

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

DISSERTAÇÃO

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS DURANTE O PERÍODO DE
TRANSIÇÃO PRIMAVERIL**

Gabriel Almeida Dutra

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS DURANTE O PERÍODO DE TRANSIÇÃO
PRIMAVERIL**

GABRIEL ALMEIDA DUTRA

Sob a orientação do professor
Dr. Júlio César Ferraz Jacob

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas).

Seropédica
Março de 2016

636.10824

D978i

T

Dutra, Gabriel Almeida, 1988-

Indução da ovulação em éguas durante o período de transição primaveril / Gabriel Almeida Dutra. - 2016.

30 f.

Orientador: Júlio César Ferraz Jacob.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2016.

Bibliografia: f. 23-30.


1. Éguas - Reprodução - Teses. 2. Ovulação - Indução - Teses. 3. Medicina veterinária - Teses. I. Jacob, Júlio César Ferraz, 1961- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

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

GABRIEL ALMEIDA DUTRA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/03/2016


Julio Cesar Ferraz Jacob (Ph. D) UFRRJ
(orientador)


Flamarion Tenório de Albuquerque (Ph. D) UFLA


Marco Roberto Bourg de Mello (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Milene
Aos meus irmãos, Bruno e Camile
Ao meu avô, Elias (in memoriam)
À minha noiva Alana
E a minha tia Naná.

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Sei que mesmo concluindo mais uma etapa em minha vida ainda tenho uma longa estrada pela frente, ainda assim estou feliz, por estar cada vez mais perto do meu sonho. Tenho muita dificuldade em transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grato a todos vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

À Deus pela serenidade em aceitar as coisas que não pude mudar, por iluminar meus caminhos e me presentear com muita saúde e determinação, me permitindo atingir meus objetivos.

À UFRURALRJ que me proporcionou momentos incríveis nos últimos sete anos, assim como um amadurecimento pessoal e profissional que eu nunca imaginei que teria nesse espaço de tempo.

À todas as éguas palpadas nesses últimos anos assim como todos os animais que foram responsáveis por meu aprendizado.

Aos meus pais que amo incondicionalmente e que se entregaram por inteiro em minha criação, renunciando inúmeras vezes seus sonhos, para a realização dos meus.

Ao meu irmão “meu ídolo” que sempre quando precisei, estava ao meu lado.

À minha maninha que sempre protegerei e que amo tanto.

Aos meus avós que por diversas vezes iluminaram os meus caminhos com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheio de esperança.

Aos meus tios e tias por me ajudarem nos momentos em que eu mais precisei.

À minha madrinha que guardo em um lugar especial em meu coração, pois nunca se esqueceu de mim independente da distância.

Aos meus primos e primas que amo como irmãos.

Ao meu Orientador professor Dr. Júlio Jacob, pela oportunidade de estágio, pela liberdade, confiança, ensinamentos práticos e teóricos sobre reprodução equina assim como toda ajuda nesses últimos anos, principalmente nesta reta final.

Ao professor Dr. Marco Mello pelas inúmeras ajudas emergenciais, pelas conversas e principalmente por ser um exemplo de pessoa e acima de tudo um exemplo de Professor.

À professora Dra. Vera pelos diversos conselhos e ajudas durante todos esses anos, principalmente nesta reta final.

Ao professor Ms. Três por sempre compartilhar a sua vivência prática e experiência de vida assim como pela convivência agradável nesses últimos anos.

Aos Amigos da reprodução por tornar os momentos de trabalho e estágio mais agradáveis e divertidos. Em especial: Paulinha (por ser um exemplo de pessoa e profissional, e por ter me ajudado inúmeras vezes), Jonnatha (além de sempre me ajudar, foi o responsável pela minha linha de pesquisa), Marcus (pela amizade durante os meus sete anos de Rural e principalmente pela ajuda na finalização do meu projeto) e por último, todos os pós graduandos e estagiários que passaram pelo setor.

Aos funcionários da Área de Reprodução Animal, Zico, Zezinho, Reneu, Debaixo, Fofinho, Luíz, Peixeiro e aos funcionários do Setor de Equinos, Nori, Beto e Jorginho, por serem verdadeiros professores.

À família Birigui, que me ensinou a conviver em grupo e que me fez sentir em casa durante todo esse tempo. Em especial: Ane, Diogo, Pedro, Hugo e Janella.

Aos amigos da 2008-1 que foram um dos responsáveis pelo amor que sinto pela Rural. Em especial: Jorge, Daniel e DaniLove, Grillo e Thais.

Aos amigos de Volta Redonda, que de alguma forma também colaboraram para a minha formação e deixaram alguma lembrança.

À minha noiva, futura mãe dos meus filhos, pelo amor, companheirismo e paciência (principalmente nesses últimos meses).

Em especial a minha tia Fernanda “minha mãe de coração” que sempre com muita paciência me ensinou e me guiou para que me tornasse o profissional que sou hoje.

RESUMO

DUTRA, Gabriel Almeida. **Indução da ovulação em éguas durante o período de transição primaveril**. 2016. 40p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A antecipação da estação reprodutiva tem sido assunto de grande interesse frente ao seu impacto econômico. A fim de adiantar a primeira ovulação e antecipar a fase reprodutiva das éguas, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom durante o período de transição primaveril foi capaz de induzir a ciclicidade em éguas. O experimento foi realizado na área de Reprodução Animal do DRAA/IZ/UFRRJ, localizado no município de Seropédica-RJ, durante o período de transição primaveril (agosto-setembro) e início do período reprodutivo (outubro) de 2015. Foram selecionadas 27 éguas da raça Mangalarga Marchador, entre 5-12 anos, pesando entre 350-450 kg e com histórico de atividade reprodutiva normal. As éguas selecionadas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: Grupo 1- Controle (G1; n=9), sem tratamento hormonal; Grupo 2- P₄ + PGF_{2α} (G2; n=9), 1500mg de progesterona de longa ação, por via intramuscular (IM), e sete dias após, 7,5 mg de Dinoprost (PGF_{2α}), IM e Grupo 3- Aspiração folicular transvaginal + PGF_{2α} (G3; n=9), maior folículo aspirado (>25mm) e sete dias após, 7,5 mg de PGF_{2α}, IM. Previamente ao início do experimento, todas as éguas foram avaliadas por meio da ultrassonografia, sendo critério para o estudo a ausência de corpo lúteo, bem como a presença de folículos ovarianos >25mm. Posteriormente a esta avaliação, a atividade reprodutiva foi monitorada a cada 48 horas até o momento da segunda ovulação de cada égua. Quando avaliado o número de éguas que ovularam em até 16 dias após o início do tratamento, observou-se que os grupos G2 e G3 foram mais eficientes (P=0,0031) em acelerar a primeira ovulação da estação reprodutiva, quando comparados ao grupo G1. No grupo G1, após 16 dias do início do tratamento, nenhum animal ovulou. Nos grupos G2 e G3 oito (88,9%) e seis (66,7%) éguas ovularam, respectivamente. Analisando o número médio de dias a partir do tratamento até a primeira ovulação, os grupos tratados (G2 e G3) foram mais eficientes que o

grupo controle na antecipação da primeira ovulação ($P < 0,001$). Em relação aos grupos tratados, não houve diferença ($P > 0,05$) entre eles. Foi possível verificar que os grupos G2 e G3 apresentaram uma antecipação da primeira ovulação em relação ao controle em média de 12,2 e 8,9 dias, respectivamente. As éguas foram acompanhadas até a segunda ovulação subsequente ao tratamento. Todas ovularam normalmente, demonstrando que nenhuma delas retornou ao período de transição e que a média de dias entre a primeira e a segunda ovulação, não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$). Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que a técnica de aspiração folicular durante o período de transição primaveril, associado à administração de 7,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sete dias mais tarde, foi capaz de induzir a ciclicidade em éguas. Este tratamento mostrou-se tão eficaz quanto o protocolo convencional de P4 + $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo viável utilizá-lo na rotina de centros reprodutivos. No entanto, mais estudos são necessários a fim de avaliar sua eficácia em folículos com diâmetros menores no período de transição primaveril, assim como sua associação aos indutores de ovulação.

Palavras-chave: sazonalidade, progesterona, aspiração.

ABSTRACT

DUTRA, Gabriel Almeida. **Ovulation induction in mares during the spring transition period**. 2016. 40p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The anticipation of the breeding season has been the subject of great interest in front of their economic impact. In order to advance the first ovulation and anticipate the reproductive phase of the mares, this study aimed to evaluate if the transvaginal follicle aspiration technique guided by ultrasound during spring transition period, was able to induce cyclicity in mares. The experiment was conducted in Animal Reproduction area of DRAA / IZ / UFRRJ, located at Seropédica-Rj, during spring transition period (August-September) and early reproductive period (October) 2015. Selected mares were randomly distributed into three groups: Group 1 Control (G1, n = 9), without hormonal treatment; Group 2 P4 + PGF_{2α} (G2, n = 9), 1500 mg of long-acting progesterone, intramuscularly (IM), and seven days later, 7.5 mg Dinoprost (PGF_{2α}), IM and Group 3 transvaginal follicular aspiration + PGF_{2α} (G3, n = 9), greater follicle aspirated (>25mm) and seven days later, 7.5 mg Dinoprost (PGF_{2α}), IM. Prior to the beginning of the experiment, all mares were evaluated by ultrasonography, and the criteria for the study was absence of corpora lutea as well as the presence of ovarian follicles larger than 25 mm. Subsequent to this evaluation, the reproductive activity was monitored every 48 hours until the second ovulation of each mare. When evaluated the number of mares ovulating within 16 days after initiation of treatment, it was observed that the groups G2 and G3 were significantly more effective (P = 0.0031) in the first ovulation of the breeding season, when compared to G1. In G1, 16 days after the start of treatment, no animal ovulated. In G2 and G3 eight (88.9%) and six (66.7%) mares ovulated respectively. The mares were evaluated until the second subsequent ovulation treatment. All mares ovulated normally, showing that none of them returned to the transitional period and the average number of days between the first and second ovulation did not differ between the groups (P > 0.05). The results of this study allow us to conclude that follicular aspiration technique during spring transition period associated with the administration of 7.5 mg of PGF_{2α} seven days later, was able to induce cyclicity in

mares. This treatment was effective as the conventional protocol P4 + PGF_{2α}, thus possible to use it in routine reproductive centers. However, more studies are needed to evaluate its effectiveness during the early spring transition period, as well as its association with ovulation inducers.

Keywords: seasonality, progesterone, aspiration, mare

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Fisiologia do ciclo estral.....	2
2.2. Período de transição primaveril.....	3
2.3. Dinâmica folicular I.....	3
2.4. Luteogênese.....	5
2.5. Função luteal	6
2.6. Manutenção do corpo lúteo e concentração de progesterona.....	7
2.7. Aspiração folicular	8
2.8. Indução do corpo lúteo pela aspiração folicular.....	9
2.9. Controle da sazonalidade Reprodutiva.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Animais experimentais	14
3.2. Grupos experimentais	14
3.3. Exame ultrassonográfico	14
3.4. Aspiração folicular	14
3.5. Análise estatística	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÃO.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. Introdução

É notório o crescimento do mercado equino no Brasil. O interesse pela biotécnica de transferência de embriões (T.E.) vem aumentando, assim como a busca por melhores resultados de fertilidade na espécie (SOUZA et al., 2015). A T.E. em equinos é amplamente desenvolvida e disseminada no país. De acordo com o último levantamento realizado, o Brasil foi o país com o maior número de embriões transferidos por ano (IETS, 2011).

As éguas apresentam comportamento reprodutivo sazonal, portanto não estão aptas à reprodução durante todo o ano. O padrão sazonal da atividade reprodutiva varia durante as estações: geralmente apresenta um decréscimo transicional durante o outono; torna-se mínima ou ausente no inverno; aumenta gradualmente na primavera e ocorre de forma plena durante o verão (BERGFELT, 2009).

Desta forma, a antecipação da estação reprodutiva tem sido assunto de grande interesse frente ao seu impacto econômico. Várias estratégias terapêuticas têm sido testadas visando antecipar a primeira ovulação da estação reprodutiva. A utilização de progesterona (P4) exógena proporciona os melhores resultados (CUERVO-ARANGO & CLARK, 2010). Nos últimos anos, estudos revelaram que a aspiração folicular, via transvaginal, guiada por ultrassom pode gerar uma estrutura luteal capaz de produzir progesterona em concentrações plasmáticas compatíveis com um corpo lúteo fisiológico suficiente para normalizar a atividade endócrina nas éguas (MOZZAQUATRO et al., 2012).

A fim de antecipar a primeira ovulação e, desta forma, a estação reprodutiva das éguas, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a técnica de aspiração folicular via transvaginal, guiada por ultrassom, durante o período de transição primaveril (agosto-setembro), foi capaz de antecipar e induzir a ciclicidade estral em éguas.

2. Revisão de Literatura

2.1. Fisiologia do ciclo estral

O ciclo estral da espécie equina durante a estação reprodutiva é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases: folicular (estro) e luteal (diestro). São reguladas por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteroides sexuais.

Nas éguas, a estacionalidade reprodutiva é bem marcante, apresentando períodos de atividade (estação ovulatória) e inatividade reprodutiva (estação anovulatória) associados com o comprimento de luz/dia (fotoperíodo), condições climáticas e nutricionais (NAGY et al., 2000; GINTHER et al., 2005; SCHUTZER, 2014). As fêmeas entram em anestro no final do outono, por causa da menor quantidade de luz, e os ciclos ovarianos são restabelecidos quando a luz aumenta. A variação no fotoperíodo talvez seja o sinal ambiental mais importante e que orienta o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, uma vez que tratamentos como fotoperíodo artificial estimulam desenvolvimento folicular e o início da estação reprodutiva.

O estro é induzido pela ação do hormônio estrógeno, que atua sobre o sistema nervoso central, causando mudanças gradativas no comportamento sexual da égua. O hormônio folículo estimulante (FSH) liberado atua sobre o folículo primário, provocando o seu desenvolvimento. O hormônio luteinizante (LH) atua em conjunto com o FSH durante todo o processo de desenvolvimento e maturação folicular, resultando na ovulação dos folículos maduros. A fase de estro ou fase folicular é caracterizada pela presença de um folículo com mais de 25 mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992; JACOB, 2008). As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem o comportamento de estro e a elevação dos níveis de LH, resultando em ovulação e formação do corpo lúteo (MACHADO, 2004).

A elevação dos níveis de estrógenos durante a fase estral é responsável pela instalação do edema uterino; o qual tende a reduzir a sua intensidade nos dois dias que antecedem a ovulação (MCKINNON & CARNEVALE, 1993; BURATINI, 1997;). O início da fase de diestro, é caracterizada pelo término das manifestações dos sinais do cio, que ocorrem entre 24h e 48h após a ovulação. Nesta fase, a égua torna-se

geralmente agressiva na presença do garanhão, sendo o grau de agressividade variável de indivíduo para indivíduo.

2.2. Período de transição primaveril

O período de transição primaveril compreende a época em que há mudança gradual na luminosidade. Associado às secreções crescentes do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e elevação periódica na concentração do hormônio folículo estimulante (FSH), enquanto as concentrações do hormônio luteinizante (LH) permanecem mínimas até pouco antes da primeira ovulação (STAEMPFLI et al., 2011).

Durante a transição primaveril, os estros são irregulares e vários pequenos folículos se desenvolvem e regridem sem ovular (CUERVO-ARANGO & CLARK, 2010). Folículos menores que 20 mm começam a diminuir no início da primavera com o concomitante e rápido aumento no número de folículos maiores (GINTHER, 1992). Durante a fase final do período de transição primaveril, os folículos alcançam diâmetros similares aos de folículos pré-ovulatórios, porém regridem. Vários folículos dominantes continuam a emergir até que um é favorecido e ovula, iniciando, desta forma, a fase ovulatória (STAEMPFLI et al., 2011).

2.3. Dinâmica folicular

A égua se caracteriza por ser monovulatória, sofrendo influência da estação do ano, com ciclos estrais regulares, 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 o ciclo estral. Na chamada onda menor, o maior folículo não chega a se tornar dominante. Por outro lado a onda maior é dividida em primária e secundária sendo que o maior folículo se torna o dominante (GINTHER et al., 2004).

A maioria das éguas apresenta desenvolvimento de uma onda folicular por ciclo, que se inicia na metade da fase luteal. Entretanto, aproximadamente em um terço das éguas pode ocorrer o desenvolvimento de outra onda folicular iniciada rapidamente após a ovulação. 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 et al., 1992; 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. Em concomitância a esta fase, ocorre o aumento das concentrações séricas de FSH. No momento em que os maiores folículos da onda atingem diâmetro ≥ 13 mm, a concentração de FSH começa a diminuir devido à produção de inibina por esses folículos. 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. 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; DONADEU, 2001; GINTHER et al., 2005; JACOB, 2009).

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 regridem. Essa alteração é o principal evento durante a seleção do folículo dominante, sendo precedido pelo aumento nas concentrações de LH. O mecanismo da divergência impede o crescimento contínuo do futuro folículo subordinado, desde que o mesmo seja capaz de se tornar dominante, como indicado nos estudos envolvendo aspiração de folículos dominantes (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2004).

Próximo ao momento da divergência em um dos folículos ocorrerá a indução de receptores nas células da granulosa, aumentando sua capacidade de produção de estradiol, sua sensibilidade ao FSH e sua especificidade para responder ao LH. Tal característica permite a ocorrência de apenas uma ovulação, embora, eventualmente, duas ou mais podem ser alcançadas (GINTHER, 1992; JACOB, 2009).

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

Na fase pós-divergência, o folículo dominante passa a depender do LH para o

desenvolvimento final, maturação e ovulação. Além disso, há também ação de fatores de crescimento intrafoliculares e de proteases envolvidas com a esteroidogênese intrafolicular que leva à ovulação (GASTAL et al., 2000; DONADEU et al, 2003; SPICER et al., 2005).

Os níveis de FSH permanecem baixos até a ovulação, sendo esta diminuição atribuída especialmente ao folículo dominante. 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 de gonadotrofinas antes que a dominância folicular se estabeleça (DONADEU, 2003; SAMPER, et al., 2007).

2.4. Luteogênese

A luteogênese consiste em todas as mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem no folículo ovulatório até que se transforme em corpo lúteo (CL) funcional capaz de secretar grandes quantidades de progesterona. A luteinização começa antes da ovulação com mudanças na população de receptores de gonadotrofinas, os quais estão localizados na membrana citoplasmática e que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína de ligação. A gonadotrofina que mais atua nestes receptores, levando à ruptura do folículo e sua posterior transformação em estrutura lútea, é o LH (SALLES, et al. 2010).

Em éguas, o aumento de LH se inicia cerca de dois dias antes da ovulação e continua após a ovulação. O processo de luteinização das células da granulosa, que constituem a parede do folículo pré-ovulatório, se inicia antes da ovulação, mediado pelo LH que tem um papel luteotrófico. O aumento das concentrações de LH inicia-se ao redor do dia 17 do ciclo, concomitante a remoção dos efeitos supressivos da progesterona do ciclo anterior e do estímulo positivo do estrógeno (GINTHER, 1992; FERREIRA-DIAS et al., 2006; JACOB 2009).

Após a ovulação, o espaço ocupado previamente pelo folículo é invadido por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune células endoteliais, células da teca interna (CTI) e células da granulosa (CG), que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia. Esse conjunto de células promove, inicialmente, a formação de uma estrutura denominada de corpo hemorrágico (CH). Após a formação do CH, as células

da teca interna e da granulosa se diferenciam em células luteais para formar o CL (DIAZ et al., 2002; SENGER, 2003; STOCCO et al., 2007).

As células luteais pequenas (12 a 20µm de diâmetro) são originadas a partir da teca interna e contêm grande quantidade de mitocôndrias e gotas lipídicas. Essas células têm receptores para LH, os quais ativam a proteína kinase A (PKA) por meio do sistema de segundo mensageiro para estimular a síntese de progesterona. Células luteais grandes (20 a 45µm de diâmetro) são originadas de células da granulosa, responsáveis por 80% da secreção de progesterona *in vivo*, também pela ativação da PKA, e contêm grande quantidade de mitocôndrias (McKINNON et al., 2011). As células luteais grandes têm receptores para PGF_{2α}, por isso podem ser responsáveis pela mediação da ação inicial luteolítica dessa prostaglandina. Na maioria das espécies, há uma mistura considerável de tipos de células luteais grandes e pequenas durante a reorganização do folículo recentemente ovulado em CL (STOCCO et al., 2007). A reorganização celular, objetivando o preparo das células luteais para a síntese crescente de progesterona ao longo do ciclo estral, também foi caracterizada por uma diminuição na expressão das enzimas que convertem progesterona em 17β-estradiol (P450 17α-hidroxilase e P450 aromatase), por um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em progesterona (P450 clivadora de cadeia lateral - P450_{scc} e a 3β-hidroxiesteróide desidrogenase - 3β-HSD) e aumento da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) na superfície da membrana mitocondrial (FRASER et al., 1986). Este processo se completa a partir do terceiro dia após a ovulação, sendo caracterizado pelo crescimento das células luteinizadas até o nono dia (NISWENDER & NETT, 1993).

2.5. Função luteal

O CL sintetiza a progesterona, sendo esta formada a partir do colesterol que é transportado para o interior da mitocôndria pela StAR e convertido em pregnenolona por meio da ação da enzima P450_{scc}. A conversão de pregnenolona em progesterona ocorre por meio da enzima 3β-HSD, presente no retículo endoplasmático liso (NISWENDER, 2000).

O colesterol é transportado na forma de lipoproteínas para todos os tecidos esteroidogênicos. As principais fontes de colesterol disponíveis para a produção de hormônios esteróides são as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O principal mecanismo de obtenção do LDL ocorre através da endocitose (CHRISTENSON & DEVOTO, 2003). O HDL extracelular se encontra conjugado a proteínas do plasma, que se ligam a membrana celular fazendo o transporte do HDL para dentro da célula. Uma vez no interior da célula, as lipoproteínas são quebradas por enzimas do lisossomo e o colesterol disponível no citoplasma da célula é utilizado como substrato para a esteroidogênese (NISWENDER, 2000).

O CL tem como principal função produzir progesterona, sendo as células luteais esteroidogênicas as principais fontes desse hormônio (LeBLANC, 2003). Essa glândula é fundamental na regulação do comprimento do ciclo ovariano na maior parte de mamíferos cíclicos. A extensão da vida útil desse CL, assim como a secreção de progesterona, é necessária para a manutenção da gestação (McCRACKEN et al., 1999). Esse hormônio estimula mudanças proliferativas no lúmen do epitélio uterino e nas glândulas endometriais preparando o endométrio para receber o embrião, em caso de fertilização, e também promovendo o comportamento de rejeição ao garanhão (LeBLANC, 2003).

2.6. Manutenção do corpo lúteo e concentração de progesterona

A regulação da manutenção da função lútea assim como a secreção de progesterona, depende do número e afinidade aos receptores de LH durante o período pós-ovulatório. Nas éguas, o pico de LH atinge concentrações máximas em média, um dia após a ovulação (JACOB et al., 2009). Entretanto, as concentrações de LH são muito baixas durante o meio da fase luteal. Por essa razão, espera-se que qualquer alteração no número de receptores de LH e/ou na afinidade do receptor, possa controlar a função luteal (GINTHER et al., 2005).

Em um estudo realizado por Watson et al. (2000), éguas foram tratadas com um antagonista do GnRH no oitavo dia do diestro para testar o papel do LH na manutenção do CL. O estudo demonstrou que o tratamento de éguas em diestro com antagonista do GnRH diminuiu a secreção de progesterona, indicando o papel do LH no suporte do CL e proporcionou atraso no crescimento folicular e na ovulação, provavelmente devido a

falta do suporte gonadotrófico. Os resultados indicam que a liberação de alta amplitude do LH está envolvida na manutenção da produção de progesterona pelo CL.

As concentrações de progesterona aumentam gradativamente após a ovulação. O pico dessas concentrações (8 a 20ng/mL) é atingido entre os dias cinco e oito pós-ovulação. Seu nível se mantém elevado até o início da luteólise ao redor dos dias 14 e 15, em virtude da liberação de PGF_{2α} pelo endométrio (LeBLANC, 2003).

2.7. Aspiração folicular

A técnica de aspiração folicular VIA transvaginal guiada por ultrassom foi inicialmente desenvolvida para recuperação de oócitos em mulheres, associada à fertilização *in vitro* (FIV) (DELLENBACH et al. 1984; FEICHTINGER & KEMETER, 1986) e posteriormente, no decorrer dos anos 80, foi adaptada para bovinos (PIETERSE et al., 1988). O primeiro relato de aspiração folicular transvaginal em éguas foi o de Bruck et al. (1992). Diferentes técnicas são descritas para coleta *in vivo* de oócitos: aspiração folicular depois da exteriorização do ovário (McKINNON et al., 1986), aspiração transcutânea pelo flanco (HINRICHS et al., 1991) e transvaginal guiada por ultrassom (MOZZAQUATRO et al., 2012). Contudo, o uso desta técnica não se restringe somente ao procedimento de recuperação de oócitos. Várias equipes de pesquisadores utilizaram a aspiração folicular na espécie equina com o objetivo de estudar o desenvolvimento folicular, induzir a emergência de uma nova onda folicular e/ou a elevação dos níveis de FSH devido à inibição da produção da inibina e do estradiol pelo folículo (BERGFELT et al., 2001; GINTHER et al., 2005).

A aspiração folicular tem sido usada extensivamente como uma abordagem não-esteroidal para estudar a natureza da dinâmica folicular nos equinos, sem a potencial interferência de esteróides exógenos (GINTHER et al., 2003), tanto na indução da emergência da onda folicular quanto na sincronização da ovulação entre os animais (LIMA et al., 2007).

Dentre as reconhecidas vantagens da técnica destacam-se: o fato de ser pouco invasiva, não depender de estimulação hormonal, ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial (VIANA & BOLS, 2005). Nos últimos 25 anos, esta técnica vem sendo aplicada como uma ferramenta para a pesquisa com o intuito de estudar a natureza da dinâmica folicular em equinos e bovinos (GASTAL et al., 1997), a administração intrafolicular de fármacos (GASTAL et al.,

1995), indução da emergência da onda folicular e sincronização da ovulação entre os animais (AMIRIDIS et al., 2006; LIMA et al., 2007), indução de função lútea (MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010) e avaliação do líquido folicular e sua influência (HINRICHS et al., 1991).

A fertilidade das éguas submetidas ao procedimento não sofre alteração, o que foi comprovado em experimento realizado por Mari et al. (2005). De 20 éguas que foram submetidas a três ou quatro sessões de aspiração folicular durante estro e diestro, 10 foram inseminadas e sete ficaram gestantes. Em estudos iniciais desenvolvendo a técnica em cinco éguas, Bracher et al. (1993) realizaram 24 sessões (quatro a sete sessões por égua) de aspiração folicular transvaginal e aspiraram 200 folículos, recuperando 34 oócitos. Os autores não relataram nenhum efeito sobre o ciclo das éguas, bem como concluíram que a técnica pode ser empregada repetidamente sem que haja o risco de peritonite ou aderências. Para avaliar funcional e morfológicamente os ovários de éguas após repetidas sessões de *ovum pick up* (OPU), Bogh et al. (2003) realizaram estudo em que observaram que todas as éguas mantiveram normal a função ovariana, definida como a capacidade de ovular e desenvolver corpo lúteo regularmente.

Bogh et al. (2000) descreveram que a técnica de aspiração folicular é rápida, de fácil repetibilidade, não causando traumas substanciais ou desconfortos óbvios para as éguas. Observaram ainda que a evacuação de grandes folículos pré-ovulatórios pode causar hemorragia intra-folicular. Todavia, esta hemorragia diminui quando a cavidade folicular é preenchida de sangue, provavelmente devido a pressão intra-folicular.

2.8. Indução do corpo lúteo pela aspiração folicular

A secreção de LH pré-ovulatório ocorre progressivamente até aproximadamente uma semana, começando próxima a divergência folicular e se estendendo em média até um dia após a ovulação. O LH então diminui suas concentrações a níveis basais até o próximo folículo pré-ovulatório (JACOB et al., 2009). Este fator pode ser importante no desenvolvimento e funcionalidade do CL inicial equino. Entretanto, durante o período em que a concentração de progesterona está elevada, os níveis de LH estão diminuídos.

As concentrações de LH e FSH estão relacionadas durante o ciclo estral. Durante o crescimento e desenvolvimento de folículos antrais o FSH e o LH desempenham os seguintes papéis: folículos pré-antrais adquirem receptores de LH na membrana das células da teca e para o FSH na membrana das células da granulosa. As células da teca

produzem andrógenos sob a influência do LH. Estes atravessam a membrana basal dentro do próprio folículo e sua aromatização em estrógenos ocorre sob a influência do FSH dentro das células da granulosa (MOON et al., 1975). Ambos, FSH e LH, são necessários para a produção de folículos aptos a ovular. Estrógenos induzem a formação de receptores de LH nas células da granulosa, preparando os folículos a se tornarem responsivos ao aumento pré-ovulatório das gonadotrofinas que ocorre na fase final do ciclo (PIERSON, 1993).

Algumas mudanças características ocorrem com os folículos equinos com a aproximação da ovulação. O número de receptores de LH diminui ao mesmo tempo em que as concentrações de progesterona, testosterona e prostaglandinas no líquido folicular se elevam (HINRICHS, 1988). Em vacas, têm sido observados padrões similares nas concentrações de esteróides de folículos pré-ovulatórios. Isto se deve ao efeito da exposição de elevadas concentrações pré-ovulatórias de LH no plasma, resultante da inibição da capacidade aromatizante das células da granulosa. É causada uma depleção de substrato para síntese de estrógeno no qual as células da granulosa se diferenciam em células luteínicas. Foi estabelecido que para um folículo se transformar em um CL completamente funcional, é necessário que o mesmo apresente uma quantidade adequada de células da granulosa e uma quantidade suficiente de receptores de LH (DIELEMAN et al., 1983;).

A aspiração do fluido de folículos pré-ovulatórios promoveu uma significativa luteinização, sendo comprovada pelo aumento nas concentrações de progesterona. A produção de progesterona foi consistente entre os dias quatro e cinco nas éguas que tiveram o folículo pré-ovulatório aspirado e entre os dias cinco e oito em éguas nas quais a aspiração ocorreu em folículos entre 30-34mm (MONTECHIESI, 2009, MOZZAQUATRO et al., 2010). O exame ultrassonográfico indicou ainda que um CL de morfologia aparentemente normal foi formado depois da aspiração. Observaram também que quando comparados os efeitos da aspiração e ovulação, fica evidente que a remoção do líquido folicular não mimetiza inteiramente uma ovulação. Os efeitos da aspiração e ovulação nos valores de FSH foram similares, provavelmente refletindo a perda na supressão da pituitária pela inibina ou estrógeno em ambos os casos. Os valores de progesterona, todavia, elevaram-se mais rapidamente depois da ovulação do que depois da aspiração. Isso é devido à luteinização pré-ovulatória da parede do folículo. Os valores de LH permaneceram altos nos grupos de éguas aspiradas, mas

declinou no grupo ovulação, provavelmente este resultado seja reflexo da rápida produção de progesterona com resultante supressão da liberação de LH pela pituitária. Bracher et al. (1993), aspirando éguas no cio e no diestro prolongado (fase luteal) observaram que ocorreu luteinização dos folículos um a seis dias após a aspiração, verificado pelos padrões de P4 no plasma ($P4 > 1 \text{ ng/mL}$), quando comparados a àquelas éguas que tiveram ovulação com um ciclo estral normal.

A aspiração de todos os folículos ($> 10 \text{ mm}$) em éguas no período de transição, quando o maior folículo alcançou 30mm de diâmetro, resultou em luteinização em 38% das éguas (ALVARENGA et al., 1999). Hayna et al. (2004), aspirando folículos maiores que 25mm, observaram aumento das concentrações sanguíneas de progesterona maiores que 1ng/mL em 88% dos folículos aspirados entre 26-30mm e 100% nos folículos de diâmetro 31-34mm, sugerindo que houve formação de tecido luteal.

Bogh et al. (2000) verificaram que aspiração folicular de éguas nos dias seis e 14 do ciclo estral não afetou as concentrações circulantes de P4, mostrando-se similar a de éguas cíclicas normais. Além disso, o tamanho médio do ciclo depois da aspiração folicular no dia seis (22,6 dias) e no dia 14 (25,3 dias) foi compatível ao tamanho do ciclo de éguas controle, não aspiradas, durante a estação reprodutiva (22,6 dias). Desta forma, os autores concluíram que a aspiração de folículos dominantes, durante o diestro, não resulta em subsequente luteinização. Por outro lado, a aspiração de folículos no dia 18 prolonga o ciclo normal por aproximadamente o tamanho de um ciclo inteiro. Essas informações associadas a mudanças ultrasonográficas observadas, fornecem evidências de que há luteinização depois da aspiração de um folículo dominante (dia 18 do ciclo) formando um CL.

2.9. Controle da sazonalidade reprodutiva

Pesquisas sobre a reprodução equina vêm buscando melhor entender e manipular os mecanismos que determinam sua sazonalidade reprodutiva (SCHUTZER et al., 2014). A retomada da ciclicidade ovariana na primavera requer uma série bem ordenada de eventos endócrinos a fim de controlar a foliculogênese. Dentre eles, o aumento da secreção de GnRH, possivelmente mediado pela dopamina, seguido pelo consequente aumento da síntese e secreção de gonadotrofinas e a retomada de certo grau de atividade folicular (DONADEU & WATSON, 2007).

Protocolos bem sucedidos que estimulam a ciclicidade ovariana em éguas para superar o anestro de inverno e/ou prolongada fase de transição são de interesse para a indústria equina. A necessidade desses protocolos tornou-se ainda mais pronunciada nas últimas décadas, desde que a transferência de embriões e outras biotecnologias, cresceram e se espalharam por muitas regiões, principalmente no Brasil. Várias estratégias terapêuticas para o avanço da primeira ovulação têm sido testadas (RAZ et al., 2009). Dentre elas, o uso de progestágenos, que é a mais utilizada e a que proporciona os melhores índices (CUERVO-ARANGO & CLARK, 2010).

Entretanto, o sucesso do tratamento com progestina ou progesterona depende do estágio da fase de transição e do tamanho folicular, onde de maneira geral, quanto mais avançado o período transicional, mais alta a probabilidade da égua ovular após o tratamento. Não devem ser escolhidas para o tratamento éguas com ovários pequenos e inativos, mas sim éguas com ovários contendo múltiplos folículos (20 – 30 mm de diâmetro), independente se estão apresentando sinais de estro (SCHUTZER, 2012).

O uso de progesterona em éguas de transição foi primeiro relatado por Niekerk et al. (1973), onde a injeção de 100 mg de progesterona oleosa foi administrada diariamente durante sete dias em éguas na fase de transição final, promovendo a ovulação entre seis a sete dias após o final do tratamento. Outro meio de se administrar progesterona para éguas é através de dispositivos intravaginais, que têm se mostrado consistentes na indução da primeira ovulação da estação de monta em éguas em transição primaveril (STORER et al., 2009). Entretanto, éguas submetidas ao uso de dispositivos de progesterona intravaginais apresentaram no momento da remoção do mesmo algum grau de vaginite, evidenciado por corrimento vaginal purulento ao redor do dispositivo usado (CUERVO-ARANGO & CLARK, 2010). Na última década, compostos de progesterona de longa ação têm sido disponibilizados, permitindo a administração de progesterona em uma única dose. Esses compostos de ação prolongada liberam progesterona a uma taxa controlada durante um período de sete a 10 dias, podendo então ser utilizados em uma única dose de maneira simples e de baixo custo (STAEMPFLI et al., 2011).

Esses experimentos baseiam-se na hipótese de que o brusco aumento e queda dos níveis de progesterona em éguas em anestro possam estimular a produção e liberação de GnRH pelo hipotálamo, com conseqüente aumento da liberação dos hormônios LH e FSH pela hipófise, fundamentais para estimulação do crescimento

folicular e ovulação. O crescimento folicular é inibido durante o tratamento com progesterona. Acredita-se que o LH contido na hipófise se eleve durante o tratamento com progestágeno, resultando em um aumento da secreção de gonadotrofinas após o término do tratamento. Depois de cessado o tratamento, apenas um folículo pré-ovulatório se desenvolve e ocorre a ovulação (MCKINNON et al., 2011).

A progesterona pode ainda ser utilizada em associação a Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). De acordo com Randel et al. (1996), a PGF_{2α} poderia aumentar o desenvolvimento folicular via aumento da sensibilidade da hipófise ao GnRH. Segundo Noden et al. (1978), a diminuição da progesterona sérica 24 horas após o tratamento com PGF_{2α} foi precedida por um aumento transitório no sangue de progesterona, LH e estradiol. Esses autores afirmaram que, alternativamente, a PGF_{2α} pode estimular diretamente a produção de estradiol *in vivo* como aconteceu *in vitro* durante a cultura de folículos bovinos. Em estudos mais recentes, foi demonstrado que a injeção de P4 em combinação com a injeção de PGF_{2α} dez dias mais tarde foi mais eficaz que a aplicação isolada de cada um desses hormônios para iniciar atividade ovariana e aumentar a proporção de éguas em transição primaveril exibindo ciclicidade estral. Acredita-se que nesse estudo a PGF agiu com a P4, via mecanismo de mímica de um ciclo estral normal. Com esta combinação, provavelmente o centro pulsátil hipotalâmico de GnRH foi inibido por um período, possibilitando a hipófise secretar FSH/LH, que então foi desbloqueado, permitindo um desenvolvimento folicular (BOTELHO, 2012).

3. Material e Métodos

3.1. Animais experimentais

O presente trabalho foi realizado na área de Reprodução Animal do DRAA/IZ/UFRRJ, localizado no município de Seropédica – RJ (LAT. 22°46'17.44" S e LONG. 43°40'25.98" O), durante o período de transição primaveril (agosto-setembro) e início do período reprodutivo (outubro) de 2015. Foram selecionadas, COM BASE NO EXAME GINECOLÓGICO, 27 éguas da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 5-12 anos, escore corporal entre cinco e sete e com histórico de atividade reprodutiva normal. Os animais eram mantidos à pasto e tiveram como alimentação: pastagem e concentrado produzido pela própria universidade.

3.2. Grupos experimentais

As éguas selecionadas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos:

Grupo 1- Controle (n=9) - sem tratamento hormonal;

Grupo 2- P₄ + PGF_{2α} (n=9) - 1500mg de progesterona de longa ação, por via intramuscular (I.M.), e sete dias após, 7,5 mg de Dinoprost (PGF_{2α}), IM;

Grupo 3- Aspiração folicular via transvaginal + PGF_{2α} (n=9) - Maior folículo (≥25 mm) aspirado e sete dias após, 7,5 mg de Dinoprost (PGF_{2α}), IM.

A aplicação de todas as injeções seguiram os cuidados inerentes à prática.

3.3 Exame Ultrassonográfico

Previamente ao início do experimento, todas as éguas foram avaliadas por meio da ultrassonografia transretal (Mindray DPS 2200 Vet SP-Brasil, com sonda linear de 5,0MHz, a fim de observar as condições ovarianas e uterinas. O critério de seleção para o presente estudo foi a ausência de corpo lúteo, bem como a presença de folículos ovarianos ≥25 mm. Posteriormente a esta avaliação, a atividade reprodutiva foi monitorada a cada 48 horas até o momento da segunda ovulação de cada égua.

3.4 Aspiração Folicular

Para realização do procedimento, as éguas foram contidas em brete e sedadas utilizando 0,5 mg/kg, por via endovenosa (EV), de Cloridrato de Xilazina 10 % e 0,02-

0,04 mg/kg, (EV), de Cloridrato de Detomidina. Para obtenção de relaxamento retal foi utilizado 0,2 mg/kg de Hyoscina N-butyl bromide (Butylscopolamina), (EV). As éguas receberam duas doses de 1 mg/kg, de Flunixin Meglumine, (EV), sendo a primeira dose administrada antes do procedimento de aspiração folicular e a segunda 24 horas após, visando uma ação analgésica e anti-inflamatória. Receberam ainda Enrofloxacin 10% (5 mg/kg) administradas a cada 24h durante três dias. Para a aspiração folicular via transvaginal foi utilizado o aparelho de ultrassonografia equipado com um transdutor microconvexo de 5,0MHz com guia de polietileno contendo uma agulha de duplo lúmen de 12 Gauge. O procedimento para aspiração foi realizado conforme preconizado por Carnevale (2004). O transdutor foi posicionado no fórnice da vagina, ipsilateral ao folículo que foi aspirado. O ovário foi manipulado por via transretal e o(s) folículo(s) posicionado(s) sobre a linha de aspiração visualizada no monitor do aparelho de ultrassonografia. A agulha foi posicionada de modo a atravessar a parede vaginal e ovariana até alcançar o interior do(s) folículo(s). O conteúdo folicular foi aspirado com o auxílio de uma bomba de sucção a vácuo com pressão próxima a 150 mmHg.

3.5 Análise Estatística

Para a avaliação da porcentagem de éguas que ovularam até os primeiros 16 dias do experimento, foi utilizado o teste exato de Fischer. Para avaliar a média do intervalo entre o início do tratamento e a primeira ovulação e a média do intervalo entre a primeira ovulação e a segunda, foi efetuada a análise de variância (ANOVA) seguida quando necessário pelo teste Tukey. Todas as estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

A proposta de avaliar um protocolo utilizando a biotécnica de aspiração folicular para a antecipação da primeira ovulação da estação reprodutiva se baseou em observações de experimentos anteriores. Hinrichs et al. (1991), avaliaram o efeito da aspiração de folículos pré-ovulatórios de éguas cíclicas, em relação a sua capacidade de luteinização e função luteal. Nesse estudo, a aspiração de folículos pré-ovulatórios de éguas cíclicas foi associado a uma significativa antecipação da função luteal, determinado pelo tempo de crescimento dos valores de progesterona. Esses achados confirmam a ideia de que o fluido folicular apresenta um inibidor da luteinização, indicando que se houver a retirada deste fluido precocemente, não seria necessário esperar até os dias finais de maturação folicular para que se desenvolva um corpo lúteo funcional.

Montecchiesi (2009) demonstrou que a aspiração de folículos >25 mm permite que as células foliculares se transformem em tecido luteal ativo capaz de produzir progesterona, alcançando concentrações compatíveis com o diestro. Em outro estudo, 81,8% (9/11) das éguas, em transição primaveril, apresentaram formação luteal após aspiração de folículos com diâmetro $\geq >30$ mm. (ALJARRAH, 2004). Portanto os trabalhos supracitados dão suporte de maneira esperada a hipótese central deste trabalho, acreditando-se que a estrutura luteal formada a partir da aspiração folicular, produziu concentrações de P4 suficientes para inibir o centro pulsátil hipotalâmico de GnRH. Esta inibição foi interrompida após o início da luteólise, promovida através da administração de 7.5 mg de Dinoprost (PGF_{2 α}). Desta forma, via mecanismo de mímica de um ciclo estral normal, foi permitido o crescimento de uma nova onda folicular, devido à queda da progesterona e aumento da concentração de FSH e LH, com consequente ovulação de seu folículo dominante.

Através do exame ultrassonográfico, observou-se (Tabela 1). que no grupo G3 (aspiração + PGF_{2 α}), todas as éguas (9/9) apresentaram estruturas semelhantes a um CL, 48h após o procedimento. Estes dados diferem dos encontrados por Montecchiesi (2009) e Mozzaquatro et al., (2012), que aspirando folículos >25 mm verificaram a presença de uma estrutura luteal em 66,7% e 57,1% das éguas, respectivamente. Um fator importante, e que pode justificar a razão de todos os folículos aspirados no presente trabalho responderem positivamente ao procedimento, foi a não retirada das

células da granulosa pela escarificação da parede no momento da aspiração. A remoção das células foliculares pode induzir a formação de um CL com baixo número de células lúteas (NISWENDER et al., 2002) e de baixa qualidade, uma vez que as células luteais grandes (20 a 45 μ m de diâmetro) são originadas de células da granulosa e são responsáveis por 80% da secreção de progesterona *in vivo* (McKINNON et al., 2011).

Dentre as nove éguas aspiradas no presente trabalho, quatro formaram uma estrutura hiperecogênica homogênea e cinco hiperecogênicas cavitárias. Durante o diestro em uma ovulação fisiológica, o CL pode ser visto através da ultrassonografia devido a sua intensa ecogenicidade contendo ou não um coágulo não ecogênico central. O desenvolvimento dessa área de fluido central, não altera o comprimento do intervalo interovulatório, tampouco alteram o tempo de visualização ultrassonográfica do CL. A extensão das rupturas dos componentes vasculares na parede folicular durante a ovulação é que determina, ao acaso, a formação ou não do coágulo central. Não existe diferença significativa nos níveis de progesterona produzida pelo CL com ou sem centro ecogênico (GINTHER & PIERSON, 1984; PIERSON & GINTHER, 1985). Montechiesi (2009), não encontrou diferenças nos níveis de progesterona para éguas que apresentavam ou não cavidades luteínicas e sugeriu que estas cavidades não causam efeito sobre a fertilidade.

Analisando o número médio de dias a partir do tratamento até a primeira ovulação (Tabela 1), os grupos G1 (controle), G2 (P4 + PGF2 α) e G3 (Aspiração + PGF2 α) apresentaram uma média de 24,9, 12,0 e 16 dias, respectivamente. Os grupos tratados (G2 e G3) foram mais eficientes ($P < 0,001$) que o grupo controle (G1) na antecipação da primeira ovulação. Entre os grupos tratados, não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Foi possível verificar que os grupos G2 e G3 apresentaram uma antecipação da primeira ovulação em relação ao controle em média de 12,2 e 8,9 dias respectivamente.

Tabela 1: Intervalo em dias (média ± desvio padrão) entre o início do experimento até a 1ª ovulação e antecipação de dias dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

Grupos	Tratamentos	Intervalo entre tratamento e 1º OV	Antecipação de dias da 1º OV em relação ao G1
G1	Controle (sem tratamentos)	24,9 ± 7,5 ^a	0,0
G2	P4 + PGF2α	12,0 ± 1,6 ^b	12,2
G3	Aspiração folicular+ PGF2α	16,0 ± 1,2 ^b	8,9

^{a,b} Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem estatisticamente. (p<0,05)

P4 : Progesterona de longa ação

PGF2α: Dinoprost

Quando avaliado o percentual de éguas que ovularam em até 16 dias após o início do tratamento, observou-se que 88,9% das éguas do grupo G2 (P4 + PGF2α) e 66,7% do grupo G3 (P4 + PGF2α) ovularam, enquanto a primeira ovulação do grupo G1 (controle) aconteceu somente 18 dias após o início do tratamento. Os grupos tratados (G1 e G2) não diferiram entre si (P>0,05), entretanto foram significativamente mais eficientes (P=0,0031) em antecipar a primeira ovulação da estação reprodutiva, quando comparados ao grupo G1 (0%). Estes dados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho (média ± desvio padrão) do diâmetro do maior folículo e o número de éguas ovuladas até 16 dias após o início do experimento. Comparação entre o grupo controle – não tratado- e os grupos tratados.

Grupos	Tratamentos	Tamanho do > folículo no dia do tratamento	Nº de éguas que ovularam até 16 dias	% de ovulações até 16 dias
G1	Controle (sem tratamentos)	29,1 ± 0,7 ^a	0/9 ^a	00,0%
G2	P4 + PGF2α	27,8 ± 0,7 ^a	8/9 ^b	88,9%
G3	Aspiração folicular + PGF2α	28,9 ± 1,1 ^a	6/9 ^b	66,7%

^{a,b} Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem estatisticamente (p<0,05).

P4 : Progesterona de longa ação
PGF2 α : Dinoprost

Várias estratégias terapêuticas para a antecipação da primeira ovulação têm sido testadas. Guillaume et al. (2000), por meio de fotoestimulação, visaram estabelecer o período mínimo de dias necessário, com menor intensidade de luz e com menor duração diária de exposição à luz requerida, para o avanço do início da atividade ovariana de éguas em anestro. Os autores concluíram que 35 dias foram suficientes, bem como 25W de luz branca incandescente durante uma hora (das 4:00 às 5:00h), foram capazes de estimular a atividade reprodutiva. Em experimento utilizando protocolos com diferentes períodos (35 e 60 dias) de exposição à luz artificial, em éguas em anestro sazonal, não foi observado diferença estatística entre os grupos tratados em relação às éguas que ovularam até 60 dias após o início do experimento. Entretanto, obtiveram valores significativos comparando os grupos tratados e controle, o que demonstrou a eficiência do protocolo na antecipação da estação reprodutiva (SCHUTZER et al. 2014). Apesar dos estudos com fotoestimulação relatarem eficiência nos resultados alcançados, o longo período requerido (mínimo de 35 dias) torna seu uso de difícil aplicabilidade, além de requerer considerável investimento financeiro inicial para preparação da estrutura e manutenção dos animais durante o período de tratamento. O protocolo proposto no presente estudo envolve apenas o procedimento de aspiração folicular, o que torna o tratamento de fácil aplicabilidade por ser uma técnica pouco invasiva, não dependente de nenhum tipo de estimulação exógena e apenas uma etapa é suficiente para antecipar a primeira ovulação.

Outros tratamentos hormonais também já foram testados, visando determinar a eficiência do FSH recombinante (reFSH) na estimulação do desenvolvimento folicular e no avanço da primeira ovulação em éguas em anestro sazonal. Meyers-Brown et al. (2013) relataram eficiência em estimular o desenvolvimento ovariano e o avanço da primeira ovulação utilizando o reFSH. O tratamento teve início em 31 de janeiro (no hemisfério norte) com folículos <20mm e consistiu de duas aplicações diárias de 0,65mg de reFSH até que os folículos atingissem 35mm de diâmetro, quando foi administrado 2500 UI de hCG como agente indutor de ovulação. Foi observado 100% (30/30) das éguas apresentando desenvolvimento de folículo com diâmetro \geq 35mm e somente 77% (23/30) ovularam 72 horas após a aplicação de hCG. A porcentagem de éguas ovulando nesse estudo foi próxima às obtidas no G2 (8/9, 88,9%) e G3 (6/9,

66,7%) do presente experimento (Tabela 2). Entretanto, as éguas tratadas com reFSH retornaram ao anestro. Diferentemente do presente estudo, cujas éguas tratadas, continuaram a ciclar, pois foram acompanhadas até a ovulação subsequente ao tratamento, demonstrando que nenhuma delas retornou ao período de transição (Tabela 3). É válido ressaltar as diferentes fases em que os tratamentos foram estabelecidos (transição no presente estudo e anestro profundo em Meyers-Brown et al., 2013), o que provavelmente justifica o anestro pós tratamento.

Durante o período de transição, Niswender et al. (2004) testaram o uso do FSH equino purificado (eFSH) em 10 éguas. Aplicações de 12,5mg de eFSH eram realizadas duas vezes ao dia, iniciando quando os folículos apresentassem tamanho ≥ 25 mm até que atingissem ≥ 35 mm de diâmetro, quando era aplicado hCG. A ovulação foi detectada em 80% (8/10) das éguas tratadas. Os autores concluíram que o tratamento com eFSH foi efetivo em antecipar a primeira ovulação. Apesar da sua eficiência, a obtenção do eFSH é difícil pois o mesmo não é produzido comercialmente sendo, por isso, um fator limitante para sua aplicação de maneira rotineira. Desta forma, o protocolo por meio da aspiração folicular, pode ser utilizado como uma alternativa.

Outro recurso hormonal utilizado no auxílio da indução de estro regular, e até mesmo associado ao tratamento com luz, é o uso da progesterona, que pode ser oral, injetável (intramuscular), dispositivo intra-vaginal de liberação controlada. Newcombe JR et al. (2002), analisaram os resultados de 413 éguas em fase de transição que utilizaram CIDR®(controlled internal drug release) associado a indutor de ovulação. As éguas receberam dispositivos contendo 1,9g de progesterona durante 12 dias. Após a retirada do CIDR®, dependendo do grupo, as éguas não recebiam qualquer tratamento ou eram tratadas com implante de GnRH (Ovuplant™) ou 1500-2500 UI de hCG, após a presença de um folículo ≥ 30 mm de diâmetro. Responderam ao tratamento 80,7% das éguas utilizadas, entretanto, apenas 53,5% das éguas que não receberam indutores de ovulação apresentaram ovulação. Essa média foi inferior à observada no presente estudo, em que não foi feito o uso de nenhum agente indutor de ovulação. Os autores concluíram que tanto o GnRH como o hCG foram fundamentais para que houvesse ovulação. Apesar dos bons resultados na utilização desse protocolo, foi relatado a ocorrência de vaginite. Em nosso estudo, durante os procedimentos de aspiração folicular não foi observado qualquer efeito indesejável, como ooforite, aderências ou vaginites.

Tabela 3: Intervalo em dias (média \pm desvio padrão) entre a 1^o e 2^o ovulação.

Grupos	Tratamentos	Intervalo entre a 1^o e 2^o OV
G1	Controle	23,7 \pm 2,0
G2	P4 + PGF2 α	25,1 \pm 3,1
G3	Aspiração + PGF2 α	23,3 \pm 2,0

Não houve diferença (P=0,2687), entre os grupos.

5. Conclusão

A aspiração folicular durante o período de transição primaveril, associado à administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sete dias mais tarde foi capaz de antecipar a primeira ovulação e a ciclicidade regular em éguas. Este procedimento mostrou-se tão eficaz quanto o protocolo convencional de P4 + $\text{PGF}_{2\alpha}$. Mais estudos são necessários a fim de avaliar sua eficácia em folículos com diâmetros menores que 25mm durante o período de transição primaveril, assim como sua associação aos indutores de ovulação.

6. Referências Bibliográficas

ALJARRAH, A. H. Methods to induce earlier onset of cyclicity in transitional mares. 2004, 65p. Thesis (Master of Science). Jordan University of Science and Technology, Jordan, 2004.

ALVARENGA, M. A., et al. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, 1999.

AMIRIDIS, G.S., et al. Luteal stage dependence of pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone in cyclic dairy ewes subjected to synchronisation of ovulation. **Reproduction, Fertility and Development**, p.769-774, 2006.

BERGFELT, D.R. Anatomy and physiology of the mare. In: SAMPER, J.C. 2ed. Equine breeding management and artificial insemination. **Missouri:Saunders Elsevier**,113-131p. 2009.

BERGFELT, D.R., et al. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biology Reproduction**, p.426-432, 2001.

BOGH, I.B., et al. Steroid concentration in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. **Theriogenology**, p. 877-888, 2000

BOGH, I.B., et al. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. **Equine Veterinary Journal**, p.575-579, 2003.

BOTELHO, J.H.V. Indução hormonal de estro regular em éguas Mangalarga Marchador em transição primaveril. 2012, 39p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras. Lavras- MG, 2012.

BOTELHO, J.H.V., et al. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase **Animal Reproduction Science**, p. 39–43, 2015.

BRACHER, V., et al. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. **Equine Veterinary Journal**, p. 75-78, 1993.

BRUCK, I., et al. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Veterinary Journal**, p. 58-59, 1992.

BURATINI JR. J. Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando a ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista UNESP-Botucatu, p. 27-39, 1997.

CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gameta intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, p. 617-624, 2004.

CHRISTENSON & DEVOTO. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, p.1-9, 2003.

CUERVO-ARANGO & CLARK. The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). **Animal Reproduction Science**, 2010.

DELLENBACH, P., et al. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. **Lancet**, 1984.

Diaz F.J., et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p.65-68, 2002.

DIELEMAN, S.J., et al. Changes in oestradiol. Progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. **Journal of Endocrinology**, p.31-42, 1983.

DONADEU, F.X., et al. Effect of number and diameter of follicles on secretion of inhibit and suppression of FSH in mares. **Reproduction**, p. 897–903, 2001.

DONADEU & WATSON. Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**, p. 225–242, 2007.

DONADEU, F.X., et al. Suppression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. **Theriogenology**, p.1423–1434, 2003.

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

FERREIRA-DIAS, G., et al. Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, p.139-151, 2006.

FRASER, H.M., et al. Effects of LH-releasing hormone antagonist on the secretion of LH, FSH, prolactin and ovarian steroids at different stages of the luteal phase in the stump-tailed macaque (*Macaca arctoides*). **Journal of Endocrinology**, p.83-90, 1986.

GASTAL, E.L., et al. Ultrasound-guided intrafollicular treatment in mares. **Theriogenology**, p.1027-1037, 1995.

GASTAL, E.L., et al. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, p.1320-1327, 1997

GASTAL, E. L., et al. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, p. 925 – 940, 2000.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare: basics and applied aspects**. 2^a ed. Michigan, U.S.A: EquiservicesPublishing, 1992.

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

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

GINTHER, O. J., et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O.J., et al. Follicle dynamics and selection in mares. **Reproduction**, p. 45-63, 2004.

GINTHER, O.J, et al. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, p.315-323, 2005.

GORETTI, R.G., et al. Effects of timing of induced luteolysis in embryo donor mares on reproductive performance and pregnancy rate in recipient mares **Theriogenology**, p. 1170–1174, 2011.

GUILLAUME, D., et al. Determination of minimum light treatment required for photostimulation of winter anoestrous mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, p.205-216, 2000.

HAYNA, J.T., et al. The effect of transvaginal follicular aspiration on Corpus luteum formation in mares. **Havemeyer Foundation Workshop. In: International symposium on equine embryo transfer**. RJ, Brazil, p. 35, 2004.

HINRICHS, K., et al. Embryonic development after intrafollicular transfer of horse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 369-374, 1991.

JACOB, J.C.F. Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades. 2008, 62p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa- MG. Viçosa- MG, 2008.

JACOB, J.C., et al. Temporal Relationships and Repeatability of Follicle Diameters and Hormone Concentrations within Individuals in Mares. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 92–99, 2009.

LeBLANC, M. Equine stud farm medicine and surgery. In: KNOTTENBELT, D.C. (Ed.). **The mare. Hardcover: Saunders**, p.124, 2003.

LIMA, W. M., et al. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Animal Reproduction Science**, p. 364-70, 2007.

MACHADO, M.S. Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina e FSH equino purificado. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

MARI, G., et al. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, p.299-308, 2005.

McCRACKEN, J.A, et al. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. **Physiological Reviews**, p.263-304, 1999.

McKINNON, A.O., et al. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. **Equine Veterinary Science**, p.306-309, 1986.

McKINNON, A.O & CARNEVALE E.M. Ultrasonography. In : Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, p.211-220. 1993.

McKINNON, A.O., et al. Ultrasonography. In : Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2a Ed., 2011.

MEYERS-BROWN, G.A., et al. Induction of ovulation in seasonally anestrous mares under ambient lights using recombinant equine FSH (reFSH). **Theriogenology**, p.456-462, 2013.

MONTECHIESI, D.F. Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas cíclicas. 2009, 78p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu- SP, 2009.

MOON, Y.S, et al. Stimulation action of follicle stimulating hormone secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. **Endocrinology**, p. 244-247, 1975.

MOZZAQUATRO, F.D., et al. Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. **Animal Reproduction Science**, p. 56–62, 2010.

MOZZAQUATRO, F.D., et al. Progesterone production in mares and echographic evaluation of the corpora lutea formed after follicular aspiration. **Reproduction Domestic Animals**, p. 288–292, 2012.

NAGY, P., et al. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, p. 245-262, 2000.

Newcombe JR., et al. Treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or Hcg to assist ovulations. **Journal of Equine Veterinary Science**, p.57-64, 2002.

NIEKERK CH, et al. Progesterone treatment of mares with abnormal oestrous cycles early in the breeding season. **Journal of the South African Veterinary Association**, 1973.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, p.333-339, 2002.

NISWENDER & NETT. Luteal phase. In: VOSS, J.L.; McKINNON, A.O. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. p.172 175, 1993.

NISWENDER, G.D, et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Hystology Reviews**, p.1–29, 2000.

NISWENDER, K.D., et al. Effect of purified equine folliclestimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mares. **Equine Veterinary Science**, p.37-9, 2004.

NODEN, P.A., et al. Early Changes in Serum Progesterone, Estradiol and LH during Prostaglandin F₂ α -induced Luteolysis in Mares. **Journal of Animal Science**, p. 666-671, 1978.

PIERSON & GINTHER. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, p.795-806, 1985.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKINNON, A. O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. Cap. 17, p. 161-71, 1993.

PIETERSE, M.C., et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, p.751-762, 1988.

RANDEL, R.D., et al. Exogenous PGF₂ α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, 1996.

RAZ, T., et al. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. **Theriogenology**, p. 358–1366, 2009.

ROSER, J.F., et al. Luteal luteinizing hormone receptors during the postovulatory period in the mare. **Biology of Reproduction**, p.499-510, 1983.

SALLES, M.G.F., et al. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.3, p.185-194, 2010.

SAMPER, J. C., et al. Current therapy in equine reproduction. Ed. Saunders Elsevier, 2^a edição, St. Louis, Missouri, 492 p., 2007.

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, 75p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu- SP, 2012.

SCHUTZER, C.G.C., et al. Utilização de diferentes períodos de fotoestimulação em éguas acíclicas para o controle da sazonalidade reprodutiva. **Veterinária e Zootecnia**, p.148-153, 2014.

SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. 2.ed. Washington: **Current Conceptions Inc.**, 368p, 2003.

Souza, R.T.R. et al. Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de transferência de embriões em equinos. **Veterinária e Zootecnia**, p. 245-253, 2015.

SPICER, L.J., et al. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, p. 573 – 581, 2005.

SQUIRES, E.L., et al. Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. **Journal Animal Science**, p.901-910, 1983.

STAEMPFLI, S.A., et al. Effect of a single injection of long-acting progesterone on the first ovulation in early and late spring transitional mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 744-748, 2011.

STOCCO, C., et al. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, p.117-149, 2007.

STORER et al. Evaluation of injectable sustained release progestin formulations for suppression of estrus and ovulation in mares. **Journal Reproduction Science**, 2009.

VIANA & BOLS. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos *cumulus*-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, p.1-2, 2005.

WATSON, E.D., et al. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. **Theriogenology**, p.599-609, 2000.