

## EFEITO DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA NA RESPOSTA OVARIANA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE ÉGUAS IDOSAS EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Bruno Fritzsos Bonin<sup>1</sup>  
José Antonio Dell'Aqua Júnior<sup>2</sup>  
Eduardo Gorzoni Fioratti<sup>1</sup>  
Marco Antonio Alvarenga<sup>3</sup>

### RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos de doses baixas do extrato de pituitária equina (EPE) no crescimento folicular, taxa de ovulação e de recuperação embrionária em éguas idosas. Doadoras de embrião (n=20) da raça Quarto de Milha de um programa comercial com idade de 15 a 20 anos de idade, foram utilizadas em 3 ciclos consecutivos. O primeiro e o terceiro ciclo foi utilizado como grupo controle e entre eles o grupo tratado com EPE no segundo ciclo. Durante os três ciclos as éguas foram inseminadas com sêmen a fresco ou refrigerado do mesmo garanhão. A coleta de embrião foi realizada no dia 8 pós ovulação seguida de administração de PG. No ciclo tratado, injeções de EPE (7mg/IM/duas vezes ao dia) se iniciaram no dia 8 após a ovulação até que um folículo pré-ovulatório fosse observado. A porcentagem de éguas com mais de uma ovulação foi comparada pelo teste de Fisher e a média do número de ovulações e embriões, assim como o diâmetro folicular, entre os ciclos foram comparados usando ANOVA. A porcentagem de éguas com mais de uma ovulação e o número de ovulações foram maiores ( $p<0,05$ ) no ciclo tratado com EPE (65% das éguas e 1,8 ovulações) do que o grupo controle antes (5% e 1,0) e depois do tratamento (5% e 1,0). O número de embriões recuperados por ciclo também foi maior ( $p<0,05$ ) no grupo tratado com EPE (1,0/ciclo) comparado com os ciclos controle (0,42/ciclo). Entretanto a taxa de embrião recuperado por ovulação foi similar ( $p>0,05$ ) entre os grupos controles (0,4 embrião/ovulação) e o ciclo tratado (0,6 embrião/ovulação). A taxa de gestação dos embriões transferidos foi similar entre o grupo tratado (14/20-70%) e o não tratado (9/17 -55%). O tratamento com EPE possibilitou a recuperação de embriões com estágio de desenvolvimento mais compatíveis ao estágio embrionário. Baseado nos resultados do presente experimento, concluímos que o tratamento com EPE foi capaz de aumentar a eficiência reprodutiva de éguas idosas doadoras de embrião, recuperando ao menos um embrião por ciclo.

**Palavras-chave:** égua idosa, ovulações múltiplas, extrato de pituitária equina, transferência de embriões

<sup>1</sup> Mestrando – Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, (14) 38116249

<sup>2</sup> Prof. Colaborador do programa de pós graduação - Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, dellaquajunior@uol.com.br, (14) 38116249

<sup>3</sup> Prof. Adjunto – Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, marco.alvarenga@terra.com.br, (14) 38116249

## EFFECT OF EQUINE PITUITARY TREATMENT ON OVARIAN RESPONSE AND REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF OLD MARES IN A EMBRYO TRANSFER PROGRAM

### ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of the use of low doses of equine pituitary extract (EPE) on follicular growth, ovulation rate and embryo recovery rates in old mares. Embryo donors (n=20) of Quarter Horse breed from a commercial embryo center aging 15 to 20 years old, were used during 3 consecutive cycles. The first and third cycles were used as control being the EPE treatment performed on the second cycle. During the 3 estrus mares were inseminated with cooled or fresh semen from the same stallion. The embryo flushing's were performed on day 8 post-ovulation and were always followed by administration of PG. On the treated cycle, EPE injections (7mg twice daily i.m.) were started on day 8 after ovulation until a pre-ovulatory follicle was observed. The percentage of mares with more than one ovulation was compared by means using Fischer's test and the mean number of ovulations and embryos, as well as follicular diameters, between cycles were compared using Student's *t* test. The percentage of mares with more than one ovulation and number of ovulations were higher ( $p < 0.05$ ) in the EPE-treated cycle (65% of mares and 1.8 ovulations) than in the control cycle before (5% and 1.0) and after treatment (5% and 1.0). Also the mean number of embryos recovered per cycle were higher ( $p < 0.05$ ) on EPE treated cycle (1.0/cycle) than in no treated cycles (0.42/cycle). However the embryo rate per ovulation was similar ( $p > 0.05$ ) between no treated cycles (0.4 embryo/ovulation) and treated cycle (0.6 embryo/ovulation). The treatment with EPE allowed the recovery of embryos in stage of development more compatible with the embryonic age. The pregnancy rates of the transferred embryos was also similar between embryos recovered or treated (14/20-70%) and non treated cycles (9/17 -55%). Based on the results of the present experiment we can concluded that EPE treatment was able to increase the reproductive efficiency of old embryo donor mares, providing the recovery of at least one embryo on average per cycle.

**Key words:** old mare, multiple ovulations, equine pituitary extract, embryo transfer.

## EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE PITUITARIA EQUINA EN LA RESPUESTA DEL OVARIO Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE YEGUAS VIEJAS DONADORAS DE EMBRIONES

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del uso de bajas dosis de extracto de pituitaria equina (EPE) en el crecimiento folicular, la tasa de ovulación y la tasa de recuperación de embriones en yeguas de edad. Hemos utilizado 20 yeguas donantes cuarto de milla de edades comprendidas entre 15 y 20 años, por tres ciclos consecutivos. Los ciclos primero y tercero fueron utilizados como ciclo control del tratado con EPE (ciclo segundo). En los tres períodos de celo, las yeguas fueron inseminadas con semen fresco o refrigerado del mismo semental. El lavado del útero para la recuperación de embriones se hizo el día 8 después de la ovulación. En el ciclo tratado, la administración del EPE (7 mg/IM dos veces al día) se inició en el octavo día después de la ovulación y se realizó hasta la observación del folículo que se va a ovular. El porcentaje de yeguas con más de una ovulación se comparó con el "test de Fischer", y la media de ovulaciones, los embriones y los diámetros foliculares entre los ciclos se compararon mediante análisis de varianza seguido del test de tuckey. El porcentaje de

yeguas con más de una ovulación y la cantidad de ovulaciones fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el grupo tratado con EPE (65% de las yeguas y 1,8 ovulaciones) que en el ciclo control antes del tratamiento (5% y 1,0) y después del tratamiento (5% y 1,0). La cantidad de embriones que se han recuperado por ciclo también fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el ciclo tratado con EPE (1,0 embriones/ciclo) que en los ciclos no tratados (0,42 embriones/ciclo). Sin embargo, la tasa de embriones por la ovulación fue similar ( $p > 0,05$ ) entre los ciclos sin tratamiento (0,4 embrion/ovulación) y el ciclo tratado (0,6 embrion/ovulación). La tasa de embarazo de embriones transferidos fue similar entre los embriones recuperados del ciclo con tratamiento (14/20-70%) y del ciclo sin tratamiento (9/17-55%). Con estos resultados se puede concluir que el tratamiento con EPE es capaz de mejorar la eficiencia reproductiva de las yeguas viejas donantes de embriones, y que proporciona una recuperación de al menos un embrión por cada ciclo.

**Palabras-clave:** yegua vieja, ovulaciones múltiples, extracto de pituitaria equina, transferencia de embriones

## INTRODUÇÃO

Em equinos as fêmeas obtêm seu maior valor econômico quando sua progênie se destaca, isto ocorre na égua quando passada sua vida média reprodutiva, coincidindo com a diminuição dos índices de fertilidade, a partir de 15 anos de idade (1). Essas reprodutoras com idade avançada representam de 10 a 25% das éguas que estão em programa de reprodução. Alguns índices reprodutivos diferem entre éguas velhas e jovens quanto a prenhez/ciclo (32 e 65%), nascimentos (54 e 82%) e perda embrionária (29 e 7%). A morte embrionária precoce pode alcançar 62% em éguas velhas, com mais de 15 anos e chegar a somente 11% naquelas com idade entre 5 e 7 anos (2). Esta diminuição da eficiência reprodutiva pode estar relacionada a disfunções neuro-endócrinas, perda gestacional ou uma combinação delas (3).

A disfunção ovariana pode ser responsabilizada pela queda da eficiência reprodutiva em éguas idosas. Os níveis séricos do FSH e a atividade folicular durante a fase luteal são maiores em éguas de 15 a 19 anos do que naquelas com mais de 20 anos ou com 5 a 7 anos (4). Elevadas concentrações de FSH, sem concomitantes alterações na concentração de LH, aparentam ser os sinais iniciais de alteração da reprodução em éguas. Este aumento de FSH poderia estimular uma maior proporção de folículos primordiais a entrar neste grande *pool* de folículos e, por consequência, acelerar a depressão da reserva de folículos primordiais (5).

De modo geral, o declínio reprodutivo que ocorre nas éguas mais velhas (acima de 20 anos) está relacionado com uma sequência de eventos que se somam para provocar uma falência reprodutiva generalizada. Somando-se uma prolongada fase folicular, menor número de folículos, menor taxa de crescimento do folículo ovulatório com uma ovulação deficiente o resultado pode ser uma inatividade folicular ou alterações na maturação do oócito (4). Esses eventos inviabilizam o processo reprodutivo, uma vez que, a qualidade do oócito é o fator primário que afeta a performance reprodutiva nessas éguas idosas (6).

A fêmea equina é monovular e a possibilidade de se incrementar o número de ovulações no ciclo estral traz consigo potenciais benefícios como o aumento no número de oócitos disponíveis para aplicação de diferentes técnicas de reprodução assistida e aumento no número de embriões recuperados em uma única colheita, com consequente redução dos custos do programa de transferência de embriões (7).

A ocorrência de ovulações duplas espontâneas em éguas é um fator que incrementa a recuperação de embriões. Pesquisas têm se dedicado ao estudo dos fatores responsáveis pela baixa recuperação embrionária em éguas superovuladas e ao desenvolvimento de protocolos que driblem esses fatores, que produzam menos efeitos adversos e promovam estimulação

moderada e não excessiva dos ovários (8). Dessa forma, Farinasso (9) e Alvarenga et al (8) utilizaram doses de EPE mais baixas do que as utilizadas para superovulação e obtiveram aumento no número médio de ovulações, provocado pela maior incidência de ovulações duplas e triplas, e de embriões recuperados em éguas.

Os referidos trabalhos nos motivaram a investigar a aplicabilidade de baixa dose de EPE para incrementar o número de ovulações e embriões recuperados em éguas, partindo da hipótese de que a aplicação exógena de EPE poderia atuar benéficamente aumentando o número de ovulações por ciclo, bem como melhorando a maturação folicular e oocitária por levar a um aumento dos níveis séricos de LH.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e manejo geral

O trabalho foi realizado em duas estações reprodutivas 2006/2007 e 2007/2008 entre os meses de setembro a janeiro na Central de Reprodução de Equinos Guilherme Gregolin Services Center Inc., no município de Tatuí, São Paulo, Brasil. Foram utilizadas 20 éguas Quarto de Milha, doadoras de embrião, em atividade reprodutiva com idade entre 15 e 20 anos (média de 16,9 anos) e peso de 450 a 550 Kg. Essas éguas eram mantidas em piquetes de capim “coast cross” (*Cynodon dactylon*) e capim-transvala (*Digitaria decumbens*) com acesso a água e sal mineral à vontade e 4 kg de ração comercial para equinos contendo 12% de proteína duas vezes/dia.

### Controle do ciclo estral e tratamentos

Após terem sido monitoradas e inseminadas durante o estro imediatamente anterior ao início do experimento, as éguas doadoras foram submetidas ao procedimento de colheita de embrião no oitavo dia pós-ovulação. Nesse mesmo dia receberam, por via intramuscular, 7,5 mg de dinoprost-trometamina (Lutalyse, Pfizer, São Paulo, Brasil) e foram incluídas no grupo experimental. Três ciclos estrais consecutivos foram monitorados nas éguas pertencentes ao grupo experimental, o primeiro (G1) e o terceiro (G3) ciclo estudados serviram de controle e no segundo ciclo (G2) foi realizado o tratamento com EPE, dessa forma, cada animal utilizado foi seu próprio controle.

No segundo dia após aplicação do luteolítico as éguas doadoras de embrião pertencentes ao experimento tiveram sua atividade ovariana e condição uterina monitoradas diariamente por ultrassonografia transretal com aparelho equipado com transdutor linear de 6 e 8 MHz (Pie-Medical 485, Holanda). Os diâmetros dos maiores folículos foram determinados por meio da média aritmética das duas maiores distâncias transversais do antro folicular em uma única imagem congelada no monitor do aparelho de ultrassonografia (10).

Os folículos foram mensurados, os ovários foram mapeados identificando a posição de cada folículo, sendo usado como referência a posição do corpo lúteo ou de outros folículos a fim de se manter a identidade dos dois maiores folículos encontrados. Quando era observado mais de um folículo dominante foi feita à média entre eles para comparações futuras.

Os animais pertencentes ao Grupo EPE (n=20) receberam 7,0 mg de extrato de pituitária equina por via intramuscular duas vezes ao dia (entre 7 e 8 horas da manhã e uma segunda aplicação entre 17 e 18 horas). O extrato de pituitária utilizado no presente trabalho foi produzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp-Botucatu, SP, Brasil, conforme descrito por Guillou e Combarous (11). As hipófises para preparação do Extrato de Pituitária Equino foram obtidas no frigorífico de Equinos Miramar, localizado na cidade de Pelotas, RS.

## Inseminação Artificial, Coleta e Transferência dos Embriões

Um único garanhão de fertilidade comprovada foi utilizado como doador de sêmen. As colheitas eram realizadas em vagina artificial e com auxílio de uma égua em cio devidamente contida; o sêmen era filtrado para a remoção da fração gelatinosa e possíveis contaminantes. A concentração espermática era determinada em câmara de Neubauer e a motilidade espermática avaliada em microscópio óptico, o sêmen era então diluído em meio diluente à base de leite desnatado Botu-sêmen<sup>®</sup> (Biotech Botucatu - Botucatu - SP).

Durante o estro, após a detecção de pelo menos um folículo com 35 milímetros (mm) de diâmetro, as éguas eram inseminadas com no mínimo  $1 \times 10^9$  espermatozoides móveis. As inseminações foram refeitas após 48 horas caso não fosse detectada a ovulação. Quando ocorreu o desenvolvimento de mais de um folículo pré-ovulatório as inseminações foram realizadas no máximo até 24 horas após a primeira ovulação. As ovulações foram induzidas por meio da administração de 1 mL de Deslorelina intramuscular, mediante a detecção de pelo menos um folículo ovariano com 35 a 40 mm de diâmetro. Vale ressaltar que os protocolos de inseminação artificial e indução das ovulações foram os mesmos para os ciclos controle e tratado.

Passado o ciclo controle e finalizada a colheita e a avaliação do embrião no oitavo dia pós-ovulação, era iniciado o tratamento para indução de ovulações múltiplas com EPE. Esse protocolo de tratamento foi administrado a partir do dia 8 até o dia anterior à indução das ovulações com a administração de 1 mL de Deslorelina.

No oitavo dia após a ovulação, por meio de lavagem uterina utilizando 3 litros de solução de Ringer com lactato a 35°C, conforme descrito por Alvarenga et al. (12), os embriões foram recuperados.

Os embriões foram transferidos através do método não-cirúrgico (transcervical) para receptoras ciclantes que haviam ovulado entre 5 e 8 dias anteriores ao dia da transferência. No período entre quatro e seis dias após a transferência dos embriões, as receptoras eram examinadas por ultrassonografia transretal no intuito de se detectar a presença ou ausência da vesícula embrionária.

### Análise Estatística

Valores percentuais para variáveis qualitativas foram comparados pelo teste de Fischer. Variáveis quantitativas (número de ovulações, embriões por ciclo, duração da fase folicular e crescimento médio diário do folículo dominante) foram comparadas pela análise de variância (ANOVA). Uma probabilidade de  $p < 0,05$  indicou diferença significativa.

## RESULTADOS

O percentual de éguas com múltiplas ovulações no ciclo pré-tratamento (G1), ciclo tratado com EPE (G2) e ciclo pós-tratamento (G3) foi de 5% (1/20), 65% (13/20) e 5% (1/20), respectivamente ( $p < 0,05$ ). Em nenhum dos ciclos foi observado falha da ovulação ou mesmo desenvolvimento de folículos hemorrágicos. Nos ciclos com mais de uma ovulação, o intervalo inter ovulatório variou de 24 a 48 horas.

O tratamento com baixa dose de EPE resultou em maior número de ovulações e embriões por ciclo ( $p < 0,05$ ) em comparação aos ciclos controle pré e pós tratamento. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no número de ovulações entre os grupos controle. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas quando comparado o número de embriões recuperados por ovulação entre G1, G2 e G3 ( $p > 0,05$ ). O

número de ovulações por égua foi significativamente superior nos ciclos tratados com EPE quando comparados ao obtido nos grupos G1 e G3. O tratamento com EPE também resultou em maior número de embriões recuperados por égua por ciclo ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Os grupos G1 e G3 alcançaram taxas de 60% (12/20) de lavados negativos e para o grupo tratado com EPE essa taxa de embriões não recuperados permaneceu em 30% (06/20), esse fato indica uma possível tendência de significância do grupo tratado com EPE em relação aos grupos controle ( $p = 0,11$ ). Quando agrupamos os grupos controle (G1 + G2) em comparação ao grupo tratado com EPE (G1) obtivemos uma diferença significativa de lavados negativos ( $p < 0,05$ ) dos grupos controle 60% (24/40) contra 30% (6/20) do grupo tratado.

O tratamento com baixa dose de EPE resultou em encurtamento da fase folicular (diminuição do número de dias) da aplicação da prostaglandina (D8) até um dia antes da ovulação ( $p < 0,05$ ) diferindo do ciclo controle pós-tratamento (G3). Mas não houve diferença significativa entre o grupo tratado (G2) e o grupo pré-tratamento (G1). Tendo sido o tempo em dias médio de  $10,2 \pm 1,7$ ;  $9,4 \pm 1,9$ ;  $10,9 \pm 1,4$  para G1, G2 e G3 respectivamente.

Não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) quanto ao crescimento folicular médio, em milímetros, do folículo dominante do dia D10 até o momento da ovulação do ciclo subsequente nos diferentes grupos. Os valores médios de crescimento folicular nesse período para os grupos G1, G2 e G3 foram de  $19,7 \pm 6,3$ ;  $21,4 \pm 5,4$  e  $22,9 \pm 4,5$ , respectivamente. A taxa média de crescimento folicular diário foi de  $2,5 \pm 0,7$ ;  $2,8 \pm 0,6$  e  $2,6 \pm 0,4$  nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente. Em 40 % (8/20) dos ciclos tratados com EPE e 15 % (6/40) dos ciclos não tratados observou-se crescimento folicular médio diário  $\geq$  a 3mm ( $p < 0,05$ ).

O tratamento com baixa dose de EPE resultou em maior número de embriões recuperados no lavado uterino ( $p < 0,001$ ) oito dias após a ovulação com grau de desenvolvimento condizente com idade gestacional na época da coleta (blastocistos ou blastocistos expandidos) ou mórulas e blastocistos iniciais em D6, provenientes de ovulações assíncronas nas éguas com múltiplas ovulações. Por outro lado não foram observadas diferenças significativas no grau de desenvolvimento dos embriões recuperados entre os grupos controle. Tendo sido 100 % condizentes no grupo tratado e contra 40% em média nos dois grupos controle.

No tratamento com baixa dose de EPE (G2) foram observadas maiores taxas de prenhez (70%) quando comparado aos grupos controle no pré-tratamento (G1) e pós-tratamento (G3), 55,5% e 50%, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Foi também detectada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada à eficiência do programa (taxa de recuperação embrionária x taxa de prenhez) entre ciclos tratados e ciclos não tratados. Tendo sido de 21,8 % (42% x 52%) para os grupos controle e de 70% (100% x 70%) para o grupo tratado.

A taxa de morte embrionária precoce nas éguas tratadas com EPE (G2) foi de 7,1% (01/14), não diferenciando ( $P > 0,05$ ) dos grupos controle que foi de 20% (01/05) no G1 e 0% (0/04) no G3.

## DISCUSSÃO

O tratamento com EPE foi capaz de estimular com eficiência a atividade ovariana em éguas idosas cíclicas, onde o percentual delas com múltiplas ovulações no ciclo tratado com EPE (G2) foi de 65% (13/20) enquanto os grupos controles, no pré e pós-tratamento, foram de 5% (1/20). Valores diferentes e mais altos são relatados, Farinasso (9) descreve uma porcentagem de 76,9% de múltiplas ovulações utilizando doses de 4 e 6 mg de EPE em éguas ciclantes, porém valores mais baixos foram encontrados, como os de 30,8% de Rocha Filho

(13). Em nenhum dos ciclos dos grupos controle ou grupo tratado foi observado falha da ovulação ou mesmo desenvolvimento de folículos hemorrágicos, o que seria esperado, segundo alguns autores, tanto para éguas superovuladas (14, 15) como para as éguas idosas.

No presente trabalho obtivemos em média 1,0 (G2) embrião por ciclo, média superior aos grupos controle que tiveram 0,45 (G1) e 0,4 (G3) embrião por ciclo. A média do grupo tratado foi muito próxima ao obtido por Carmo (16), que com seu protocolo de superovulação em éguas, 25 mg de EPE duas vezes ao dia, obteve em média 1,1 embrião por ciclo. Porém, este autor obteve uma taxa de recuperação embrionária por ovulação mais baixa que a do presente experimento (30%). Outros trabalhos com múltiplas ovulações relatam a recuperação de 1 a 2 embriões por ciclo (9, 17, 18). Considerando à média de recuperação embrionária do grupo controle (0,45 e 0,4) pode-se verificar que estas foram menores que as médias esperadas (0,6 embriões/ciclo) em programas de transferência de embriões segundo Alvarenga et al. (8) e (0,7 embriões/ciclo) Hunt et al. (19) em éguas de 15 a 19 anos e similares às reportadas por Vogelsang e Vogelsang (20) que obtiveram 51% de recuperação embrionária em éguas de 9 a 17 anos, contudo superior às relatadas por Fleury et al. (21), relatando uma taxa de 24,1 % em éguas com mais de 18 anos.

Analisando o número de embriões recuperados por ovulação obtivemos 0,4 (40%) nos grupos controle e 0,6 (60%) no grupo tratado, o que não diferiu significativamente. Estes dados são similares aos descritos por Woods e Ginther (17) que após tratamento com EPE obtiveram taxa de 0,6 embrião por ovulação, mas são taxas superiores quando comparados aos trabalhos de Alvarenga (22) com 49%, Scooggin et al. (23) com 43,2%, Carmo (16) com 30,2% e Machado et al. (24) com 26%. Dessa forma, os dados obtidos são corroborados pelos achados de Carmo et al. (25) que observaram ser maior a taxa de recuperação por ovulação em éguas com menos de 3 ovulações por ciclo.

Comparando os lavados que não recuperaram embriões, ao agruparmos os grupos controle (G1 + G3) em comparação ao grupo tratado com EPE (G2) obtivemos 60% (24/40) de lavados negativos nos grupos controle contra 30% (6/20) no grupo tratado, assim diferindo estatisticamente. As éguas do grupo tratado tiveram uma taxa de lavados negativos similares ao reportado na literatura para éguas não superovuladas e reprodutivamente normais e inferiores as apresentadas por Farinasso (9) que obteve 45% de lavados negativos.

A partir do décimo dia posterior a uma ovulação até um dia anterior a ovulação subsequente os valores médios de crescimento folicular desse período para os grupos G1, G2 e G3 foram de  $19,7 \pm 6,3$ ;  $21,4 \pm 5,4$  e  $22,9 \pm 4,5$  milímetros, respectivamente. Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas entre eles. Quando eram observados dois ou mais folículos o controle do crescimento era feito pela média entre eles. A taxa média de crescimento folicular diário foi de  $2,5 \pm 0,7$ ;  $2,8 \pm 0,6$  e  $2,6 \pm 0,4$  milímetros nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente. Outras pesquisas com múltiplas ovulações encontraram taxa de crescimento folicular diário de 2,1mm/dia por Palmer (26) e 2,25mm/dia relatado por Ginther (27) em éguas não tratadas com EPE.

Quando analisadas individualmente, foi observado no grupo tratado com EPE um maior percentual de éguas com folículos com taxa de crescimento igual ou maior a 3,0mm (40% x 15%). Jacob (28) observou que nos 4 dias anteriores a ovulação a taxa de crescimento do folículo dominante das éguas jovens se aproximou de 3,0mm/dia tendo sido superior as taxas de crescimento folicular observadas em éguas de meia idade (2,5mm/dia) e velhas (2,1 mm/dia).

Observamos que o tratamento com baixa dose de EPE resultou em maior número de embriões no oitavo dia após detecção da primeira ovulação e com grau de desenvolvimento compatível com idade gestacional em D8 (blastocistos ou blastocistos expandidos) ou mórulas e blastocistos iniciais em D6 nas ovulações assíncronicas naquelas éguas com múltiplas ovulações. A literatura revela que nas éguas idosas (>18 anos) existe um atraso no

mecanismo de transporte embrionário do oviduto ao útero. Um atraso no desenvolvimento de até 36 horas é esperado nos embriões de éguas velhas em relação aos embriões de éguas jovens (4). Este atraso no desenvolvimento embrionário pode ser consequência de defeitos intrínsecos nos embriões, meio de desenvolvimento pobre na tuba uterina e/ou útero e inseminação pós-ovulatória (27).

Rambags et al. (29), observaram que os embriões de éguas jovens (<12 anos) possuíam mais mitocôndrias do que seus oócitos, já nas éguas idosas (>15 anos) a quantidade de mitocôndrias não aumentou nos embriões quando comparado aos seus oócitos, indicando um atraso na replicação mitocondrial. Observamos no presente trabalho que em 58,8% dos embriões recuperados nos grupos controle estavam com desenvolvimento não condizente ao oitavo dia após a ovulação, ou seja, eram mórulas ou blastocistos iniciais. Entretanto ao tratar estas éguas com EPE este atraso não foi verificado em 100% dos embriões, sugerindo que o EPE teve efeito na maturação deste oócito e transporte mais rápido deste embrião ao útero.

A taxa de prenhez por ciclo dos embriões coletados foi de 25% (5/20) no G1, 70% (14/20) no grupo tratado com EPE (G2) e 20% (4/20) no G3. Se compararmos a taxa de prenhez por ciclo nas éguas idosas temos uma média de 32% de prenhez, um pouco acima do grupo controle mas muito inferior ao grupo tratado com EPE.

A taxa de prenhez por embrião nas éguas tratadas com EPE (G2) foi de 70 % (14/20), mostrou tendência ( $p=0.07$ ) em ser superior nos ciclos tratados diferenciando do grupo controle que foi de 55,5% no G1 e 50% no G3. Autores demonstraram que a taxa de prenhez de embriões de éguas de 15 a 19 anos foi de 54,2 % citado por Hunt et al. (20), 52 % em éguas 9 a 17 anos e 56% em éguas de 18 a 28 anos citado por Vogelsang e Vogelsang (20), 65% em éguas de 10 a 18 anos relatado por Carnevale et al. (30). Valores semelhantes foram encontrados no presente trabalho nos grupos controle G1 e G3 com idade de 15 a 20 anos. Os embriões com estágio mais lento de desenvolvimento, menores que o esperado e estágios iniciais de desenvolvimento no dia 7 ou 8 (D7 ou D8) resultam em taxas menores de prenhez após inovulação (4). Entretanto a taxa de prenhez (70%) por embrião no grupo tratado com EPE (G2) foi superior ou semelhante aos dados da literatura para doadoras jovens não tratadas que alcançaram 67,7 % em éguas de 2 a 9 anos (30), 65,4% nas éguas de 8 a 14 anos (19) e com a taxa média de prenhez em programas de transferência de embrião de 60% (8) e 70% (7).

A eficiência do programa, ou seja, a relação entre a taxa de prenhez e a taxa de recuperação embrionária foi superior nas éguas tratadas com EPE (70%) quando comparadas as não tratadas (21,8%), demonstrando que o uso do EPE em baixas doses beneficia altamente as éguas na faixa etária do presente experimento (15 a 20 anos).

No que diz respeito às taxas de perda embrionária precoce (até 50 dias) os resultados não diferiram entre os grupos. Reafirmando os achados de vários autores (21, 30) os quais observaram taxas similares de perda embrionária entre éguas idosas e jovens após TE para receptoras reprodutivamente saudáveis. Contudo contradizem os resultados de Carnevale et al. (30) que observaram uma taxa de perda embrionária de 20,5% em embriões de éguas idosas transferidos contra 13,3% em éguas jovens e Vogelsang e Vogelsang (20), 24% em éguas de 9 a 17 anos e 14 % em éguas de 2 a 8 anos.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente experimento permitem concluir que a administração de Extrato de Pituitária Equina em éguas idosas doadoras de embriões interferiu positivamente na dinâmica de crescimento do folículo dominante, aumentou a incidência de múltiplas ovulações, incrementou a taxa de recuperação embrionária por ciclo, propiciou a recuperação de embriões em fase correta de desenvolvimento e melhorou a eficiência



reprodutiva das doadoras tratadas. Dessa forma, surge uma alternativa para otimizar o processo reprodutivo dessas éguas. Contudo o uso em larga escala do EPE é limitado pelo reduzido número de matadouros de equinos bem como pelo elevado custo de produção.

## REFERÊNCIAS

1. Losinno LL, Aguilar JJ, Lisa H. The impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: Proceedings of 5<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer; 2000, Saari. Saari: Havemeyer Foundation; 2000. p.81. (Monograph Series n.3).
2. Carnevale EM, Ginther OJ. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*. 1992; 37:1101-15.
3. Ball BA. Reduce reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. In: Recent Advance in Equine Theriogenology; 2000, Ithaca. Ithaca: International Veterinary Information Service; 2000.
4. Carnevale EM, Bergfelt DR, Ginther OJ. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Anim Reprod Sci*. 1993; 31:287-99.
5. Richardson SJ, Senikas A, Nelson JE. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; 65:1231-7.
6. Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*. 2008; 69: 23-30.
7. Squires EL, Seidel Jr GE. Superovulation. In: Collection and transfer of equine embryos. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory; 1995. p.32-8. (Bulletin, 8).
8. Alvarenga MA, Carmo MT, Landim-Alvarenga FC. Superovulation in mares: limitations and perspectives. *Pferdeheilkunde*. 2008; 24:88-91.
9. Farinasso A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas [dissertação]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2004.
10. Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1995. (Book 2).
11. Guillou F, Combarous Y. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochim Biophys Acta*. 1983; 755: 229-36.
12. Alvarenga MA, Landim FC, Meira C. Modifications in the technique used to recover equine embryos. *Equine Vet J*. 1993; 15:111-2.
13. Rocha Filho NA, Pessoa NA, Gioso MM, Alvarenga MA. Uso de progesterona de longa ação na preparação de éguas não ciclantes como receptoras de embrião. *Acta Sci Vet*. 2004; 32(suppl):89.
14. Dippert KD, Jasko DJ, Seidel GE, Squires EL. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. *Theriogenology*. 1994; 41:1411-23.
15. Lapin DR, Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. *J Anim Sci*. 1977; 44:834-42.
16. Carmo MT. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
17. Woods GL, Ginther OJ. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. *Theriogenology*. 1984; 21:3.

18. McCue PM. Superovulation. In: Squires EL. The veterinary clinics of north america- equine practice: diagnostic techniques and assisted reproductive technology. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p.1-11.
19. Hunt C, Aguilar J, Spoleder C, Losinno L. The Effect of donor mare age on efficiency of a large scale embryo transfer programme. In: Annual Meeting of the European Society Embryo Transfer, 2005.
20. Volgelsang SG, Vogelsang MM. Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. In: Proceedings of 2<sup>nd</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer; 1989, Alberta. Alberta: Equine Embryo Transfer; 1989. p.73-4.
21. Fleury JJ, Costa Neto JBF, Alvarenga, MA. Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares in Brazil. In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer; 1989, Alberta. Alberta: Equine Embryo Transfer; 1989. p.73-4.
22. Alvarenga MA, MacCue PM, Bruemmer J, Neves Neto JR, Squires EL. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. Theriogenology. 2001; 56:879-87.
23. Scoggin CF, Meira C, MacCue PM, Carnevale EM, Nett TM, Squires EL. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. Theriogenology. 2002; 58:151-64.
24. Machado MS, Arantes M, Peres KR, Leão KM, Carmo MT, Squires EL, et al. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório, utilizando-se extrato de pituitária equina e FSH equino purificado. Rev Bras Reprod Anim. 2003; 27:506-8.
25. Carmo MT, Losinno L, Aquillar J, Araújo GHM, Alvarenga MA. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. Anim Reprod Sci. 2006; 94:337-9.
26. Palmer E, Hajmeli G, Duchamp G. Gonadotrophin treatments increase ovulation rate but not embryo production from mares. Equine Vet J. 1993; 15(Suppl):99-102.
27. Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2<sup>nd</sup> ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 1992.
28. Jacob JCF. Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades [tese]. Viçosa: Universidade Estadual de Viçosa, 2008.
29. Rambags BPB, VanToc HTA, Gaivão MMF, Wilshers S, Lazzari G, Galli L, et al. Mitochondrial numbers in equine embryos: effects of maternal age and in vitro production. Pferdeheilkunde. 2008; 24:118-20.
30. Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. Theriogenology. 2000; 54:965-79.

**Recebido em: 09/09/2009**

**Aceito em: 20/01/2010**