

Estratégias e entraves na superovulação de éguas

Beatriz Ramos Bertozzo
Breno Fernandes Barreto Sampaio
Érika Saltiva Cruz Bender
Ricardo Rodrigues Pagnoncelli
Eliane Vianna da Costa e Silva
Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari

RESUMO

A superovulação é uma biotécnica que traz benefícios para a reprodução equina, advindos do maior número de ovulações por ciclo. Ainda não é usada rotineiramente, e isso se deve a alguns entraves, em especial, a baixa resposta ovariana aos diferentes hormônios empregados. A presente revisão teve como objetivo abordar as principais estratégias e entraves na superovulação de éguas. Diversas substâncias já foram testadas, como: extrato de pituitária equina (EPE), hormônio foliculo estimulante suíno (p-FSH), vacinas anti-inibina, gonadotrofina coriônica equina (eCG), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormônio foliculo estimulante equino (e-FSH) e hormônio foliculo estimulante recombinante (re-FSH) em associação com hormônio luteinizante recombinante (re-LH). Somente algumas destas substâncias mostram-se eficientes, por este motivo as pesquisas se direcionaram para protocolos que utilizam EPE, e-FSH e mais recentemente o re-FSH associado ao re-LH. Estes protocolos vêm apresentando um aumento no número de ovulações e embriões produzidos, mas barreiras como a falta de um produto comercial padronizado e o baixo número de embriões produzidos em relação à taxa de ovulação impedem a introdução desta biotécnica no manejo reprodutivo dos haras.

Palavras-chave: Biotécnica. Embrião. Foliculo. Gonadotrofina. Ovulação.

Beatriz Ramos Bertozzo – Médica Veterinária, Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (2009).

Breno Fernandes Barreto Sampaio – Médico Veterinário, Mestre em Ciência Animal (2012) e Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Érika Saltiva Cruz Bender – Médica Veterinária, Graduada (2010) e Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ricardo Rodrigues Pagnoncelli – Médico Veterinário, Graduado pela Universidade do Estado de Santa Catarina (2008), Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Eliane Vianna da Costa e Silva – Médica Veterinária, Doutora em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2002), Professora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari – Médica Veterinária, Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Campus de Botucatu (1998), Professora Associada IV da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Endereço para correspondência: Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, FAMEZ, UFMS – Caixa Postal 549, CEP 79070-900 – Campo Grande/MS. E-mail: carmem.zuccari@ufms.br

Strategies and barriers in mares superovulation

ABSTRACT

Superovulation is a biotechnology that brings benefits to equine reproduction, arising from the greater number of ovulations per cycle. It is still not routinely used, and this is due to some obstacles, particularly the low ovarian response to different hormones used. This review aimed to address the main strategies and problems in superovulation of mares. Several substances have been tested, such as: equine pituitary extract (EPE), porcine follicle-stimulating hormone (p-FSH), inhibin vaccines, equine chorionic gonadotropin (eCG), gonadotropin-releasing hormone (GnRH), equine follicle-stimulating hormone (e-FSH) and recombinant follicle-stimulating hormone (re-FSH) in combination with recombinant luteinizing hormone (re-LH). Just some of these substances have shown to be effective, for this reason research is directed to protocols using EPE or re-FSH, and recently associated with re-FSH re-LH. These protocols have been showing increase in the number of ovulations and embryos produced, but barriers such as the lack of a standardized commercial product and the low number of embryos produced in relation to ovulation rate prevent the introduction of this biotechnology in reproductive routine of the farms.

Keywords: Biotechnology. Embryo. Follicle. Gonadotropin. Ovulation.

INTRODUÇÃO

A superovulação (SOV) é uma biotécnica que traz diversos benefícios para a reprodução equina como: aumento da fertilidade de éguas, melhor aproveitamento de garanhões subfêrteis, maior probabilidade de prenhez para o sêmen congelado e sexado, aumento da taxa de recuperação embrionária, antecipação da primeira ovulação do ano, maior número de embriões para a criopreservação e aumento do número de folículos disponíveis para a recuperação de ovócitos (SQUIRES et al., 2003; SQUIRES, 2006; SQUIRES; McCUE, 2007).

A indução de múltiplas ovulações em éguas ainda não é rotina e isso se deve a alguns entraves, em especial a conformação invertida do ovário, com o córtex situado na porção interna e a medula na periferia, estando o epitélio germinativo limitado à fossa da ovulação, o único ponto em que o folículo é capaz de se romper, portanto limitando o número de ovulações; e a falta de disponibilidade de um produto comercial eficiente para induzir a SOV (SQUIRES, 2006).

A presente revisão teve como objetivo abordar as principais estratégias e os entraves referentes à superovulação de éguas.

DESENVOLVIMENTO

O primeiro relato de sucesso da SOV na espécie equina ocorreu na década de 1970, por Douglas et al. (1974), utilizando o extrato de pituitária equina (EPE). Diversas substâncias, além do EPE, já foram utilizadas, tais como o hormônio folículo estimulante suíno (p-FSH), vacinas anti-inibina, gonadotrofina coriônica equina (eCG), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormônio folículo estimulante equino (e-FSH),

hormônio foliculo estimulante recombinante (reFSH) em associação com hormônio luteinizante recombinante (reLH) e, mais recentemente, o acetato de deslorelina, como indutores da SOV. Algumas dessas substâncias não foram eficientes em promover a SOV em éguas, tais como: p-FSH (CULLINGFORD et al., 2010), imuno neutralização da inibina (FARINASSO, 2004; SQUIRES, 2006), eCG e GnRH (SQUIRES et al., 2003). Por esse motivo as pesquisas se direcionaram para protocolos que utilizam EPE, e-FSH, combinação entre re-FHS e re-LH e o acetato de deslorelina.

Durante o ciclo estral, cerca de 70% das éguas apresentam uma única onda folicular que se inicia na metade do diestro. Uma população de foliculos começa a se desenvolver até que o maior deles atinja um diâmetro de aproximadamente 23,5 mm, então este começa a liberar inibina e estrógeno, levando os outros foliculos à atresia. O tratamento deve ser iniciado antes que ocorra a seleção do foliculo dominante e, no caso de éguas com duas ondas foliculares, este deve se iniciar durante a fase de crescimento dos foliculos da segunda onda folicular. Uma alternativa é examinar a égua cinco dias após a ovulação ou após a coleta de embrião e se o maior foliculo tiver entre 23 e 25 mm de diâmetro, iniciar o tratamento superovulatório (SQUIRES, 2006).

A princípio suspeitava-se que os embriões provenientes de éguas superovuladas eram menos viáveis que aqueles originários de ovulações espontâneas (WOODS; GINTHER, 1983), porém Squires et al. (1987) obtiveram taxas de prenhez semelhantes após a transferência de embriões produzidos por éguas com ovulação única ou múltipla.

O EPE é o mais utilizado na indução de ovulações múltiplas na égua, contudo apresenta uma grande variação na taxa de ovulação, provavelmente pela falta de padronização das concentrações de FSH e LH presentes no extrato *in natura* (SQUIRES et al., 2003). Os estudos visando ao aumento da eficiência do EPE estão focados nas doses diárias, no momento de início do tratamento, uso de frações purificadas de e-FSH e sincronização ovariana com esteroides antes do tratamento com EPE.

Alvarenga et al. (2001) avaliaram o efeito de uma injeção diária de 25 mg de EPE *versus* duas injeções diárias de 25 mg. Os autores observaram que o uso de duas aplicações diárias foi mais eficiente, porém não ficou determinado se a resposta superovulatória se deveu à frequência das aplicações ou à concentração diária usada. Scoggin et al. (2002) concluíram que o aumento da frequência de aplicação, e não necessariamente da dose, resultou em uma melhor taxa de fertilidade, onde a dose mais eficaz para recuperação embrionária foi de 12,5 mg de EPE, duas vezes ao dia.

Na tentativa de determinar a dose mínima de EPE capaz de promover ovulações múltiplas em éguas cíclicas, Farinasso (2004) verificou que doses diárias de 4 e 6 mg mostraram eficiência semelhante quanto a taxa ovulatória, diferindo da dose de 2 mg que se mostrou ineficiente. Até o momento não se conhece qual a dose de EPE capaz de induzir a melhor resposta ovulatória.

O EPE associado ao hCG além de promover o desenvolvimento de um número maior de foliculos, parece ter efeito benéfico sobre a maturação, resultando em maior número de foliculos com células da granulosa expandidas em éguas submetidas à aspiração folicular

guiada por ultrassom. Tal fato, provavelmente, se deveu à estimulação indireta do LH através de mediadores parácrinos das células da teca (BLANCO et al., 2009).

Com base nos estudos utilizando EPE foi desenvolvida uma preparação purificada de e-FSH para uso em protocolos de SOV e no tratamento de alguns tipos de subfertilidade (McCUE et al., 2007). O primeiro experimento avaliando o efeito superovulatório do e-FSH foi realizado por Niswender et al. (2003). Os autores concluíram que duas aplicações diárias de 12 mg resultaram em uma taxa de ovulação semelhante à de éguas que receberam duas aplicações diárias de 25 mg ($3,4 \pm 0,7$ vs $3,3 \pm 0,9$), porém com um maior número de embriões produzidos por égua ao se utilizar a dose menor ($1,8 \pm 0,8$ vs $0,6 \pm 0,3$).

Os programas de SOV baseados na utilização de EPE e e-FSH aumentam de três a quatro vezes as taxas de ovulação, porém o número de embriões produzidos é menor que o esperado (ARAUJO et al., 2008), provavelmente, devido a alterações no transporte dos ovócitos no oviduto (CARMO et al., 2006). De fato, Riera et al. (2006) observaram que o número de embriões recuperados era maior em éguas com ovulações duplas, quando provenientes de ambos os ovários, e Logan et al. (2007) relataram uma correlação negativa entre as taxas de ovulação e de recuperação de embriões.

A hipótese de que o pré-tratamento com progesterona (P_4) e estradiol (E_2) poderia aumentar a eficiência do e-FSH na SOV, por supressão do desenvolvimento folicular e obtenção de uma população de folículos mais uniforme ao final do tratamento, não foi confirmada por Logan et al. (2007), pois encontraram um resultado oposto, com taxa de ovulação superior em animais não tratados ($2,5 \pm 0,6$ vs. $5,5 \pm 0,4$). Da mesma forma, Raz et al. (2010) observaram que a sincronização do estro utilizando P_4 e E_2 , antes do início do tratamento com e-FSH, não aumentou a resposta ovariana, inclusive com baixa taxa de embriões produzidos por ovulação em comparação ao grupo controle (36% vs 73%, respectivamente), sendo a frequência de folículos anovulatórios no grupo tratado com e-FSH de 28%.

Após a detecção de um ou mais folículos ≥ 35 mm a aplicação do e-FSH deve ser interrompida. Um período variando entre 30 e 36 horas pode ser adotado para o intervalo entre a última aplicação do e-FSH e a indução da ovulação com hCG. Este período é denominado de *coasting* e visa permitir a diminuição das concentrações de FSH durante a fase final de maturação dos folículos (RAZ; CARD, 2009).

O e-FSH promove o crescimento de um número maior de folículos, porém com uma taxa de ovulação menor que o número de folículos pré-ovulatórios. Esta falha na ovulação pode se dever a diversos fatores, como: mudança nos níveis hormonais, estimulação insuficiente pelos análogos do LH, alteração no número de receptores para LH, mudança na afinidade dos receptores para gonadotrofinas e a limitação física da fossa da ovulação (LOGAN et al., 2007; RAZ; CARD, 2009).

O e-FSH parece produzir um maior número de embriões com morfologia alterada, tanto na fase de transição da primavera, quanto no meio da estação reprodutiva (RAZ et al., 2009). Além disso, o e-FSH modifica o tônus e o edema uterino, e promove uma

variação nas concentrações séricas de P_4 e E_2 e estas alterações podem estar associadas às altas taxas de folículos anovulatórios e às baixas taxas de prenhez (RAZ et al., 2011).

Gonadotrofinas recombinantes tem sido tema de recentes pesquisas buscando o sucesso da SOV em éguas. Meyers-Brown et al. (2010), utilizando o re-FSH, demonstraram que há uma maior concentração plasmática de estradiol nas éguas superovuladas, resultando em menores concentrações plasmáticas de LH durante o tratamento, no momento peri e pós-ovulatório, quando comparado ao grupo controle. A alta concentração de estrógeno circulante nas éguas superovuladas, possivelmente, impediu a liberação de níveis adequados de LH no período peri-ovulatório e, níveis insuficientes desta gonadotrofina, podem comprometer a maturação folicular e ovocitária.

Meyers-Brown et al. (2011) testaram a aplicação de re-FSH e re-LH, com indução da ovulação com hCG quando era detectado um ou mais folículos com diâmetro ≥ 35 mm, sem o período *coasting*. Os autores verificaram que a associação entre re-FSH e re-LH criou um ambiente mais favorável para a maturação dos ovócitos, proporcionou um maior número de ovulações ($4,6 \pm 0,9$ vs $3,0 \pm 0,6$) e de embriões recuperados ($3,9 \pm 0,9$ vs $2,0 \pm 0,5$), quando comparado ao uso isolado do re-FSH, corroborando a importância do LH nos estádios finais da maturação ovocitária.

A SOV em éguas promove um aumento do fluxo sanguíneo, tanto para os ovários quanto para o útero. O aumento do aporte sanguíneo está relacionado ao maior número de folículos pré-ovulatórios, que por sua vez aumentam os níveis séricos de E_2 , elevando o fluxo sanguíneo uterino por seu efeito vasodilatador (WITT et al., 2012).

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

Desta forma, pode-se verificar que as diferentes substâncias usadas na SOV de éguas têm suas vantagens e desvantagens. O uso do EPE resulta em grande variação da taxa ovulatória, mas quando associado ao hCG promove um aumento no número de folículos disponíveis para a ovulação, além de ter efeito positivo sobre a maturação folicular (BLANCO et al., 2009). O e-FSH embora aumente a taxa ovulatória, não produz uma elevação correspondente no número de embriões recuperados, além destes apresentarem alterações morfológicas (RAZ; CARD, 2009) e o emprego da progesterona e do estradiol antes da SOV com o e-FSH não aumenta a resposta ovariana e intensifica o manejo das éguas (RAZ et al. 2010). O re-FSH promove aumento das concentrações de estradiol e, portanto, redução dos níveis de LH, comprometendo a maturação folicular e ovocitária. Por outro lado, quando é feita a associação entre re-FSH e re-LH verifica-se

um aumento no número de ovulações e de embriões recuperados (MEYERS-BROWN et al., 2011). Por fim, o acetato de deslorelina se mostra efetivo na indução de ovulações duplas, com taxa de recuperação embrionária similar àquela obtida à ovulação única (NAGAO et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, a SOV busca recrutar o maior número de folículos de uma onda com consequente aumento no número de ovulações e embriões produzidos. Porém, ainda existem barreiras que impedem que esta biotécnica se torne rotina na reprodução equina, como a falta de um produto comercial padronizado e o baixo número de embriões produzidos em relação à taxa de ovulação. Portanto, mais pesquisas devem ser direcionadas na busca da padronização do protocolo de SOV, sendo que o emprego de gonadotrofinas recombinantes parece ter um maior potencial para a uniformização dos resultados desta biotécnica.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J.; NEVES NETO, J. R.; SQUIRES, E. L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*, v.56, p.879-887, 2001.
- ARAUJO, G. H. M.; ROCHA FILHO, A. N.; LOPES, E. P.; MOYA, C. F.; ALVARENGA, M. A. Use of a low dose of equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p.380-383, 2008.
- BLANCO, I. D. P.; DEVITO, L. G.; FERREIRA, H. N.; ARAUJO, G. H. M.; FERNANDES, C. B.; ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Aspiration of equine oocytes from immature follicles after treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. *Animal Reproduction Science*, v.114, p.203-209, 2009.
- CARMO, M. T.; LOSINNO, L.; AQUILAR, J. J.; ARAUJO, G. H. M.; ALVARENGA, M. A. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.337-339, 2006.
- CULLINGFORD, E. L.; SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; SEIDEL, G. E. Attempts at superovulation of mares with porcine follicle stimulating hormone and recombinant equine follicle stimulating hormone. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.30, n.6, p.305-309, 2010.
- DOUGLAS, R. H.; NUTI, L.; GINTHER, O. J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology*, v.2, p.133-142, 1974.
- FARINASSO, A. *Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas*. 2004. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

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

McCUE, P. M.; LEBLANC, M. M.; SQUIRES, E. L. eFSH in clinical equine practice. *Theriogenology*, v.68, p.429-433, 2007.

MEYERS-BROWN, G.; BIDSTRUP, L. A.; FAMULA, T. R.; COLGIN, M.; ROSER, J. F. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. *Animal Reproduction Science*, v.128, p.52-59, 2011.

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

NAGAO, J. F.; NEVES NETO, J. R.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. *Animal Reproduction Science*, v.132, p.69-73, 2012.

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

RAZ, T.; AMORIM, M. D.; STOVER, B. C.; CARD, C. E. Ovulation, pregnancy rate and early embryonic development in vernal transitional mares treated with equine- or porcine-FSH. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.287-294, 2010.

RAZ, T.; GREEN, G. M.; CARLEY, S. D.; CARD, C. E. Folliculogenesis, embryo parameters and post-transfer recipient pregnancy rate following equine-estimating hormone (eFSH) treatment in cycling donor mares. *Australian Veterinary Journal*, v.89, n.4, p.138-142, 2011.

RAZ, T.; HUNTER, B.; CARLEY, S.; CARD, C. Reproductive performance of donor mares subsequent to eFSH treatment in early vernal transition: Comparison between the first, second, and mid-season estrous cycles of the breeding season. *Animal Reproduction Science*, v.116, p.107-118, 2009.

RAZ, T.; CARD, C. Efficiency of superovulation and in vivo embryo production in eFSH-treated donor mares after estrus synchronization with progesterone and estradiol-17 β . *Theriogenology*, v.71, p.169-178, 2009.

RIERA, F. L.; ROLDÁN, J. E.; HINRICHS, K. Patterns of embryo recovery in mares with unilateral and bilateral double ovulations. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.398-399, 2006.

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

SQUIRES, E. L. Superovulation in mares. *Veterinary Clinics North America. Equine Practice*, v.22, p.819-830, 2006.

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

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

SQUIRES, E. L.; McKINNON, A. O.; CARNEVALE, E. M. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulating mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.35, p.399-403, 1987.

WITT, M. C.; BOLLWEIN, H.; PROBST, J.; BAACKMANN, C.; SQUIRES, E. L.; SIEME, H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. *Theriogenology*, v.77, p.1406-1414, 2012.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Recent studies relating to the collection of multiple embryos in mares. *Theriogenology*, v.19, p.101-108, 1983.

Recebido em: dez. 2012

Aceito em: jan. 2013