

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LIÉDGE CAMILA SIMIONI FELICIO

**PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO BASEADAS EM PROTOCOLOS
PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO COM VISTAS À
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM SÊMEN FRESCO OU
CONGELADO EM EQUINOS**

Embryo production and transfer based on protocols for synchronization of estrus and ovulation to timed-artificial insemination with fresh or frozen semen in equine

**CURITIBA
2019**

LIÉDGE CAMILA SIMIONI FELICIO

**PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO BASEADAS EM PROTOCOLOS
PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO COM VISTAS À
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM SÊMEN FRESCO OU
CONGELADO EM EQUINOS**

Embryo production and transfer based on protocols for synchronization of estrus and ovulation to timed-artificial insemination with fresh or frozen semen in equine

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador(a): Luiz Ernandes Kozicki

CURITIBA

2019

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

F314p
2019 Felício, Liédge Camila Simioni
Produção e transferência de embrião baseadas em protocolos para a sincronização do estro e da ovulação com vistas à inseminação artificial em tempo fixo com sêmen fresco ou congelado em equinos = Embryo production and transfer based on protocols for synchronization of estrus and ovulation to timed-artificial insemination with fresh or frozen semen in equine / Liédge Camila Simioni Felício ; orientador, Luiz Ernandes Kozicki. -- 2019
29 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019.
Bibliografia: p. 26-29

1. Equino – Inseminação artificial. 2. Sincronização do estro. 3. Reprodução animal. I. Kozicki, Luiz Ernandes, 1949-
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título. IV: Embryo production and transfer based on protocols for synchronization of estrus and ovulation to timed-artificial insemination with fresh or frozen semen in equine.

CDD 23 ed. 636.108245



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

**ATA Nº 0134 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA LIÉDGE CAMILA SIMIONI FELÍCIO**

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, às 14 horas, realizou-se na sala Tele Saúde, 1º andar, Bloco Verde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa de dissertação da mestranda Liédge Camila Simioni Felício, intitulada: “PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO BASEADAS EM PROTOCOLOS PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO COM VISTAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM SÊMEN FRESCO OU CONGELADO EM EQUINOS”. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor Orientador e Presidente da banca, Dr. Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Adriana Pires Neves (UNIPAMPA) e Carlos Eduardo Camargo (PUCPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada

APROVADA.

Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki (Presidente)

Assinatura [Assinatura]

Profa. Dra. Adriana Pires Neves (UNIPAMPA)

Assinatura [Assinatura]

Prof. Dr. Carlos Eduardo Camargo (PUCPR)

Assinatura [Assinatura]

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2019.

[Assinatura]
Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

[Assinatura]
Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-------------|
| DEDICATÓRIA | vi |
| AGRADECIMENTOS | vii |
| FORMATO DA DISSERTAÇÃO | viii |
| RESUMO GERAL | ix |
| ABSTRACT | xi |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO..... | 1 |
| CAPÍTULO 2 | 5 |
| PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO BASEADAS EM PROTOCOLOS PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO COM VISTAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM SÊMEN FRESCO OU CONGELADO EM EQUINOS..... | 6 |
| CAPITULO 3 | 26 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 26 |
| REFERÊNCIAS | 27 |

Dedico á minha família por serem minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu professor orientador Luiz Ernandes Kozicki por ter me mostrado o verdadeiro amor pela reprodução.

À minha filha Isabela e ao meu marido Gabriel, sem os quais nada disso seria possível.

Aos meus pais que sempre estiveram comigo.

Aos meus verdadeiros amigos Anderlise e João, junto aos quais eu sou feliz pela verdadeira amizade constituída.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) pela abertura de portas, parte integrante da realização do meu sonho.

À CAPES pela ajuda proporcionada. Aos que involuntariamente deixamos de mencionar aqui. A todos, meus agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização, justificativa do tema e os objetivos do estudo, itens determinados pelo Regulamento do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da PUCPR. O capítulo 2 trata do artigo científico completo e posteriormente será formatado nas normas de um Periódico ao qual será submetido. O capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais assim como perspectivas e sugestões para estudos futuros. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

O estudo objetivou testar dois protocolos hormonais com vistas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em éguas, mediante protocolos baseados em prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), acetato de deslorelina (DESL) ou na associação acetato de deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+HCG), considerando os parâmetros de taxa de recuperação embrionária (TRE) das doadoras, taxa de prenhez (TP) das receptoras bem como o estabelecimento do tempo da ovulação (TO; horas) de doadoras (D) e receptoras (R) após o uso dos indutores ovulatórios. Foram utilizados 99 ciclos estrais, relativos às D e 69 às R de embriões, oriundos de 110 éguas de diferentes raças com finalidade comercial. As éguas (D e R) foram alocadas em dois grupos na estação reprodutiva: Grupo deslorelina (DESL; n=79), submetido ao protocolo: dia zero (d0) exames de ultrassonografia (US)+ $PGF_{2\alpha}$ (5 mg, IM); d7/d8 US+1mg de DESL (IM); d9/10 US+ IATF com sêmen congelado ou IATF em d7/d8 com sêmen fresco; em d19 executou-se a recuperação dos embriões e a inovulação e no d23 o diagnóstico de prenhez. O grupo deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+HCG; n= 89), foi submetido a idêntico protocolo, exceto que em d7 recebeu 1mg de DESL (IM) + 1000UI de HCG (IV). Dos 99 ciclos das D, em 71 foram empregados sêmen congelado (uma IA antes da ovulação e uma IA pós ovulação) e em 28 utilizou-se sêmen a fresco. Dos 69 embriões transferidos às receptoras, 50 eram oriundos de sêmen congelado e 19 de sêmen a fresco. Éguas D e R, não evidenciaram diferença no diâmetro (mm) do folículo pré-ovulatório, na TRE ou na TP entre e nos grupos; porém, verificou-se diferença ($P<0,0001$) no tempo (horas) de ovulação após a aplicação dos indutores da ovulação entre os grupos DESL e DESL+HCG inseminados com sêmen fresco ou com sêmen congelado. As TREs das D, resultaram em 71,42% (com DESL) e 64,28% (DESL+HCG) nos animais inseminados com sêmen fresco, e 66,66% (DESL) e 73,68% (DESL + HCG) nos inseminados com sêmen congelado. A TP nas R de embriões oriundos de sêmen fresco resultou em 70% (DESL) e 55,55% (DESL+HCG), e a TP das R inovuladas com embriões de sêmen congelado 59,09% (DESL) e 60,71% (DESL+HCG) ($P>0,05$). Conclusões: Não houve diferenças nas TREs e TPs entre os protocolos; ambos os protocolos foram eficientes na indução à

ovulação; a deslorelina induziu a ovulação às 44,4 horas após sua administração, e a combinação deslorelina e gonadotrofina coriônica humana, 39,6 h ($P < 0,0001$); as indicações de tempo de ovulação pós aplicação dos indutores, poderão servir de suporte aos avanços à inseminação artificial em tempo fixo nos equinos

Palavras-chave: Inseminação artificial em tempo fixo; Sincronização do estro e da ovulação. HCG. Deslorelina. Éguas.

ABSTRACT

The study aimed at two hormonal protocols in fixed time artificial insemination (FTAI) in association of prostaglandin F_{2α} (PGF₂ placas), deslorelin acetate (DESL) or association of deslorelin acetate + human chorionic gonadotropin (DESL + HCG), considering the parameters of embryo recovery (ERT) of the donors, pregnancy rates (TP) of the recipients as well as the establishment of the ovulation time (OT), the recipients (D) and the recipients (R). after ovulatory use. 99 strains were used, today at D and 69 to R of embryos, from 110 mares of different races for commercial purposes. The mares (D and R) were allocated to two groups at the reproductive season: Deslorelin group (DESL; n = 79), submitted to protocol: day zero (d0) ultrasound examinations (PGF₂); d7 / d8 US + 1 mg DESL (IM); d9 / 10 USA + IATF with frozen resolution or IATF in d7 / d8 with fresco semen; in d19 the embryo recovery is carried out and an innovation and the d23 the diagnosis of pregnancy. The deslorelin group + human chorionic gonadotropin (DESL + HCG; n = 89) was submitted to an identical protocol, except that in 7 patients received 1 mg of DESL (IM) + 1000UI of HCG (IV). Of the 99 cycles of D, 71 were used to freeze (an AI before ovulation and a post ovulation) and 28 were used in a fresco. Of the 69 embryos transferred to recipients, 50 were from frozen semen and 19 from fresh semen. Mares D and R, did not show differences in the diameter (mm) of the preovulatory follicle, in the ERT or in the PT between and in the groups; however, the difference (P <0.0001) in ovulation time (hours) after application of ovulation inducers between the DESL and DESL + HCG groups in programs with more than one or more frozen was verified. As TREs of the D, they resulted in 71.42% (with DESL) and 64.28% (DESL + HCG) in the animals inseminated with fresh fresco, and 66.66% (DESL) and 73.68% inseminated with frozen semen. The TP in the R of embryos originated from fresco senes in 70% (DESL) and 55.55 (DESL + HCG), and the TP of the innovations with embryos of sés in 59,09% (DESL) and 60,71% (DESL + HCG) (P > 0.05). Conclusions: There were no alterations in the TREs and TPs between the protocols; both insertions were efficient at ovulation induction; deslorelin induced production of 39.4 h (p <0.0001); Indications of post-induction ovulation time will be met by advances in fixed-time artificial insemination in horses.

Keywords: Fixed-time artificial insemination; Synchronization of estrus and ovulation.
HCG. Deslorelin. Mares.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

A aplicação das biotecnologias da reprodução assistida em equinos tem sido utilizada em larga escala visando maximizar o potencial reprodutivo, principalmente nos animais com elevado valor genético. Uma das limitações das biotecnologias relaciona-se à eficiência da reprodução assistida, pois esta pode ser prejudicada não só devido ao baixo índice de fertilização como também à recuperação embrionária (Smits et al., 2012; Galli et al., 2013).

O índice de fertilização em éguas pode ser dificultado devido ao longo período fisiológico do estro nas éguas (5 a 7 dias), tornando difícil a previsão do momento exato da ovulação (Ginther, 1993).

A utilização de diferentes protocolos hormonais para a indução da ovulação associada a exames de ultrassonografia, permite a aplicação da biotecnologia da reprodução apropriada no momento exato da ovulação (Gastal et al., 2006; Squires, 2008).

A detecção do momento da ovulação reveste-se da maior importância, pois elevadas taxas de prenhez são verificadas, quando o sêmen é depositado no trato reprodutivo da égua em momento mais próximo à ovulação (Woods et al., 1990).

Neste sentido, o emprego de indutores da ovulação contribui significativamente para a melhoria da eficiência reprodutiva. Os indutores da ovulação promovem a redução do período de estro, sincronizando com maior eficiência o momento das inseminações. A inseminação artificial executada no período de até 48 horas após a indução, resulta em redução de custos com o transporte de sêmen refrigerado e otimiza a eficiência do sêmen congelado, (Mccue et al., 2007). A indução da ovulação acontece de 36 a 48 horas após a aplicação do hormônio indutor (Ginther et al., 1972; Samper, 2001; Samper et al., 2002).

A gonadotrofina coriônica humana (HCG) foi o primeiro agente indutor da ovulação a ser utilizado em éguas de maneira ampla. A HCG é uma glicoproteína com atividade biológica semelhante ao hormônio luteinizante (LH), ligando-se aos receptores de LH do ovário, promovendo estágios finais

de maturação e ovulação do folículo dominante (FD), diminuindo o espaço entre o estro e a ovulação (Rossdale e Lambercht, 1998; Barbacini et al., 2000).

A ovulação após a aplicação do HCG em éguas ocorre em aproximadamente 48 horas à detecção do folículo dominante com diâmetro mínimo de 35mm. No entanto, falhas na indução da ovulação com o HCG são relatadas, devido à formação de anticorpos após o tratamento de 2 a 5 ciclos sucessivos (Roser et al., 1979; Wilson et al., 1990; McCue et al., 2004).

O HCG tem sido utilizado para induzir à ovulação nos dois primeiros ciclos do ano, pelo baixo custo e elevada eficácia, assim como em éguas que não serão submetidas por mais de 2 a 5 ciclos por ano, evitando assim a formação de anticorpos (Sullivan et al., 1973; Barbacini et al., 2000; McCue et al., 2004).

Outro fármaco capaz de induzir à ovulação é o acetato de deslorelina (DESL), que possui a característica de ser agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A administração sistêmica de DESL em éguas no estro estimulará uma liberação pulsátil e prolongada do hormônio folículo estimulante (FSH) e LH pela hipófise anterior, induzindo à maturação final do folículo e ovulação (Meinert et al., 1993; Mumford et al., 1995)

No início dos estudos da utilização da DESL, o fármaco era empregado sob a forma de implante subcutâneo para induzir a ovulação, na presença de folículos maiores ou iguais a 30mm de diâmetro; porém o uso deste dispositivo gerou indesejável aumento no intervalo entre os ciclos estrais (Melo et al., 2012). Por outro lado, a DESL injetável resulta em ovulação na maioria dos casos em até 48 horas (Melo et al., 2012).

Estudos de Boakari et al. (2017) relatam que o LH permaneceu elevado desde o momento da aplicação até o momento da ovulação em éguas tratadas com DESL; em contraposição, éguas tratadas com HCG tiveram uma taxa maior no aumento das concentrações endógenas de LH somente 24 horas após a aplicação. Os protocolos de tratamento para a indução da ovulação com a deslorelina ajudam a estimular as secreções de gonadotrofinas pela hipófise, enquanto o HCG regula o eixo hipófise-hipotálamo e aumenta a probabilidade de uma ovulação bem sucedida (Raz et al., 2009).

A técnica mais utilizada para a evolução da reprodução equina é a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco, refrigerado ou congelado, sendo a qualidade do sêmen, um dos principais fatores determinantes do sucesso (Magistrini et al., 1996; Stradaioli et al., 2004).

De acordo com a sobrevivência média dos espermatozoides dentro do útero da égua, recomenda-se inseminações artificiais a cada 48 horas até a ovulação (Pickett et al., 1987)

Por outro lado, o sêmen congelado de equinos tem uma viabilidade reduzida (6 a 12 horas), em função de uma série de alterações, que as células sofrem durante o processo de resfriamento e congelamento, acarretando menores TRES e TPs (Loomis e Squires, 2005). Assim, recomenda-se que a indução da ovulação seja realizada com HCG ou DESL e que a IA ocorra no tempo o mais próximo possível da ovulação (dentro de 12 horas). A égua deverá ser inseminada no máximo 6 horas antes da ovulação e/ou 6 horas depois, acompanhando com exames de ultrassonografia, visando melhores TRES e/ou TPs (Reger et al., 2003; Loomis e Squires, 2005).

O tempo de viabilidade dos espermatozoides equinos no útero da égua, assim como do ócito após a ovulação (viabilidade de no máximo 12 horas) (Pickett et al., 1987), devem ser considerados. A IA com sêmen congelado executada em no máximo seis horas após a ovulação, aumenta a eficiência das taxas de recuperação embrionária (Reger et al., 2003).

Os protocolos de indução da ovulação e da inseminação artificial atualmente utilizados na espécie equina, podem gerar resultados insatisfatórios, e um custo elevado para o produtor. Um dos custos refere-se às frequentes visitas técnicas do profissional aos locais de produção na estação reprodutiva. Sem a administração de protocolos hormonais para sincronizar o estro e a ovulação, as visitas técnicas resultam em numerosas, onerando a cadeia reprodutiva.

Visando minimizar custos e tempo dispendido, o emprego de indutores da ovulação tem sido utilizado isoladamente. Por sua vez, a associação de dois indutores da ovulação tais como a deslorelina + a gonadotrofina coriônica humana (DESL+HCG) tem sido pouco empregada, particularmente pela eficiência dos indutores quando utilizados separadamente e também pelo investimento econômico (Ginther, 1993; Gastal et al., 2006; Squires, 2008).

A hipótese do presente estudo é a de que o sinergismo da DESL+HCG resulte em mais eficiente sincronização do estro e da ovulação, que quando administrados isoladamente em programas de IA e TE em equinos.

O objetivo do estudo foi testar dois protocolos hormonais em programas de produção, inseminação artificial em tempo fixo e transferência de embrião em equinos, utilizando como indutores da ovulação o acetato de deslorelina (isoladamente administrado) ou o acetato de deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (aplicados simultaneamente), tendo como parâmetros reprodutivos, a taxa de recuperação embrionária, a taxa de prenhez e o tempo da ovulação após o uso de sêmen congelado ou a fresco.

CAPITULO 2

O artigo científico completo seguinte vai ser submetido para publicação no periódico *Theriogenology* e posteriormente será adaptado às normas do periódico.

**PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO BASEADAS EM
PROTOCOLOS PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO
COM VISTAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM SÊMEN
FRESCO OU CONGELADO EM EQUINOS**

RESUMO – O estudo objetivou testar dois protocolos hormonais com vistas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em éguas, mediante protocolos baseados em prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), acetato de deslorelina (DESL) ou na associação acetato de deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+HCG), considerando os parâmetros de taxa de recuperação embrionária (TRE) das doadoras, taxa de prenhez (TP) das receptoras bem como o estabelecimento do tempo da ovulação (TO; horas) das doadoras (D) e receptoras (R) após a aplicação dos indutores ovulatórios. Foram utilizados 99 ciclos estrais, relativos às D e 69 às R de embriões, oriundos de 110 éguas de diferentes raças com finalidade comercial. As Doadoras e Receptoras foram alocadas em dois grupos na estação reprodutiva: Grupo deslorelina (DESL; n=79), submetido ao protocolo: dia zero (d0) exames de ultrassonografia (US)+ $PGF_{2\alpha}$ (5 mg, IM); d7/d8 US+1mg de DESL (IM); d9/10 US+ IATF com sêmen congelado ou IATF em d7/d8 com sêmen fresco; em d19 executou-se a recuperação dos embriões e a inovulação e no d23 o diagnóstico de prenhez. O grupo deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+HCG; n= 89), foi submetido a idêntico protocolo, exceto que em d7 recebeu 1mg de DESL (IM) + 1000UI de HCG (IV). Dos 99 ciclos das D, em 71 foram empregados sêmen congelado (uma IA antes da ovulação e uma IA pós ovulação) e em 28 utilizou-se sêmen a fresco. Dos 69 embriões transferidos às receptoras, 50 eram oriundos de sêmen congelado e 19 de sêmen a fresco. Éguas D e R, não evidenciaram diferença no diâmetro (mm) do folículo pré-ovulatório, na TRE ou na TP entre e nos grupos; porém, verificou-se diferença ($P<0,0001$) no tempo (horas) de ovulação após a aplicação dos indutores da ovulação entre os grupos DESL e DESL+HCG inseminados com sêmen fresco ou com sêmen congelado. As TREs das D, resultaram em 71,42% (com DESL) e 64,28% (DESL+HCG) nos animais inseminados com sêmen fresco, e 66,66% (DESL) e

73,68% (DESL + HCG) nos inseminados com sêmen congelado. A TP nas R de embriões oriundos de sêmen fresco resultou em 70% (DESL) e 55,55% (DESL+HCG), e a TP das R inovuladas com embriões de sêmen congelado 59,09% (DESL) e 60,71% (DESL+HCG) ($P>0,05$). Conclusões: Não houve diferenças nas TREs e TPs entre os protocolos; ambos os protocolos foram eficientes na indução à ovulação; a deslorelina induziu a ovulação às 44,4 horas após sua administração, e a combinação deslorelina e gonadotrofina coriônica humana, às 39,6 h ($P<0,0001$); as indicações de tempo de ovulação pós aplicação dos indutores, poderão servir de suporte aos avanços à inseminação artificial em tempo fixo nos equinos.

Palavras chaves: Inseminação artificial em tempo fixo; Sincronização do estro e da ovulação. HCG. Deslorelina. Éguas.

1. INTRODUÇÃO

Durante o período de reprodução das éguas, determinar o momento correto da inseminação artificial é essencial para maximizar a taxa de prenhez (McCue et al., 2007). A taxa de fertilização em éguas pode ser prejudicada devido ao longo período fisiológico do estro nas éguas (5 a 7 dias), tornando difícil a previsão do momento exato da ovulação (Ginther, 1993). A detecção do momento da ovulação reveste-se de grande importância, pois elevadas taxas de prenhez são verificadas, quando o sêmen é depositado no trato reprodutivo da égua em momento mais próximo à ovulação (Woods et al., 1990).

A técnica mais utilizada para a otimização da reprodução equina é a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco, refrigerado ou congelado, sendo a qualidade do sêmen, um dos principais fatores determinantes do sucesso (Magistrini et al., 1996; Stradaioli et al., 2004).

De acordo com a taxa de sobrevivência média dos espermatozoides no útero da égua, recomenda-se inseminações artificiais a cada 48 horas com sêmen fresco até a ovulação (Pickett et al., 1987). Por outro lado, o sêmen congelado de equinos tem uma viabilidade reduzida (6 a 12 horas), em função de uma série de alterações, que as células sofrem durante o processo de

resfriamento e congelamento, acarretando menores TREs e TPs (Loomis e Squires, 2005).

O emprego de indutores da ovulação contribui significativamente para a melhoria da eficiência reprodutiva, promovendo a redução do período de estro e sincronizando com maior eficiência o momento das ovulações e das inseminações. A inseminação artificial executada no período de até 48 horas após a indução da ovulação, resulta em redução de custos com o transporte de sêmen refrigerado e otimiza a eficiência do sêmen congelado (McCue et al., 2007). Terapias indutoras da ovulação com deslorelina ou Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG) estimulam a maturação final do folículo e promovem a ovulação dentro de 48 horas (Barbacini et al., 2000; McCue et al., 2007). A deslorelina (DESL) é um agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A administração sistêmica de DESL em éguas no estro estimulará uma liberação pulsátil e prolongada do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior, induzindo à maturação final do folículo e à ovulação (Meinert et al., 1993; Mumford et al., 1995). Por sua vez, o HCG é uma glicoproteína com atividade biológica semelhante ao hormônio luteinizante (LH), ligando-se aos receptores de LH do ovário, e atuando nos estágios finais de maturação e ovulação do folículo dominante (FD), (Rossdale e Lambercht, 1998; Barbacini et al., 2000). Visando minimizar custos e tempo despendido pelos profissionais da área, o emprego de indutores da ovulação tem sido utilizados isoladamente ou combinados.

A hipótese do presente estudo é a de que a associação da DESL + HCG resulte na sincronização do estro e no encurtamento do tempo de ovulação, assim como na concentração das ovulações, que quando administrados isoladamente em programas de IA e TE em equinos.

O objetivo do estudo foi testar dois protocolos hormonais em programas de produção, inseminação artificial em tempo fixo e transferência de embrião em equinos, utilizando como indutores da ovulação o acetato de deslorelina (administrado isoladamente) ou o acetato de deslorelina + a gonadotrofina coriônica humana (aplicados simultaneamente), tendo como parâmetros reprodutivos, o aumento das taxas de recuperação embrionária das doadoras, aumento da taxa de prenhez das receptoras após o uso de sêmen congelado ou a fresco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram avaliados 168 ciclos estrais de 110 éguas em uma estação reprodutiva (novembro a março de 2017/2018 – hemisfério sul). As éguas eram de diferentes raças: Brasileiro de Hipismo, Puro Sangue Inglês, Puro Sangue Árabe, Quarto de Milha, Mangalarga Marchador e Crioula, tendo idade média de 6,5 anos (4 -16) e peso médio de 525 kg (400 – 650). Os animais encontravam-se com escore da condição corporal 3.0 (1 = muito magra; 5 = obesa; Henneke et al., 1983). O estudo foi conduzido em haras situados na latitude 25° 32' 05" S; longitude 49° 12' 23" W e na latitude 22° 44' 22" S; longitude 45° 35' 29" W). As éguas eram mantidas em sistema semi-extensivo de pastoreio, com acesso diário de feno de alfafa, pastagem de tifton e água a vontade, além de ração peletizada composta por ferro, selênio, zinco, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, biotina, cobre, manganês e cobalto, matéria mineral (9%), proteína (12%) e carboidratos.

2.2 Doadoras de embrião

No D0 foram selecionadas como doadoras de embrião, somente éguas portadoras de corpo lúteo e folículos menores que 20mm (n = 99 ciclos estrais), livres de anormalidades clínicas do trato reprodutivo (Mindray 2200, transdutor endorectal 75L50esv, Shenzhen, China). Animais que no dia zero do protocolo, não detinham corpo lúteo ou folículo menor que 20 mm de diâmetro, não eram inclusos no estudo. Esses animais eram reavaliados no ciclo seguinte. Caso apresentassem as características desejadas no D0 passavam a condição de animais integrantes da pesquisa.

Os grupos dos animais foram distribuídos de acordo com o indutor da ovulação (deslorelina ou associação deslorelina + HCG) utilizado e com o tipo de sêmen utilizado (fresco ou congelado). As éguas foram acompanhadas com avaliação ultrassonográfica por dois operadores experientes para determinação do diâmetro do folículo pré-ovulatório (\varnothing FPO; mm), tempo de ovulação (TO; horas) após a aplicação do(s) indutor(res) e taxa de recuperação embrionária

(TRE) de acordo com o sêmen utilizado (fresco ou congelado). A ovulação foi induzida quando a imagem ultrassonográfica do FPO apresentava-se \geq que 35mm de diâmetro e edema uterino grau três (Gastal et al., 2006).

Grupos constituídos de animais:

Grupo deslorelina sêmen fresco (DESL; n=14) = recebeu 1 mg de Acetato de deslorelina (IM) e foi inseminado com sêmen fresco.

Grupo deslorelina+gonadotrofina coriônica humana sêmen fresco (DESL+HCG; n= 14) = 1 mg de acetato de deslorelina + 1.000UI de gonadotrofina coriônica humana (IM) e inseminado com sêmen fresco.

Grupo deslorelina congelado (DESL; n=33) = 1mg de Acetato de Deslorelina e foi inseminado com sêmen congelado.

Grupo deslorelina+gonadotrofina coriônica humana Congelado (DESL+HCG; n= 38) = 1 mg de Acetato de Deslorelina + 1.000UI de gonadotrofina coriônica humana e foi inseminado com sêmen congelado (Figura 1).

2.2.1 Éguas inseminadas com sêmen fresco ou congelado

No primeiro dia (D0) do protocolo o trato reprodutivo das fêmeas foi avaliado por exames ultrassonográficos. As éguas que apresentavam corpo lúteo e um folículo menor que 20mm recebiam 5mg de prostaglandina F₂ α (Lutalyse®, Zoetis™, Guarulhos, SP) (IM). No D7–D8, as fêmeas que na imagem ultrassonográfica apresentassem edema uterino (Samper et al., 2002) e ovário com folículo \geq 35mm, eram submetidas à indução da ovulação com DESL ou DESL + HCG de acordo com o seu grupo experimental e inseminadas com o sêmen fresco.

O sêmen foi colhido com a utilização de vagina artificial modelo Botupharma (Botupharma®, Botucatu, Brasil), usando a metodologia de colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 40°C e a utilização de um manequim.

O cálculo de dose espermática para a utilização do sêmen fresco foi feito através da avaliação da concentração espermática por câmara de Neubauer e utilizada a dose inseminante variando de 800 a 1000 x 10⁶ espermatozoides com movimentos progressivos.

Após as avaliações, o sêmen fresco era diluído em meio diluente comercial à base de leite desnatado Botu-Semen® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente (1:1) e depositado diretamente no corpo do útero com pipeta rígida, guiada manualmente pelo profissional.

No D9/D10 após 36 horas da aplicação do(s) indutor(res) da ovulação a dinâmica folicular das éguas era avaliada (US) de duas em duas horas para determinar o momento da ovulação.

Nos animais destinados a receberem a inseminação artificial com sêmen congelado foram executados exames de ultrassonografia pré e pós ovulação (D9/D10) de acordo com a imagem ultrassonográfica. Considerou-se ovulação quando não mais se constatou a presença do folículo dominante do último exame ultrassonográfico.

O sêmen congelado foi depositado no corno uterino *ipsilateral* ao ovário que apresentava o folículo dominante com pipeta longa e flexível. As doses inseminantes (antes da ovulação e após ovulação) foram de 70x10⁶ espermatozoides (0,5 mL de sêmen). Protocolo de descongelamento das palhetas de 0,5ml de sêmen: banho-maria a 46°C imersas em água por 20 segundos, seguido de análise da motilidade e vigor. No D19 era feito a coleta e a transferência de embrião para a receptora.

A avaliação da qualidade do sêmen foi executada mediante uma pequena porção utilizando-se microscópio óptico com placa aquecedora. Uma gotícula de sêmen era depositada entre uma lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 35-37°C, para avaliação das características de motilidade total e progressiva baseando-se em uma escala de percentual (0-100%) e vigor espermático avaliado de (1 a 5) (CBRA, 2013).

Os critérios de utilização do sêmen congelado foram ejaculados com mais de 30% de motilidade espermática progressiva e do sêmen fresco mais de 60% de motilidade espermática. Ambos os tipos de sêmen apresentavam vigor espermático entre 2 e 3 (CBRA, 2013).

Diagrama dos protocolos aplicados às doadoras de acordo com os tipos de sêmen utilizados:

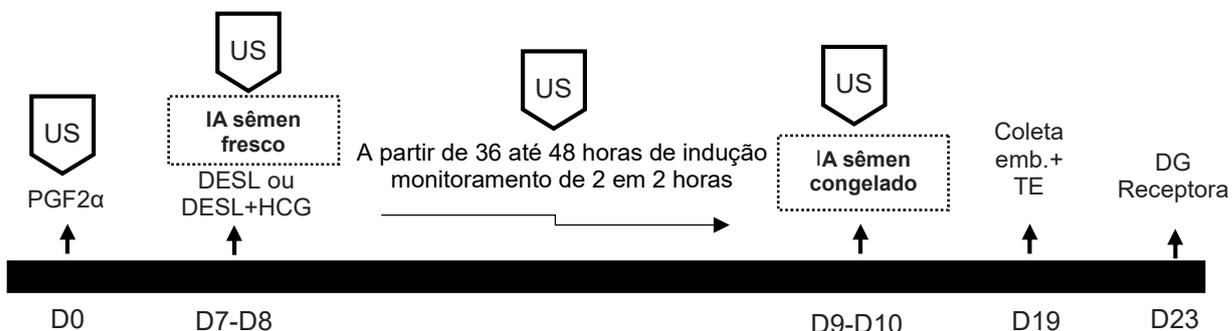


Figura 1: Diagrama do protocolo administrado às éguas doadoras de embriões, submetidas a aplicação de DES ($n=14$) ou $\text{DES}+\text{HCG}$ ($n=14$) e inseminadas artificialmente com sêmen a fresco; e aplicação de DES ($n=33$) ou $\text{DES}+\text{HCG}$ ($n=38$) e inseminadas artificialmente com sêmen congelado.

2.2.4 Recuperação embrionária

A recuperação embrionária foi feita, introduzindo-se a sonda para coleta de embrião (Minitube, Porto Alegre, RS, Brasil) via transcervical, até alojá-la no corpo uterino. O balão da sonda era inflado com 40mL de ar, e imediatamente a sonda era tracionada para se obter o contato do balão com o primeiro anel da cérvix. Após a fixação da sonda no corpo uterino, 1000mL de solução de Ringer-Lactato (Fresenius Kabi Brasil Ltda., Barueri, SP, Brasil) aquecido a 37°C era infundido intrauterinamente de uma só vez; após a infusão o conteúdo era retirado do útero por gravidade, repetindo-se a operação por mais duas vezes, totalizando 3000mL de lavado uterino. Todo o líquido drenado do útero passava através de um filtro ($75\mu\text{m}$) para reter o embrião. No filtro aproximadamente 30ml do meio era deixado. Após a obtenção do lavado uterino, embriões eram procurados e avaliados tendo-se como base a fase do desenvolvimento e grau de qualidade. Os embriões recuperados deveriam estar nas fases de blastocisto, blastocisto inicial ou blastocisto expandido. Somente embriões de excelente e boa qualidade foram transferidos para as receptoras. O critério para se determinar a qualidade dos embriões obedeceu às Normas do Manual Internacional da Sociedade de Transferência de Embriões (Manual of the International Embryo Transfer Society, 1998).

Posteriormente às avaliações, os embriões eram lavados e transferidos a fresco às receptoras através do meio de manutenção para embriões Botuembryo Holding (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil). Os embriões foram depositados diretamente no corpo do útero com a utilização de pipeta de inseminação artificial (PROVAR; Provar Produtos Veterinários, São Paulo).

2.3 Receptoras de embrião

As éguas receptoras de embrião apresentavam peso de 380 a 500 kg, e idade entre 5 e 15 anos, portando bom desenvolvimento da glândula mamaria e habilidade materna previamente conhecida (Squires et al., 1999).

As receptoras foram submetidas a idêntico protocolo de indução da ovulação das doadoras, exceto a diferença de dois dias a mais no D0. Os animais foram acompanhados com exames ultrassonográficos para determinação do diâmetro do folículo pré-ovulatório (\varnothing FPO), tempo de ovulação (TO, horas) após a aplicação do(s) indutor(es) (acompanhamento de 2 em 2 horas após 36 horas de indução) e taxa de prenhez de acordo com os embriões oriundos de sêmen congelado ou fresco.

As receptoras tiveram a prenhez confirmada quatro dias após a transferência do embrião (= D23).

Diagrama do protocolo aplicado às receptoras:

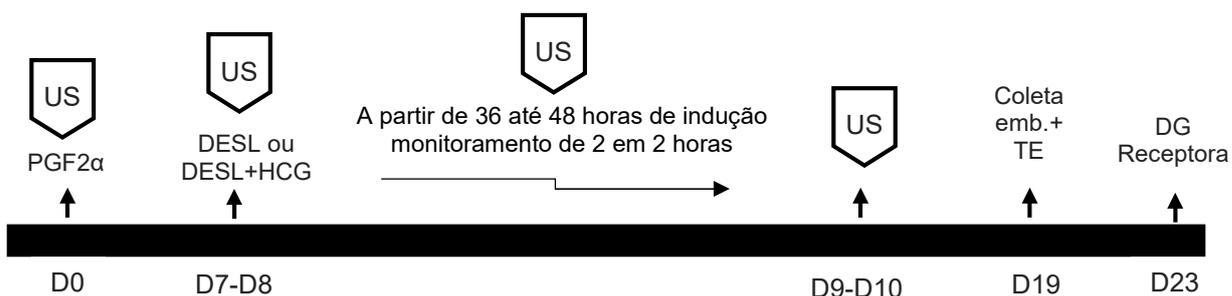


Figura 2: Diagrama do protocolo administrado às éguas receptoras de embriões, submetidas a aplicação de DESL (n=10) ou DESL + HCG (n=09) e inovuladas com embriões oriundos de sêmen fresco; ou à aplicação de DESL (n=22) ou DESL + HCG (n=28) e inovuladas com embriões oriundos de sêmen congelado.

Legenda dos protocolos aplicados nas éguas doadoras e receptoras. Dia 0: ultrassonografia (US) dos ovários e útero; PGF2 α (5mg, IM; Lutalyse, ZoetisTM, Guarulhos, SP). DESL (1mg; IM Sincrorrelin, Ourofino, Cravinhos,SP); HCG (1000 UI, IV, Vetecor, Hertape Calier, Juatuba, MG). D9 - 10: US de 2 em 2 horas até o momento da ovulação a partir de 36 horas de indução. D19: Transferência de Embrião (TE). D23: Diagnóstico de Gestação (DG) da receptora.

Análise Estatística

As médias de diâmetro do folículo ovulatório (FPO) e tempo de ovulação (TO, horas) foram comparadas segundo fêmea doadora ou receptora, segundo o indutor da ovulação (DESL ou DESL+HCG) e o tipo de sêmen (fresco ou congelado), pela análise de variância (ANOVA), utilizando o teste Tukey (significância ao nível de $P < 0,05$). O teste Qui-quadrado foi utilizado para testar a diferença na taxa de recuperação embrionária das doadoras e taxa de prenhez nas receptoras de acordo com o tipo de sêmen e o indutor da ovulação. Executou-se a regressão logística da TRE considerando-se as variáveis: diâmetro do folículo pré-ovulatório, tempo de ovulação decorrido após a aplicação do indutor da ovulação, idade, peso e a localização dos animais foi avaliada pela análise *Qui-quadrado Goodness of Fit Test*. A correlação de Pearson foi utilizada para determinar a correlação existente entre FPO e TO.

3. RESULTADOS

3.1 DOADORAS

Dos 168 ciclos estrais avaliados, 99 ciclos foram de éguas doadoras de embriões. Não houve diferenças no diâmetro do folículo pré-ovulatório (\varnothing FPO) e nem na taxa de recuperação embrionária (TRE) para os diferentes protocolos de indução, bem como para os diferentes tipos de sêmen utilizados na inseminação. O tempo de ovulação após a aplicação do indutor (TO) resultou

em diferenças entre os grupos inseminados com sêmen fresco ($P=0,0001$) e entre os grupos inseminados com sêmen congelado ($P= 0,0001$) (Tabela 1)

Tabela 1 – Tipos de sêmen, diâmetro (\varnothing) do folículo pré-ovulatório, tempo de ovulação (TO) após administração de deslorelina (DESL) ou deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+ HCG) e taxa de recuperação embrionária (TRE) em éguas doadoras de embriões.

| Grupos | Tipo de sêmen (n=99 ciclos) | \varnothing Folículo pré ovulatório ($x\pm s$; mm;) | Ovulação pós indutor (TO) ($x\pm s$; horas) | Taxa recuperação embrionária % (n) |
|----------|--------------------------------|---|---|--|
| DESL | Fresco: (n=14) | 39,42 \pm 1,78 ^a | 45,14 \pm 3,30 ^a | 71,42 (10/14) ^a |
| DESL+HCG | Fresco: (n=14) | 39,42 \pm 3,87 ^a | 39,71 \pm 2,12 ^b | 64,28 (9/14) ^a |
| DESL | Congelado: (n=33) | 39,39 \pm 1,98 ^a | 43,75 \pm 3,10 ^a | 66,66(22/33) ^a |
| DESL+HCG | Congelado: (n=38) | 39,23 \pm 2,13 ^a | 39,63 \pm 1,21 ^b | 73,68 (28/38) ^a |

Letras diferentes na mesma coluna indicam significância $P < 0,05$.

Para a avaliação do \varnothing FPO e TO foi utilizado o teste de Tukey, e da TRE o teste de qui-quadrado

A tabela 2 apresenta a relação da taxa de recuperação embrionária (TRE) de acordo com o(s) indutor(es) utilizado(s). Evidenciou-se que para os indutores DESL+HCG, o tempo de ovulação foi menor e com menor variação de tempo dentro do grupo analisado ($P=0,0001$). A taxa de recuperação embrionária no DESL+HCG, resultou em diferença de 3,07% superior ao DESL ($P>0,05$), assim como não houve diferença entre os diâmetros dos folículos pré-ovulatórios (\varnothing FPO) entre os grupos.

Independente do indutor não houve diferenças estatísticas entre sêmen fresco e congelado em relação a taxa de recuperação embrionária.

Tabela 2 – Diâmetro (\varnothing) do folículo pré-ovulatório, tempo de ovulação (TO) e taxa de recuperação embrionária após administração de deslorelina (DESL) ou deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+ HCG) em éguas doadoras de embriões.

| Grupos (geral) | \varnothing Folículo pré ovulatório ($\bar{x}\pm s$; mm;) | Ovulação pós indutor (TO) ($\bar{x}\pm s$; horas) | Taxa de recuperação embrionária % (n) |
|-------------------|--|---|---|
| DESL (n=47) | 39,40 \pm 1,90 ^a | 44,17 \pm 3,19 ^a | 68,08 (32/47) ^a |
| DESL+HCG (n=52) | 39,28 \pm 2,67 ^a | 39,65 \pm 1,49 ^b | 71,15 (37/52) ^a |

Letras diferentes na mesma coluna indicam significância $P < 0,05$.

Para a avaliação do \varnothing FPO e TO foi utilizado o teste de Tukey, e para a TRE foi utilizado o qui-quadrado.

3.2 RECEPTORAS

Dos 168 ciclos estrais avaliados, 69 ciclos foram de éguas receptoras de embriões (Tabela 3). Não houve diferença na taxa de prenhez pós inovulação dos embriões entre os grupos, assim como não se observou diferença para o diâmetro do folículo pré ovulatório (\varnothing FPO) entre os grupos induzidos com DESL ou DESL+HCG e inseminados com sêmen fresco ou congelado. Ainda nesta tabela, observa-se que o tempo de ovulação (TO) pós aplicação dos diferentes indutores foi menor para DESL+HCG comparado ao DESL quando utilizada inseminação com sêmen fresco ou mesmo sêmen congelado ($P=0,0001$).

Tabela 3: Tipo de sêmen, diâmetro (\varnothing) do folículo pré-ovulatório, tempo de ovulação (TO) após o indutor, taxa de prenhez em éguas receptoras tratadas com deslorelina (DESL) ou deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+ HCG) e inovuladas com embriões provenientes de sêmen congelado e fresco.

| Grupos | Embriões oriundos de sêmen (n = 69) | \varnothing Folículo pré ovulatório (x \pm s; mm;) | Ovulação pós indutor (x \pm s;h) | Taxa prenhez pós inovulação % (n) |
|----------|-------------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| DESL | Fresco: 10 | 39,9 \pm 1,57 ^a | 44,6 \pm 2,83 ^a | 70,00 (7/10) ^a |
| DESL+HCG | Fresco: 09 | 39,77 \pm 2,23 ^a | 39,44 \pm 1,13 ^b | 55,55 (5/09) ^a |
| DESL | Congelado: 22 | 38,31 \pm 2,19 ^a | 44,81 \pm 2,44 ^a | 59,09 (13/22) ^a |
| DESL+HCG | Congelado: 28 | 39,17 \pm 2,22 ^a | 39,60 \pm 1,44 ^b | 60,71 (17/28) ^a |

Letras diferentes na mesma coluna indicam significância P < 0,05.

Para a avaliação do \varnothing FPO e TO foi utilizado o teste de Tukey e para a TRE o teste de qui-quadrado

Apresentação na tabela 4, das análises de taxa de prenhez de acordo com o indutor utilizado, o tempo de ovulação após a administração do indutor (TO) com significância para o DESL+HCG e o diâmetro do folículo pré-ovulatório (\varnothing FPO). Não houve diferença para o \varnothing FPO e na taxa de prenhez entre os grupos de receptoras. Independente do indutor não houve diferenças estatísticas entre embriões oriundos de sêmen fresco e congelado em relação à taxa de prenhez das receptoras.

Tabela 4 – Diâmetro (\varnothing) do folículo pré-ovulatório, tempo de ovulação e taxa de prenhez após administração de deslorelina (DESL) ou deslorelina + gonadotrofina coriônica humana (DESL+ HCG) em éguas receptoras de embriões.

| Grupos (geral) | \varnothing Folículo pré ovulatório (x \pm s; mm;) | Ovulação pós indutor (x \pm s;h) | Taxa de prenhez % (n) |
|-----------------|--|------------------------------------|----------------------------|
| DESL (n=32) | 38,81 \pm 2,12 | 44,75 \pm 2,52 ^a | 62,50 (20/32) ^a |
| DESL+HCG (n=37) | 39,32 \pm 2,21 | 39,56 \pm 1,36 ^b | 59,45 (22/37) ^a |

A regressão logística sobre os dados de TRE em função do \emptyset FPO ($P=0,8993$), TO ($P=0,4468$), Idade ($P=0,0268$), peso ($P=0,6318$) e efeito localização dos animais (diferentes haras) ($P=0,6375$), não detectou diferença significativa entre as variáveis acima especificadas pela análise do *Qui-quadrado Goodness of Fit Test*, exceto para a idade, isto é, quanto maior a idade da doadora, maior a possibilidade de recuperação embrionária nos animais do presente estudo. No presente estudo foram utilizadas éguas de 04 a 16 anos, com 42,4% de animais situando-se entre 10 e 12 anos de idade. O Teste de correlação de Pearson para as variáveis \emptyset folículo pré ovulatório versus tempo de ovulação após aplicação do indutor foi executado, detectando-se ausência de correlação.

DISCUSSÃO

Um dos objetivos do presente estudo foi estabelecer o número de horas em que a ovulação ocorreria após a administração dos protocolos indutores da ovulação, assim como obter a TRE de doadoras e a TP em receptoras de embriões, levando-se em consideração os diferentes tipos de sêmen (fresco ou congelado).

Dados dos diferentes protocolos não resultaram em diferença significativa nas variáveis do \emptyset FPO das doadoras e receptoras no momento da indução. O \emptyset FPO (mm) das doadoras e receptoras situou-se dentro das expectativas (≥ 35 mm) projetadas na metodologia. A ovulação ocorreu em 100% das éguas doadoras e receptoras (D e R) num intervalo de tempo médio de 39,6 (após a aplicação da DESL+HCG) e 44,4 horas (DESL). Hemberg et al. (2006) obtiveram igualmente 100% de ovulação das éguas trabalhadas, mas com maior intervalo de tempo entre as ovulações (variação de 36 a 48 horas) do observado no presente estudo. Após a administração dos indutores, os animais foram acompanhados por ultrassonografia a intervalos de duas em duas horas até a constatação da ovulação. Este acompanhamento proporcionou maior acurácia do momento (horas) das ovulações. Os dados do presente estudo permitem considerar o número de horas entre a aplicação do

indutor e a ovulação, como de maior exatidão e mais promissores com vistas ao aumento da performance reprodutiva à inseminação artificial, que os relatados por Meinert et al. (1993), Meyers et al. (1994) e Mumford et al. (1995), os quais relataram ovulações de 83% a 93% das éguas dentro de 48 horas após a indução com a DESL e HCG. Os resultados do presente estudo, mostram-se consistentes e de grande utilidade aos profissionais da área, pois indicam maior acurácia relativa às horas da ovulação pós administração dos indutores, que os relatos dos autores citados, porquanto estes reportam um período de tempo mais longo entre a administração do indutor à ovulação.

A identificação do momento de ovulação, permite otimizar as doses de sêmen, principalmente do sêmen congelado, ao se levar em conta o breve período de sobrevivência espermática (4 a 6 horas tão somente) após o descongelamento, devendo o sêmen ser utilizado para inseminação o mais próximo possível da ovulação (Ginther et al., 1972; Woods et al., 1990; Hemberg et al., 2006).

Os tempos de ovulação registrados no presente estudo são discrepantes dos verificados por Farquhar et al. (2000), pois estes relataram que 84,3% das 376 éguas haviam ovulado 48 horas após o tratamento com DESL. Isto impacta bastante na eficiência reprodutiva quando utilizado o sêmen congelado. Os resultados do presente estudo são oriundos da DESL aplicada isoladamente ou em combinação de protocolo DESL+HCG, metodologia ainda não relatada por outros pesquisadores, tornando a discussão mais breve, uma vez que os relatos são escassos ou mesmo inexistentes. Assim sendo, este ponto centraliza a inovação do presente estudo. Outro ponto a ser considerado, é a redução da variação das horas de ovulação entre os grupos, a qual mostrou-se significativamente diferente, uma vez que a variação no tempo de ovulação foi de até 5 horas mais precoce em prol do DESL + HCG.

Os níveis de LH em éguas induzidas à ovulação com DESL são mais elevados quando comparados aos de éguas induzidas somente com o HCG, permanecendo elevados até a ovulação (Boakari et al., 2017). O HCG tem uma estrutura molecular semelhante ao do hormônio luteinizante (LH) e promove o aumento dos níveis de LH em éguas promovendo a indução à ovulação. A DESL por sua vez, além de provocar o estímulo LH hipofisário, também

estimula a produção de FSH promovendo a maturação final do folículo e a ovulação (Wilson et al., 1990; Ishida et al., 1999; Gigli et al., 2006).

Por sua vez, os grupos no presente estudo, que foram induzidos à ovulação com DESL (inseminados com sêmen fresco ou congelado) resultaram em uma TRE de (71,42%) e (66,66%) respectivamente. Esta TRE apresenta-se superior à TRE verificada por Raz et al. (2009) (36%), ao induzem a ovulação e inseminarem com sêmen fresco após aplicação da DESL. É possível que o acompanhamento das ovulações de duas em duas horas tenha acarretado as TREs mais elevadas observadas no presente estudo, em função da maior exatidão sobre o tempo de ovulação e a aplicação do sêmen.

Os grupos que receberam a associação de DESL+HCG e foram inseminados com sêmen fresco ou congelado evidenciaram TRE de (64,28%) e (73,68) respectivamente (Tabela 1). A TRE relatada por Loomis e Squires (2005) foi de 48,1% em éguas inseminadas com sêmen congelado e submetidas a duas inseminações (pré e pós ovulação). Eles referenciaram que o acompanhamento ultrassonográfico da ovulação e a inseminação de 4 a 6 horas após a ovulação aumentava significativamente a TRE. No presente estudo a TRE com a utilização do sêmen congelado (73,68%), foi superior também à de Hemberg al. (2006) (45,4%), Reger al. (2003) (71,4%) e de Sieme al. (2003) (50%) ao utilizarem o HCG em um grupo e Deslorelina e HCG combinados em outro grupo respectivamente como indutores da ovulação. A elevada TRE com as inseminações com sêmen congelado também pode ocorrer em função das duas inseminações executadas (pré e pós ovulação), colaborando para o aumento da eficiência do sêmen, uma vez que com o máximo de 4 horas pós a ovulação, maior viabilidade espermática ocorrerá (Sieme al., 2003). Cabe ressaltar que no presente estudo, obteve-se maior TRE que a do Sieme al. (2003) provavelmente devido à combinação dos dois indutores utilizados no presente estudo.

No presente estudo, as receptoras não apresentaram diferença na TP ($P=0,921$). A TP observada para receptoras foi de 70%, 55%, 59% e 60% respectivamente para os grupos DESL sêmen fresco, DESL+HCG fresco, DESL sêmen congelado e DESL+HCG congelado, percentuais próximos aos obtidos por Fleury al. (2001), os quais relatam a TP de 72% nas receptoras, mas que receberam embriões procedentes de sêmen fresco. Aliás, as

referencias da literatura não são muito claras quando se referem às receptoras de embrião originados de sêmen fresco ou congelado. No presente estudo está bem especificado dados de uso de sêmen fresco ou congelado e referente ao tipo de protocolo utilizado. No geral, espera-se menor TP e TRE quando trata-se de embrião oriundo de sêmen congelado, devido principalmente aos danos que o sêmen congelado sofre durante o procedimento da criopreservação. Por isso a inseminação deve ser muito próxima da ovulação (Samper , 2001; Reger et al., 2003; Sieme et al., 2003; Loomis e Squires., 2005; Hemberg al., 2006), como pode-se acompanhar no presente estudo.

Observou-se nesse estudo que tanto as TRE quanto às TP proveniente de sêmen congelado ficaram muito próximas às com o sêmen fresco ($P>0,05$). A TP das receptoras induzidas com DESL (62,50%) foi um pouco mais elevado que as das receptoras induzidas com DESL+HCG (59,45%) porém, sem diferença ($P=0,79$) entre os grupos. Os fatores que afetam as TPs das receptoras após a transferência do embrião incluem várias variáveis, dentre elas o método de transferência, a sincronia entre doadora e receptora, a qualidade do embrião, ao meio ambiente intrauterino e ao manejo das receptoras (Squires al., 1999) dentre outras. Frente a isso, a hipótese do presente estudo, está parcialmente sustentada pelos resultados em função de que o tempo de ovulação dado pelo protocolo DES+HCG delimitou um tempo da ovulação após a indução, proporcionando maior precisão e menor oscilação de tempo (ver desvio padrão). Isso é muito importante aos profissionais da área sob intensa atividade na estação de monta.

Concluiu-se que os dois protocolos poderão ser utilizados na produção e transferência de embriões; ambos os protocolos foram eficientes na sincronização do estro e da ovulação; a associação DESL + HCG concentrou de forma mais eficiente o tempo das ovulações (menor intervalo das ovulações). Os resultados sustentam a redução do número de avaliações ultrassonográficas reprodutivas a serem executadas nas éguas pelos profissionais, otimizando o uso do sêmen congelado bem como a redução do estresse dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinarian Education*. 2000; 12(6): 312-17.

Boakari YL, Ferreira JC, Canesin HS, Thompson Jr. DL, Lima FS, Pantoja JCF, et al. Influence of two ovulation-inducing agents on the pituitary response and follicle blood flow in mares. *Theriogenology*. 2017; 100:95-9.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.

Farquhar VJ, McCue PM, Vanderwall DK, Squires EL. Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2000;20(11):722-5.

Fleury JJ, Pinto AJ, Marques A, Lima CG, Arruda RP. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2001;38(1):29-33.

Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*. 2006;131(4):699-709.

Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Investigación Veterinaria*. 2006;8(1):183-203.

Ginther OJ. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1993;13(1):18-25.

Ginther OJ, Whitmore HL, Squires EL. Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects of season and nursing. *American Journal of Veterinary Research*. 1972;33(10):1935-39.

Hemberg E, Lundeheim N, Einarsson S. Successful Timing of Ovulation Using Deslorelin (Ovuplant) is Labour-saving in Mares Aimed for Single AI with Frozen Semen. *Reproduction Domestic Animals*. 2006;41(6):535-37.

Ishida N, Okada M, Sebata K, Minato M, Fukui Y. Effects of GnRH and hCG treatments for enhancing corpus luteum function to increase lambing rate of ewes artificially inseminated during the non-breeding season. *Journal of Reproduction and Development*. 1999;45(1):73-9.

Loomis PR, Squires EL. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*. 2005;64(3):480-91.

Magistrini M, Vidament M, Clement F, Palmer E. Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science*. 1996;42(1-4):181-88.

Manual of the International Embryo Transfer Society. *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*. Savory: The Society; 1998.

McCue PM, Magee C, Gee EK. Comparison of Compounded Deslorelin and Hcg for Induction of Ovulation in Mares. *Journal of Equine veterinary Science*. 2007;27(2): 58-61.

Meinert C, Silva JF, Kroetz I, Klug E, Trigg TE, Hoppen HO, *et al*. Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. *Equine Veterinary Journal*. 1993;25(1):65-8.

Meyers PJ, Jöchle W, Trigg TE. Acceleration of ovulation in the mare with the use of the GnRH analog, deslorelin acetate. In: *Proceedings 40th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Vancouver: American Association of Equine Practitioners; 1994. p. 13-4.

Mumford EL, Squires EL, Jöchle E, Harrison LA, Nett TM, Trigg TE. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. *Animal Reproduction Science*. 1995;39(2):129-40.

Pickett BW, Squires EL, Mckinnon AO. Procedures of collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory; 1987. p. 125

Raz T, Carley S, Card C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. *Theriogenology*. 2009;71(9):1358-66.

Reger HP, Bruemmer JE, Squires EL, Maclellan LJ, Barbacini S, Necchi D, *et al*. Effects of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. *Equine Veterinary Education*. 2003;15(2):101-6.

Rossdale PD, Lambrecht P. Comparison of the interval between administration of hCG or GnRH implant and ovulation in oestrous mares. *Equine Veterinary Education*. 1998;10(2):76-9.

Samper JC, Jensen S, Sergeant J, Estrada A. Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2002;22(7):320-23.

Samper JC. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*. 2001;68(3-4):219-28.

Sieme H, Schäfer T, Stout TAE, Klug E, Waberski D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*. 2003;60(6):1153-64.

Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*. 1999;51(1):91-104.

Stradaoli G, Sylla L, Zelli R, Chiodi P, Monaci M. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. *Theriogenology*. 2004;62(3-4):761-77.

Wilson CG, Downie CR, Hughes JP, Roser JF. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1990;10(4):301-8.

Woods J, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Veterinary Journal*. 1990;22(6):410-15.

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao estabelecer o momento mais próximo da ovulação com os diferentes indutores DESL ou DESL+HCG, sugere-se futuros projetos nesta linha de ação, com uma (única) IATF com o sêmen congelado, uma vez que detetou-se com maior precisão o tempo de ovulação, observando-se evidentemente os critérios da metodologia do presente estudo.

Para a IATF, sugere-se induzir a ovulação com DESL+HCG (controle ultrassonográfico) somente no D0, D7+39,6 horas e na indução com DESL somente no D0, D7 + 44,4horas.

REFERÊNCIAS

- Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinarian Education*. 2000; 12(6): 312-17.
- Boakari YL, Ferreira JC, Canesin HS, Thompson Jr. DL, Lima FS, Pantoja JCF, et al. Influence of two ovulation-inducing agents on the pituitary response and follicle blood flow in mares. *Theriogenology*. 2017; 100:95-9.
- Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. Equine assisted reproduction and embryo technologies. *Animal Reproduction*. 2013;10(3): 334-43.
- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction*. 2006;131(4):699-709.
- Ginther OJ. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1993;13(1):18-25.
- Ginther OJ, Whitmore HL, Squires EL. Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects of season and nursing. *American Journal of Veterinary Research*. 1972;33(10):1935-39.
- Loomis PR, Squires EL. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*. 2005;64(3):480-91.
- Magistrini M, Vidament M, Clement F, Palmer E. Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science*. 1996;42(1-4):181-88.
- McCue PM, Hudson JJ, Bruemmer JE, Squire EL. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old problem. *Proceedings of the 50th Convention of the AAEP*. Denver: American Association of Equine Practitioners; 2004. p 510-3.

McCue PM, Magee C, Gee EK. Comparison of Compounded Deslorelin and Hcg for Induction of Ovulation in Mares. *Journal of Equine veterinary Science*. 2007;27(2): 58-61.

Meinert C, Silva JF, Kroetz I, Klug E, Trigg TE, Hoppen HO, *et al*. Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. *Equine Veterinary Journal*. 1993;25(1):65-8.

Melo CM, Papa FO, Filho JNPP, Araújo GH, Dell'Aqua Jr. JA, Alvarenga MA. Eficiência do acetato de deslorelina e do extrato de pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. *Veterinária e Zootecnia*. 2012;19(3):392-98.

Mumford EL, Squires EL, Jöchle E, Harrison LA, Nett TM, Trigg TE. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. *Animal Reproduction Science*. 1995;39(2):129-40.

Pickett BW, Squires EL, Mckinnon AO. Procedures of collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory; 1987. p. 125.

Raz T, Carley S, Card C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. *Theriogenology*. 2009;71(9):1358-66.

Reger HP, Bruemmer JE, Squires EL, Maclellan LJ, Barbacini S, Necchi D, *et al*. Effects of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. *Equine Veterinary Education*. 2003;15(2):101-6.

Roser JF, Kiefer BL, Evans JW, Neely DP, Pacheco CA. The development of antibodies to human chorionic gonadotropin following its repeated injection in the cyclic mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1979;27(27):173-9.

Rossdale PD, Lambrecht P. Comparison of the interval between administration of hCG or GnRH implant and ovulation in oestrous mares. *Equine Veterinary Education*. 1998;10(2):76-9.

Samper JC, Jensen S, Sergeant J, Estrada A. Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2002;22(7):320-23.

Samper JC. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*. 2001;68(3-4):219-28.

Smits K, Hoogewijs M, Woelders H, Daels P, Van Soom A. Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012;47(4):239-48.

Squires EL. Hormonal manipulation of the mare: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2008;28(11):627-34.

Stradaioli G, Sylla L, Zelli R, Chiodi P, Monaci M. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. *Theriogenology*. 2004;62(3-4):761-77.

Sullivan JJ, Parker WG, Larson LL. Duration of estrus and ovulation time in nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1973;162(10):895-8.

Wilson CG, Downie CR, Hughes JP, Roser JF. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1990;10(4):301-8.

Woods J, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Veterinary Journal*. 1990;22(6):410-15.