm, o que ocorre, em média aos seis dias após a emergência, verifica-se o fim da fase comum de crescimento e o início da divergência (GINTHER, 2000; JACOB, 2009). O início da esperada divergência baseou-se nos diâmetros atingidos pelos folículos, em estudos prévios, em que a divergência folicular foi utilizada para procedimentos experimentais capazes de interferir na divergência, quando os folículos alcançam 22,5 mm de diâmetro em éguas (GINTHER, 2000). A divergência ocorre quando o maior folículo atinge 20 a 25 mm de diâmetro, havendo alterações na taxa de crescimento entre o folículo dominante e os subordinados, sendo que o dominante continua seu crescimento e os demais cessam seu crescimento e/ou regredem. Essa alteração é o principal evento durante a seleção do folículo dominante, sendo precedido pelo aumento nas concentrações de LH (GINTHER *et al.*, 2004; JACOB *et al.*, 2009). O mecanismo da divergência deve impedir o crescimento contínuo do futuro folículo subordinado, desde que o mesmo seja capaz de se tornar dominante, como indicado nos estudos envolvendo aspiração do folículo dominante em vacas e éguas (GINTHER, 2000).

Jacob *et al.* (2009) relataram que em 8/11 ondas ovulatórias com dois folículos dominantes, uma segunda divergência ocorreu entre o maior e o segundo maior folículo com 2,5 dias após a primeira divergência. A incidência de dois folículos dominantes em uma onda ovulatória tem sido em torno de 20% na raça Bretã (GINTHER *et al.* 2008). Esta incidência é maior do que a de dupla ovulação, de forma que um dos folículos pode regredir (GINTHER *et al.*, 2004).

Comparando-se o maior folículo de uma onda com os dois maiores de outra onda, observou-se que o diâmetro atingido neste caso foi menor do que quando se observou somente um folículo em crescimento, quando os dois folículos se encontram no mesmo ovário. Entretanto, esta diferença reduziu para 4mm quando os dois folículos

estavam em ovários opostos (GINTHER, 1995).

Próximo ao momento da divergência, um dos folículos tem aumentada a capacidade de produção de estradiol, a sensibilidade ao FSH e a especificidade para responder ao LH (Hormônio Luteinizante) através da indução de receptores nas células da granulosa. Tal característica permite a ocorrência de apenas uma ovulação, eventualmente duas ou mais são observadas (GINTHER, 1992; JACOB, 2009).

A elevação passageira de LH ocorre durante a divergência como parte da onda ovulatória de LH. Em éguas jovens (cinco a seis anos), a onda de LH se inicia em torno do 4º dia antes da ovulação, alcançando o máximo um dia após a ovulação (JACOB, 2009).

Na fase pós-divergência, o folículo dominante passa a depender do LH para o desenvolvimento, maturação e ovulação. Além disso, há ação de fatores de crescimento intrafoliculares, presentes desde a seleção do futuro folículo dominante, e de proteases envolvidas com a esteroidogênese intrafolicular que leva à ovulação (GASTAL *et al.*, 2000; DONADEU; GINTHER, 2003; SPICER *et al.*, 2005).

Os níveis de FSH permanecem baixos até a ovulação, sendo esta diminuição atribuída especialmente ao folículo dominante (DONADEU; GINTHER, 2003). Os folículos subordinados não respondem à baixa concentração sistêmica de FSH além de não possuírem receptores de LH nas células da granulosa em abundância. Entretanto, tal incapacidade dos folículos subordinados em responder ao FSH sistêmico pode ser compensada pela administração exógena da concentração da gonadotrofina antes que a dominância folicular se estabeleça (SAMPER; PYCOCK; MCKINNON, 2007).

## FATORES QUE INFLUENCIAM OS TRATAMENTOS ESTIMULATÓRIOS

Nas últimas décadas, conseguiu-se grandes avanços nos tratamentos superovulatórios considerando o número de ovulações por ciclo. Entretanto, alguns autores sustentam que a superovulação em éguas não obterá sucesso devido à anatomia do ovário, pois este possui uma pequena porção destinada à ovulação, região conhecida como fossa de ovulação, que combinada ao tamanho do folículo pré-ovulatório da égua, dificulta a captação do oócito (SQUIRES; McCUE, 2007). Ao analisar a recuperação

embrionária sobre o número de ovulações em éguas tratadas, verifica-se que quanto mais o ovário é estimulado, menor é a recuperação embrionária (LOGAN *et al.*, 2007). Provavelmente, o que ocorre é um excessivo acúmulo de coágulos sanguíneos na fossa ovulatória decorrentes da superovulação, impedindo a captação dos oócitos pelo oviduto. Em éguas que ovulam espontaneamente, esse acúmulo de coágulos não foi observado. Éguas superovuladas que apresentam até três ovulações, o número de recuperação de oócitos viáveis por ovulação no oviduto foi similar às éguas com ovulação simples (CARMO *et al.*, 2006). Éguas que espontaneamente apresentam dupla ovulação, têm maior recuperação embrionária por ciclo estral e são mais produtivas em programas de transferência de embriões (SQUIRES; McCUE, 2007).

Além da anatomia ovariana, os protocolos para múltiplas ou dupla ovulação em éguas apresentam outras dificuldades, como a hipersensibilização da hipófise, a resposta individual e o período ideal para o início dos tratamentos além do alto valor e dificuldade na obtenção das drogas (ALVARENGA *et al.*, 2008; NAGAO *et al.*, 2012).

Visando a redução do tempo de tratamento, o que também proporcionaria um protocolo mais econômico, McCue *et al.* (2008) comparam dois tratamentos, sendo um deles o tradicional (12,5mg e-FSH bid) e outro de curta duração (três dias). Após esses três dias, permitia-se que os folículos atingissem 35 mm de diâmetro ou superior. Neste momento, induziram a ovulação com Gonadotrofina Coriônica humana (hCG). O protocolo tradicional obtiveram médias de  $4,9 \pm 0,1$  dias de duração,  $5,5 \pm 0,1$  ovulações e recuperação embrionária por lavado de  $2,6 \pm 0,2$ . Já o protocolo mais curto alcançou média de ovulações de  $3,8 \pm 0,2$  e  $0,8 \pm 0,3$  embriões por lavado, havendo diferença entre os grupos tratados ( $P < 0,05$ ). Entretanto, a média de embriões recuperados no protocolo curto foi semelhante ao grupo controle ( $0,8 \pm 0,2$ ), o que significa que um protocolo eficiente e econômico para recuperação embrionária próxima ao número de ovulações ainda não foi atingido. Com o mesmo intuito, Gimenes *et al.* (2010) utilizaram dois protocolos de superovulação usando 6 e 8mg de EPE a cada 12 horas e os tratamentos eram iniciados quando as éguas apresentavam o maior folículo medindo entre 20-23mm de diâmetro ou no dia oito pós ovulação independente do tamanho do folículo. Concluíram que o início do tratamento com 8mg a cada 12 horas, quando o maior folículo atingiu 20 a 23 mm foi o mais eficaz para aumentar o número de folículos com tamanho  $> 30$  mm (2,2) e ovulação (2,0) com o mínimo de dias de tratamento

(4,6). Sá *et al.* (2010) utilizando tratamento semelhante, relataram 6,2 dias até que os folículos atingissem 35mm de diâmetro.

Diversos produtos já foram testados com o objetivo de aumentar o número de folículos destinados à ovulação em éguas. Hormônio Folículo Estimulante suíno (p-FSH), Imunização antiinibina e Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), Extrato de Pituitária Equina (EPE), Extrato purificado do Hormônio Folículo Estimulante equino (e-FSH), FSH equino recombinante e, mais recentemente, o Acetato de Deslorelina (AZEVEDO *et al.*, 2015; CULLINGFORD *et al.*, 2010; SÁ *et al.*, 2010; SQUIRES *et al.*, 2003; WITT, 2013). Algumas dessas substâncias não foram eficientes em induzir múltiplas ovulações em éguas. Por esse motivo as pesquisas se direcionaram principalmente para protocolos que utilizam EPE, e-FSH e FSH-re (associado ou não ao LH-re) e o Acetato de Deslorelina.

A população folicular no início do tratamento, o dia do início do tratamento e o número de aplicações por dia também são capazes de influenciar a resposta de éguas cíclicas às gonadotrofinas exógenas. O ideal é que os tratamentos com EPE ou eFSH sejam iniciados no surgimento de uma onda folicular, antes do aparecimento do folículo dominante (SQUIRES *et al.*, 2004). Woods e Ginther (1983) relataram que o tratamento com EPE iniciado no dia 15 após ovulação obteve taxa de ovulação maior ( $2.9 \pm 0.5$ ) do que quando iniciado no dia 19 ( $1.3 \pm 0.2$ ). No entanto, Dippert *et al.* (1992) quando iniciaram o tratamento com EPE no dia 5 após ovulação, o número de ovulações (2,9) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que quando iniciado no dia 12 após ovulação (1,1). Após estes resultados, a maioria dos estudos subsequentes foi conduzida iniciando o tratamento 5 a 7 dias pós-ovulação (SQUIRES, 2006).

Em relação ao número de aplicações, Alvarenga *et al.* (2001) compararam uma e duas aplicações diárias de EPE. Nas éguas que receberam duas aplicações diárias, o número de ovulações e recuperação embrionária por égua (7,1 e 3,5) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) do que nas éguas com apenas uma aplicação diária (2,4 e 1,6). Ainda avaliando a frequência de administração na taxa de ovulação e recuperação embrionária Alonso *et al.* (2006) utilizaram 6mg duas vezes ao dia e 12mg uma vez ao dia nos tratamentos. No tratamento de 6mg duas vezes ao dia o número de ovulações por égua não apresentou diferença em relação ao seu controle, entretanto o número de embriões por égua aumentou significativamente. No tratamento com 12mg uma vez ao dia tanto o número de ovulações quanto o de embriões por égua aumentou

significativamente. Dessa forma, os autores concluíram que os dois tratamentos foram efetivos em aumentar a recuperação embrionária, porém a aplicação de 12mg uma vez ao dia foi superior, aumentando a taxa de ovulação.

## HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SUÍNO

Devido à ampla disponibilidade, vários estudos utilizando FSH suíno para indução de múltiplas ovulações em éguas. Em síntese, a administração dessa gonadotrofina duas vezes ao dia, durante a metade ou o final do diestro até o início do estro, forneceu resultados pouco satisfatórios no que diz respeito à taxa de ovulação por ciclo estral. Além de produzir uma resposta bem inferior a obtida na espécie bovina, trata-se de um método oneroso por requerer administração de doses elevadas sendo portanto, de aplicabilidade restrita (SQUIRES *et al* 1986).

Entretanto, Krekeler *et al.* (2006) demonstraram resultados promissores com relação a protocolos utilizando FSH de origem Porcina (FSHp). Neste estudo foram utilizados dois protocolos de superovulação com FSHp nas doses de 10 e 25 mg, IM, aplicadas duas vezes ao dia. As éguas tratadas obtiveram maior número de ovulações em comparação ao grupo dos animais não tratados. As doses de FSHp, 10 e 25 mg, aumentaram o número de ovulações por ciclo (2,2 e 2,28, respectivamente), sendo que um número menor de embriões por ciclo foi recuperado das éguas tratadas com 10 mg de FSHp (0,7) quando comparadas as tratadas com 25 mg (1,32). Entretanto, Mendes *et al.* (2008) não conseguiram repetir tais resultados. Estes autores não obtiveram ovulações múltiplas nem aumentaram satisfatoriamente o índice de recuperação embrionária, utilizando doses de 25mg e de 50mg, com a mesma frequência de aplicação.

## IMUNIZAÇÃO ANTIINIBINA

A secreção da inibina pelo folículo dominante do ovário suprime a secreção de FSH (GINTHER *et al.*, 2002). A imunoneutralização ativa ou passiva contra a inibina consiste na utilização de fragmentos sintéticos ou recombinantes da subunidade  $\alpha$ , que

promove o bloqueio do mecanismo de feedback negativo da liberação de FSH, permitindo dessa forma a elevação dos níveis de FSH endógeno durante a fase folicular. Assim, visando manter as concentrações de FSH elevada previne-se a atresia folicular e, conseqüentemente promove a obtenção de múltiplas ovulações, mas os resultados foram inconsistentes (MCCUE, 1996). Dois estudos relataram taxas de múltiplas ovulações (MCKINNON *et al.*, 1992; MCCUE *et al.* 1993), porém seu uso tem sido limitado em decorrência a relatos de choque anafilático e abscesso no sítio de administração, devido ao prolongado tempo de administração da droga, o qual é realizado em torno de duas ou mais semanas (SQUIRES *et al.*, 1999).

### EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE)

Os estudos iniciais utilizando EPE para indução de múltiplas ovulações foram conduzidos em éguas pôneis em Wisconsin durante o anestro e a estação de monta das éguas. Foram conduzidos por Douglas *et al.* (1979) que relataram média de 2,3 ovulações por égua administrando EPE sid (uma vez ao dia) durante 7 dias contra uma ovulação do grupo não tratado. Woods e Ginther (1983) reportaram média de 3,0 ovulações por égua em 112 éguas tratadas com EPE. Dessas éguas, 70 % obtiveram duas ou mais ovulações. Squires *et al.* (1987) reportaram 3,8 ovulações por égua tratada com EPE e 2,0 embriões recolhidos por égua.

Scoggin *et al.* (2002) administraram 25 mg de EPE sid (uma vez ao dia) ou bid (duas vezes ao dia), 50 mg sid e 12,5 mg bid. O maior (P=0,06) número de ovulações foi observado para éguas no grupo tratado com 25 mg bid (4,7 ± 0,6) comparado com aquelas no grupo de 25 mg sid (3,4 ± 0,6) e 12,5 mg (3,4 ± 0,8). No entanto, o número de embriões recolhidos por égua foi maior (P=0,04) para o grupo tratado com 12,5 mg (2,6 ± 0,6) comparado com as éguas do grupo de 25 mg sid (1,2 ± 0,4), do grupo controle (0,4 ± 0,2; P<0,1), e foi similar ao grupo de 25 mg bid (2,1 ± 0,6; P=0,01) e 50 mg (1,5 ± 0,3; P<0,1).

Sá *et al.* (2010) testaram 8,0 mg de EPE iniciado no D8 (duas vezes ao dia) até pelo menos dois folículos atingirem 35mm de diâmetro com intuito de conseguir ao menos um embrião recuperado por ciclo. Neste momento era feita a indução da ovulação com 1000UI de hCG (IV). Os autores verificaram que ocorreu diferença entre

as taxas de recuperação de embriões entre os grupos controle (83%, 5/6) e tratado (150%, 9/6), o que demonstrou que o EPE foi efetivo no aumento da taxa de recuperação de embriões por animal, conseguindo, assim, um embrião por ciclo estral.

Squires *et al.* (2003a) sumarizaram todos os estudos conduzidos na Universidade do Estado do Colorado utilizando EPE. De 170 éguas em que foi administrado no início do diestro, as médias de ovulação e recuperação embrionária foram 3,2 e 1,96, respectivamente. Enquanto para as 130 éguas não tratadas (controle), as médias foram 1,2 e 0,65, respectivamente. Analisando estes resultados, aproximadamente 70 a 90 % das éguas em que se administra EPE respondem à superovulação. Entretanto, é difícil repetir os resultados do tratamento com EPE devido às diferentes concentrações de FSH e LH contidas no extrato (McCUE, 1996; WELCH *et al.*, 2006).

## HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE EQUINO

Atualmente disponível no mercado, Niswender *et al.* (2003) afirmam que o eFSH tem apresentado bons resultados em induzir múltiplas ovulações. Os mesmos autores desenvolveram dois experimentos para avaliar a eficácia do eFSH como indutor de superovulação em éguas cíclicas. No primeiro experimento, avaliaram duas doses de eFSH: 12,5 mg bid mais Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) ou Deslorelin (ambos como indutores de ovulação) e 25 mg bid mais Deslorelin. Os grupos que receberam 12,5 mg de eFSH mais hCG e 25 mg de eFSH mais Deslorelin obtiveram maior ( $P=0,003$ ) número de ovulações ( $3,4 \pm 0,7$  e  $3,3 \pm 0,9$ , respectivamente) do que o controle ( $1,1 \pm 0,1$ ). Porém, o número de ovulações foi similar ( $P=0,3463$ ) entre os grupos que receberam 12,5 mg de eFSH mais Deslorelin ( $1,8 \pm 0,7$ ) e o grupo controle ( $1,1 \pm 0,1$ ). Já no segundo experimento, para avaliar recuperação embrionária, dividiram as éguas em 2 grupos, sendo o grupo 1 éguas controle e grupo 2 éguas tratadas com 12 mg de eFSH bid. A recuperação embrionária por égua foi maior no grupo tratado ( $1,9 \pm 0,3$ ) do que no grupo controle ( $0,5 \pm 0,1$ ). Além desse, diversos estudos vêm sendo conduzidos com éguas cíclicas para comprovar a eficácia do eFSH em estimular múltiplas ovulações. Squires *et al.* (2003b) usaram 12,5 mg de eFSH mais hCG para induzir ovulação, sendo que um ciclo foi utilizado como controle e estas mesmas éguas foram tratadas no ciclo seguinte. O número de ovulações no ciclo controle foi 1,0 por

égua e a recuperação embrionária foi de 0,5 embriões por égua. Já no ciclo tratado, as taxas de ovulação e recuperação embrionária foram de 3,9 e 1,9, respectivamente. Raz *et al.* (2006) também obtiveram maior ( $P=0,013$ ) taxa de ovulação ( $2,2 \pm 1,9$ ) para o grupo tratado com 12,5 mg de eFSH (uma ou duas vezes por dia) do que para o grupo controle ( $1,1 \pm 0,3$ ). A recuperação embrionária por ovulação foi 0,3 (11/35) para o grupo tratado e 0,6 (16/28) para o controle ( $P=0,072$ ). O número de embriões por égua foi similar entre os grupos tratado e controle ( $0,7 \pm 0,8$  e  $0,7 \pm 0,6$ , respectivamente). Logan *et al.* (2007) compararam duas doses de eFSH (12,5 e 6,25 mg) e dois agentes indutores de ovulação (hCG e Deslorelin). O número de folículos pré-ovulatórios foi maior ( $P < 0,05$ ) para éguas tratadas com 12,5 mg de eFSH ( $4,6 \pm 0,8$  folículos) do que para éguas tratadas com 6,25 mg de eFSH ( $2,2 \pm 0,2$  folículos; resultado combinado dos grupos em que se administrou hCG e Deslorelin). As taxas de ovulação foram  $5,2 \pm 0,8$ ;  $2,1 \pm 0,8$ ;  $2,4 \pm 0,8$  e  $2,1 \pm 0,8$  e as de recuperação embrionária foram  $1,6 \pm 0,4$ ;  $1,9 \pm 0,4$ ;  $1,1 \pm 0,4$ ;  $1,7 \pm 0,4$  para os grupos tratados com 12,5 mg de eFSH + hCG, 6,25 mg de eFSH + hCG, 12,5 mg de eFSH + Deslorelin e 6,25 mg de eFSH + Deslorelin, respectivamente. A taxa por coleta foi similar entre os grupos, mas a porcentagem de embriões por ovulação foi maior para as éguas tratadas com a menor dose de eFSH (90,4 % para hCG e 80,9 % para Deslorelin) do que para a maior dose (30,8 % para hCG e 45,8 para Deslorelin).

Em relação à viabilidade de embriões das éguas superovuladas, estudos iniciais de Woods e Ginther (1983) sugerem que embriões dessas éguas são menos viáveis que das não estimuladas. Entretanto, pesquisas mais recentes (SQUIRES; McCUE, 2007) encontraram taxa de gestação similar ao transferir embriões de éguas superovuladas e de ovulação simples.

## HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE EQUINO RECOMBINANTE

Outro produto que foi utilizado posteriormente foi o FSH-re. Este tem como vantagem sobre o EPE ser um produto puro e sintético, sem as proteínas contaminantes encontradas no composto de pituitária. Niswender *et al.* (2008) afirmaram que FSH-re pode ser usado para estimular o desenvolvimento folicular em éguas cíclicas. Entretanto,

posteriormente, Jennings *et al.* (2009) não demonstraram aumento significativo no número de ovulações. Possivelmente devido à falhas na ovulação no grupo tratado devido à estimulação deficiente do LH-re que foi empregado como agente indutor de ovulação. Em relação à recuperação embrionária de éguas superovuladas através do uso de FSH-re e LH-re, Meyers-Brown *et al.* (2010) observaram melhor resposta no grupo tratado ( $3,9 \pm 0,87$ ) do que no controle ( $2,0 \pm 0,53$ ), mas a taxa de embriões por ovulação foi similar entre os grupos. Estes autores concluíram que o FSH-re com a adição do LH-re foi eficaz no aumento no número de embriões recuperados.

### ACETATO DE DESLORELINA (ANÁLOGO DE GNRH)

Estudo mais recente descreveu a indução de dupla ovulação utilizando o Acetato de Deslorelina, um análogo sintético do GnRH. Nagao *et al.* (2012) obtiveram 82% (46/56) de duplas ovulações por ciclo nas éguas tratadas. Neste experimento, o tratamento consistiu de aplicações de 100 µg de Acetato de Deslorelina a cada 12 horas, iniciando as aplicações quando os dois maiores folículos da onda folicular encontravam-se entre 20 e 25 mm de diâmetro, com interrupção do tratamento quando detectado um diâmetro  $\geq$  33 mm nos dois folículos, quando então a ovulação era induzida com hCG. A taxa de recuperação de embriões por ovulação não apresentou diferença significativa entre éguas tratadas e controle (57% vs 61%), mostrando que duas ovulações, uni ou bilateral, não afetaram esta variável.

## Considerações Finais

A partir da presente revisão de literatura foi possível observar que os tratamentos hormonais visando a estimulação ovariana em equinos ainda “esbarram” em limitações anatômicas e fisiológicas específicas, levando o animal a apresentar resposta ovariana e embrionária aquém do desejado, diferentemente de outras espécies. Ou seja, quanto maior for o estímulo hormonal exógeno, menor a resposta embrionária obtida, provavelmente por conta de sua fossa ovulatória apresentar-se obstruída após inúmeras ovulações ou dificuldade no momento da captação do oócito liberado.

Sendo assim, os trabalhos mais recentes envolvendo a estimulação hormonal do ovário equino seguem a tendência em reduzir a dose hormonal a ser utilizada, almejando obter duas ou três ovulações e, conseqüentemente, número próximo de embriões recuperados. Neste caso, o termo “superovulação” poderia até mesmo não ser adequadamente aplicado à esta espécie, sendo indução de dupla ou tripla ovulações o mais indicado. Até mesmo a estimulação ovariana exacerbada visando à obtenção de oócitos através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia se torna prejudicial devido à dificuldade em manipular o ovário com tamanho muito aumentado.

O recurso hormonal para indução de dupla ou tripla ovulações pode representar grande avanço no programa comercial de reprodução assistida, seja para obtenção de embriões ou oócitos para serem transferidos imediatamente ou armazenados para uso posterior. Entretanto, a busca nas éguas tratadas pela recuperação embrionária por foliculo ovulado estatisticamente maior que no grupo das éguas controle ainda persiste, mesmo com todos os avanços que ocorreram nos últimos 30 anos de pesquisas que concernem ao tema.

## Referências

ALONSO, M. A.; FLEURY, P. D. C.; NEVES NETO, J. R.; MACHADO, M.S. Efeito da idade de égua doadora na taxa de perda embrionária. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, suplemento 1, p. 204, 2005.

ALVARENGA, M. A.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J.; NEVES NETO, J. R.; SQUIRES, E. L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*, v. 56, p. 879–887, 2001.

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

AZEVEDO, M. V.; SOUZA, N. M.; FERREIRA-SILVA, J. C.; BATISTA, I. O.; MOURA, M. T.; OLIVEIRA, M. A.; LIMA, P. F. Induction of multiple ovulations

in mares using low doses of GnRH agonist Deslorelin Acetate at 48 hours after luteolysis. **Pferdeheilkunde**, v. 31, p. 160-164, 2015.

CARMO, M.T.; LOSINNO, L.; AQUILAR, J.J.; ARAÚJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p. 337-339, 2006.

CULLINGFORD, E. L.; SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; SEIDEL, G. E. Attempts at superovulation of mares with porcine follicle stimulating hormone and recombinant equine follicle stimulating hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.6, p.305-309, 2010.

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

DONADEU, F.X.; GINTHER, O. J. Effect of number and diameter of follicles on secretion of inhibit and suppression of FSH in mares. **Reproduction**, v. 121, p. 897-903, 2001.

DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Supression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1423 – 1434, 2003.

DOUGLAS, R. H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, v. 11 (1), p. 33-46, 1979.

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

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

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

GIMENES, A.M.; IGNÁCIO, F.S.; BOFF, A.L.N.; BERGFELT, D.R.; MEIRA, C. Enhanced ovarian response to low-dose treatment with equine pituitary Extract in mares. **Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society**, v.22, p.410, 2010.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**. Ed. Equiservices, 2. ed. Wisconsin, EUA, 178 p., 1992.

GINTHER, O.J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.18-25, 1993.

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

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

GINTHER, O.J.; MEIRA, C.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, n.67, p. 862-867, 2002.

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

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

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL M. O.; BEG M. A. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 454-460. 2008.

JACOB, J.C.F.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 248-254, 2009.

JACOB, J.C.F. **Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades**. Viçosa. 2009. 62 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

JENNINGS, M.W.; BOIME, I. B; DAPHNA-IKEN, D.; JABLONKA-SHARIFF, A.; CONLEY, A.J. ; COLGIN, M.; BIDSTRUP, L.A.; MEYERS-BROWN, G.A.; FAMULA, T.R.; ROSER J.F. The efficacy of recombinante equine follicle stimulanting hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 3, p. 291-307 2009.

KREKELER, N.; HOLLINSHEAD, F.K.; FORTIER, L.A.; VOLKMANN, D.H. Improved ovulation and embryo recovery rates in mares treated with porcine FSH. **Theriogenology**, v. 66, p.663-687, 2006.

LOGAN, N.L.; McCUE, P. M.; ALONSO, M. A.; SQUIRES, E. L Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 48–55, 2007.

McCUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASHLEY, B.L. Effect on ovulation rate of possive immunization of mares against inhibin. **Equine Veterinary Journal**, v.15 (suppl), p.103-106, 1993.

McCUE, P.M. Superovulation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12 (1), p. 1-11, 1996.

McCUE, P.M.; PATTEN, M.; DENNISTON, D.; BRUEMMER, J. E. SQUIRES, E. L. Strategies for using eFSH for superovulating mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n.2, 2008.

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

MENDES, D., IGNÁCIO, F.S., BERGFELT, D.R., OLIVEIRA, J.V., CARVALHO, R.L., MEIRA, C. Resposta ovulatoria e recuperação embrionária em éguas brasileiro de hipismo submetidas a tratamentos com FSHp ou EPE. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, p.586, 2008.

MEYERS-BROWN, G.A.; MCCUE, P.M.; NISWENDER, K.D.; SQUIRES, E.L.; DELUCA, C.A.; BIDSTRUP, L.A.; COLGIN, M.; FAMULA, T.R.; ROSER, J.F. Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone: ovulation rates, embryo retrieval, and hormone profiles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n.10, p. 560-568, 2010.

NAGAO, J.F.; NEVES NETOB, J.R.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; FREITAS-DELL'AQUAA, C.P.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69–73, 2012.

NISWENDER, K. D.; ALVARENGA, M. A.; McCUE, P. M.; HARDY, Q. P.; SQUIRES, E. L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, n. 11, p. 497-500, 2003.

NISWENDER, K.D.; JENNINGS, M., BOIME, I., COLGIN, M., ROSER, J.F. In vivo activity of recombinant equine follicle stimulating hormone in cycling mares. 7<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer. **Abstract Book.**, p. 61, 2008.

RAZ, T.; GRAY, A.; HUNTER, B.; CARD, C. Effect of equine follicle stimulating hormone (eFSH) on pregnancy rate and embryo development in mares. In: 5<sup>th</sup> International Symposium of Equine Reproduction, 2006, Kerkrade, Holanda. **Proceedings...**, p. 400 – 403, 2006.

SÁ, M.A.F.; SANTOS, G.O.; MORENO, M.P.; ALVARENGA, M.A.; JACOB, J.C.F. Efficiency of low dose of equine pituitary extract on the rates of embryo recovery. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p. 711, 2010.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. Current therapy in equine reproduction. Ed. Saunders Elsevier, 2<sup>a</sup> edição, St. Louis, Missouri, 492 p., 2007.

SCOGGIN, C. F.; MEIRA, C.; McCUE, P. M.; CARNEVALE, E. M.; NETT, T. M.; SQUIRES, E. L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology** v. 58, p. 151–164, 2002.

SPICER, L. J.; SANTIAGO, C. A.; DAVIDSON, T. R.; BRIDGES, T. S.; CHAMBERLAIN, C. S. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p. 573 – 581, 2005.

SQUIRES, E.L., GARCIA, R.H., GINTHER, O.J., VOSS, J.L., SEIDEL Jr.G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**. v.26, n.5, p.661-70, 1986.

SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; CARNEVALE, E. M.; MORRIS, R. P.; NETT, T. M. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 35, p. 399–403, 1987.

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

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151–170, 2003 (a).

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P.; NISWENDER, K.; ALVARENGA, M. A review on the use of eFSH to enhance reproduction performance. In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2003, New Orleans, Louisiana, **Proceedings...** Internet Publisher: International Veterinary Information Service. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org), Ithaca, New York, USA, Acesso em: 30 ago. 2008, p. 1 – 3, 2003 (b).

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; HUDSON, J. Advances in equine superovulation. In: 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Rio de Janeiro, 2004, **Proceedings...**, Havemeyer Foundation Monograph Series, n. 14, p.71–74, 2004.

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

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

WELCH, S.A.; BRUEMMER, J.E. Exogenous eFSH, Follicle Coasting, and hCG as a novel superovulation regimen in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, p.262-270, 2006.

WITT, M.C. **Investigations on genital blood flow and embryo recovery after superovulation with eFSH® and on laparoscopic techniques for flushing the oviduct in the mare.** Hannover. 2013. 106f. Tese (Doutorado) - University of Veterinary Medicine Hannover, 2013.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, v. 20, p. 347–355, 1983.