

**EFEITO DO B-CAROTENO E DO FSH-P SOBRE
A DINÂMICA FOLICULAR E QUALIDADE
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS MANGALARGA
MARCHADOR**

ALEXANDRE FRANCISCO AMARAL ARANTES

2004

ALEXANDRE FRANCISCO AMARAL ARANTES

**EFEITO DO B-CAROTENO E DO FSH-P SOBRE A DINÂMICA
FOLICULAR E QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS
MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à universidade federal de lavras como parte das exigências do programa de pós-graduação em zootecnia, área de concentração em produção animal, para a obtenção do título de “mestre”.

ORIENTADOR

Prof. Dr. José Camisão de Souza

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da

Biblioteca Central da UFLA

Arantes, Alexandre Francisco Amaral

Efeito do B-caroteno e do FSH-P sobre a dinâmica folicular e qualidade embrionária em éguas Mangalarga Marchador / Alexandre Francisco Amaral

Arantes. -- Lavras : UFLA, 2004.

58 p. : il.

Orientador: José Camisão de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Eqüino. 2. Beta caroteno. 3. FSH-P. 4. Qualidade embrionária. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-
636.10824

ALEXANDRE FRANCISCO AMARAL ARANTES

**EFEITO DO B-CAROTENO E DO FSH-P SOBRE A DINÂMICA
FOLICULAR E QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS
MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à universidade federal de lavras como parte das exigências do programa de pós-graduação em zootecnia, área de concentração em produção animal, para a obtenção do título de “mestre”.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2004

Dra. Ana Tereza Mendonça Viveiros UFLA-DZO

Dr. Flamarion Tenório de Albuquerque UFLA-DMV

Dr. José Augusto de Freitas Lima UFLA-DZO

Dr. José Camisão de Souza UFLA/DZO
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À minha mãe, Lia (*in memoriam*).

Aos meus irmãos Ana Kelly e Eugênio.

Ao meu pai, Otávio.

Aos meus sobrinhos Ana Clara, Alice e Francisco, .

Aos cavalos da raça Mangalarga Marchador.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, por sua força infinita.

À minha mãe Lia (*in memoriam*), por seus ensinamentos de vida, por ter sido a grande incentivadora das minhas conquistas, sempre presente nos momentos mais importantes de minha vida e por sempre ser minha melhor amiga e conselheira mesmo depois de sua partida. Ao meu pai, Otávio, por seu exemplo de perseverança, espírito guerreiro, batalhador e valiosos ensinamentos. À minha irmã Ana Kelly, por seu carinho, amizade, cumplicidade e companheirismo. Ao meu irmão Eugênio, aos meus cunhados Marco Túlio e Denise e aos meus sobrinhos Ana Clara, Alice e Francisco, pelo valioso apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida.

Ao professor José Camisão de Souza, por ter sido, mais do que orientador um grande amigo, companheiro, arauto de sabedoria e simplicidade, por ter confiado a mim a condução deste experimento e por possibilitar a conclusão de uma conquista muito almejada de minha vida profissional.

Aos professores Flamarion Tenório de Albuquerque, Ana Tereza de Mendonça Viveiros e José Augusto de Freitas Lima, por participarem da banca de defesa e pelas valiosas contribuições apresentadas.

Ao coordenador do curso de pós-graduação, Professor Elias Fialho, por sua dedicação extremada na condução da difícil tarefa de cada vez mais elevar o nome da pós-graduação do Departamento de Zootecnia da UFLA.

Aos demais professores do DZO que muito contribuíram, com seus sábios ensinamentos, para o aprimoramento da minha formação acadêmica. Em especial à professora Gracita, que demonstrou ser uma grande amiga e conselheira.

Aos meus eternos amigos e irmãos Bruno, Michele e Lílian (Sandy), por terem sido amigos para todas as horas, pacientes, conselheiros e leais.

Aos amigos da pós-graduação, Kaneo, Flávio, Biu e Roberta, pela amizade e consideração e em especial ao José Nélio, pela fundamental ajuda e dedicação durante a realização do experimento.

Às amigas Ludmila e Flávia, pela colaboração imprescindível na realização do experimento.

Ao Professor Fabiano, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas.

A todos os funcionários do DZO, em especial a Keila, Kekei, Carlos, Pedro e D. Lia, pela amizade e colaboração.

Aos meus auxiliares da Fazenda Santo Antônio, em especial o Betão, Galvão e Lequinho, pela fundamental ajuda no manejo dos animais e pelo carinho a eles dispensados.

A empresa Vallee S.A, pelo apoio financeiro e o fornecimento do β -caroteno e em especial ao Sérgio Cirilo, pela colaboração e amizade, tornando possível a realização do experimento.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e aos cavalos que fizeram parte do experimento

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 β -caroteno e vitamina A.....	03
2.1.1 Definição.....	03
2.1.2 Vitamina A, β -caroteno e reprodução.....	04
2.2 Superovulação.....	09
2.2.1 Desenvolvimento folicular.....	10
2.2.2 Aspectos hormonais.....	12
2.2.3 Hormônios utilizados na superovulação das éguas.....	14
2.3 Transferência de embriões em eqüinos.....	20
2.3.1 Fatores que afetam a coleta de embriões.....	20
2.3.2 Fatores que afetam as taxas de prenhez.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Período e local.....	24
3.2 Animais.....	24
3.3 Período pré-experimental.....	24
3.4 Tratamentos.....	25
3.5 Manejo reprodutivo.....	27
3.5.1 Controle do desenvolvimento folicular.....	27
3.6 Coleta de embriões.....	27
3.7 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Qualidade morfológica embrionária.....	33

4.2 Número de folículos palpáveis e resposta superovulatória.....	35
4.3 Duração do estro.....	39
4.4 Diâmetro do folículo ovulatório.....	41
4.5 Crescimento do folículo ovulatório.....	43
4.6 Taxa de recuperação embrionária.....	46
5 CONCLUSÕES.....	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

ARANTES, Alexandre Francisco Amaral. **Efeito do β -caroteno e do FSH-P sobre a dinâmica folicular e qualidade embrionária em éguas Mangalarga Marchador.** Lavras: UFLA, 2004. 58p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia)¹

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de β -caroteno sobre a produção e qualidade embrionária de éguas tratadas ou não com FSH-P, além de avaliar a eficiência da utilização de FSH-P (Folltropin[®]) para induzir superovulação em éguas. Foram utilizadas 16 éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador, entre 4 e 18 anos de idade, aptas à reprodução. Utilizou-se duas dosagens de β -caroteno injetável (800 e 1200 mg), intramuscular, aplicadas no 15^o dia após a ovulação, em éguas tratadas ou não com Folltropin-V[®] (Vetrepharm- Belleville, Canadá), duas injeções diárias de 10 mg, intramuscular, aplicadas as 8 e 18 horas do 15^o ao 20^o dia, após a ovulação ou até a detecção de um ou mais folículos $\geq 3,5$ cm. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 tratamentos: tratamento 1 (n=8)- não receberam medicação; tratamento 2 (n=8) – aplicação de FSH-P; tratamento 3 (n=4) – 800 mg de β -caroteno; tratamento 4 (n=4) – 1200 mg de β -caroteno; tratamento 5 (n=4) – aplicação de FSH-P + 800 mg de β -caroteno; tratamento 6 (n=4) – aplicação de FSH-P + 1200 mg de β -caroteno. As coletas de embriões foram realizadas no 6^o dia após a ovulação. Como não houve diferenças entre os tratamentos e interações, foram testados os efeitos principais do tratamento com FSH-P (n=16) versus não tratamento (n=16) e suplementação com β -caroteno (n=16) versus não suplementação (n=16). A qualidade embrionária foi melhor (p=0,041) nos animais suplementados com β -caroteno, $1,22 \pm 0,22$, versus não suplementados, $2,62 \pm 0,21$, mas foi semelhante (p=0,20) entre os animais tratados com FSH-P, $1,47 \pm 0,21$, em comparação com não tratados, $2,37 \pm 0,22$. O número médio de folículos aumentou (p=0,0175) nos animais tratados com FSH-P ($3,19 \pm 0,34$) versus não tratados ($1,87 \pm 0,34$) e não houve efeito (p=0,50) da suplementação ($2,69 \pm 0,34$) versus não suplementação ($2,37 \pm 0,34$). O número de ovulações não variou ($1,00 \pm 0,0$) entre os efeitos principais. Não houve efeito do tratamento com FSH-P (p=0,80) ou da suplementação (p=0,90) sobre a duração do estro ($8,00 \pm 0,46$ versus $8,23 \pm 0,46$ e $8,06 \pm 0,46$ versus $8,18 \pm 0,46$ dias, para éguas tratadas ou não com FSH-P e suplementadas ou não com β -caroteno,

¹ Comitê orientador: José Camisão de Souza - UFLA (orientador); Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA; Flamarion Tenório de Albuquerque - UFLA; José Augusto de Freitas Lima - UFLA.

respectivamente) e sobre o diâmetro do folículo ovulatório, $4,56 \pm 0,18$ versus $4,56 \pm 0,18$ e $4,50 \pm 0,18$ versus $4,62 \pm 0,18$ cm, respectivamente ($p=0,99$ e $p=0,87$). O crescimento folicular não foi diferente para os efeitos principais testados ($p>0,05$) sendo linear e crescente em relação ao tempo ($R^2= 0,95$ e $0,92$, tratamento com FSH-P versus não tratados; $R^2= 0,94$ e $0,95$, suplementação com β -caroteno versus não suplementação, respectivamente). A suplementação de β -caroteno melhorou a qualidade embrionária. O tratamento com FSH-P foi associado com o aumento do número de folículos palpáveis, no entanto, não houve reflexo sobre o número médio de ovulações.

ABSTRACT

ARANTES, Alexandre Francisco Amaral. **β -carotene and FSH-P effects on follicular dynamics and embryo quality in Mangalarga Marchador mares.** Lavras: UFLA, 2004. 58p. (Dissertation - Master in Animal Production)¹

The objective was to evaluate the effect of β -carotene on superovulated mare embryo production and quality, as well as to assess FSH-P (Folltropin[®]) ability to induce superovulation. Sixteen Mangalarga Marchador breed donor mares were used, aged between 4 and 18 years, with sound reproductive history. Two β -carotene intra muscular dosages were tested (800 and 1200 mg), 15 days post ovulation in mares superovulated or not with Folltropin[®] (Vetrephan-Belleville, Canada). Superovulation was attained with two daily injections at 8:00 and 18:00 h on days 15 through 20 after ovulation or until the detection of one or more follicles larger than 3,5 cm in diameter. Animals were allocated randomly to one of six treatments: 1 (n=8) – control; 2 (n=8) – superovulation; 3 (n=4) – 800 mg of β -carotene; 4 (n=4) – 1200 mg of β -carotene; 5 (n=4) – superovulation + 800 mg of β -carotene; 6 (n=4) – superovulation + 1200 mg of β -carotene. Mares were flushed six days post ovulation. Since there were no differences or interactions between treatments, the main effects of superovulation (n=16) and β -carotene supplementation (n=16) were tested against no superovulation (n=16) and no supplementation (n=16). Mean follicle number was greater (p=0.075) for superovulated ($3,19 \pm 0,34$) compared to controls ($1,87 \pm 0,34$) and there was no effect (p=0.50) of β -carotene supplementation ($2,69 \pm 0,34$) compared to controls ($2,37 \pm 0,34$). Ovulation number did not vary ($1,00 \pm 0,00$) between main effects. There was no effect of superovulation ($8,00 \pm 0,46$ d versus $8,25 \pm 0,46$ d; p=0.80) or supplementation ($8,06 \pm 0,46$ d versus $8,18 \pm 0,46$ d; p=0.90) on estrus length. Ovulatory mean follicle diameter did not differ between main effects, which ranged from $4,50 \pm 0,18$ to $4,62 \pm 0,18$ cm across all treatments. Embryo quality was better (p=0.041) on supplemented ($1,22 \pm 0,22$) versus non supplemented ($2,62 \pm 0,22$) mares, but similar (p=0.20) between superovulated ($1,47 \pm 0,21$) and non-superovulated ($2,37 \pm 0,22$). Follicular growth was not different between the main effects tested (p>0.05) but was positively and linearly correlated with time

¹ Advisor: José Camisão de Souza - UFLA. Committee: Ana Tereza de Mendonça Viveiros – DZO, UFLA; Flamarion Tenório de Albuquerque - UFLA; José Augusto de Freitas Lima – DZO, UFLA.

for either superovulated ($R^2 = 0.95$), non-superovulated ($R^2 = 0.92$), supplemented ($R^2 = 0.94$) and non-supplemented ($R^2 = 0.95$) mares. In conclusion, β -carotene supplementation improved embryo quality. The superovulatory protocol used in this study was associated with a greater number of palpable follicles, but this had no reflex on the number ovulations.

1 INTRODUÇÃO

A criação de eqüinos no Brasil teve uma evolução muito grande nas últimas décadas, colocando o país como detentor de um dos maiores rebanhos do mundo, possuindo muitas associações de raças, com grande número de criadores e animais inscritos.

Por muito tempo, as associações de criadores de cavalo foram resistentes ao emprego de novas biotecnologias aplicadas à reprodução de eqüinos como a inseminação artificial e a transferência de embriões, por razões de ordem mercadológicas. Mas, atualmente, a utilização destas técnicas é permitida pela maioria das associações de raças, visando acelerar o melhoramento genético por meio da difusão mais rápida da genética de animais superiores.

Devido aos altos custos dos programas de transferência de embriões em eqüinos é importante e fundamental que se domine uma série de procedimentos inerentes às doadoras, receptoras e reprodutores, além da manutenção de rigoroso manejo nutricional e reprodutivo. Contudo, pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de novas técnicas e protocolos capazes de aperfeiçoar a aplicação desta biotecnologia, tais como a indução de ovulações múltiplas por meio da superovulação, aliada ao aumento da produção e qualidade dos embriões.

Em outras espécies, a maximização dos programas de transferência de embriões se deve, em parte, à facilidade de superovulação, que propicia maior número de embriões viáveis por coleta. Nos eqüinos, a superovulação é limitada, segundo alguns pesquisadores, por fatores de natureza anátomo-fisiológicas tais como o fato das ovulações acontecerem na fossa da ovulação e o tamanho do folículo ovulatório (≥ 35 mm).

A suplementação com vitamina A e do β -caroteno tem sido utilizada para aumentar a resposta dos animais aos tratamentos superovulatórios, melhorando a eficiência das coletas e a qualidade embrionária.

O presente estudo teve como objetivos: avaliar o efeito da suplementação de β -caroteno sobre a produção e qualidade embrionária de éguas, além de avaliar a eficiência da utilização do hormônio folículo estimulante de origem suína, FSH-P, (Folltropin[®]) para induzir superovulação em éguas durante a estação ovulatória.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 β -caroteno e vitamina A

2.1.1 Definição

As vitaminas são definidas como compostos orgânicos presentes em pequenas quantidades nos alimentos naturais, distintos de outros nutrientes como carboidratos, gorduras, proteínas, minerais e água, essenciais ao metabolismo normal das funções fisiológicas, como crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução dos animais (Combs, 1992, McDowell, 1989).

A vitamina A (retinol) é um álcool orgânico formado no tecido animal a partir de seus precursores naturais, carotenóides ou pró-vitaminas A (α , β , χ - carotenos e criptoxantinas) presentes nos alimentos (McDowell, 1989). A conversão dos carotenos em vitamina A ocorre principalmente nas células da mucosa intestinal e a eficiência de conversão varia entre as espécies animais. O mecanismo de conversão do β -caroteno para a vitamina A é feito pelas enzimas 15, 15' dioxigenase, promovendo a clivagem da molécula nos carbonos 15 e 15', e a retinal aldeído redutase. O processo de clivagem tem capacidade potencial de produção de duas moléculas de retinol, mas, geralmente, nos experimentos in vivo apenas uma molécula de retinol é formada após a clivagem do β -caroteno (Mohamed et al., 2001). Seu armazenamento ocorre principalmente no fígado (During et al., 2001, Chew, 1993).

O β -caroteno (Figura 1) é o mais abundante carotenóide encontrado nos alimentos e sua molécula é constituída por 40 átomos de carbono e 11 ligações duplas conjugadas, possuindo baixa capacidade ionizante, propriedades semicondutoras, capacidade antioxidante e é altamente lipofílico. Além de ser o principal precursor de vitamina A para os animais, ele é um composto ativo

biologicamente, desempenhando papel direto no sangue e tecidos animais (Cantrel et al., 2003, Arikan et al., 2002, Arikan & Rodway, 2000a, b, Chew, 1993, Chew, 1994).

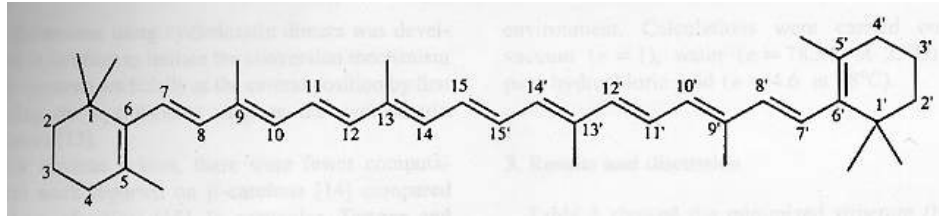


FIGURA 1: β -caroteno (Isômero Trans)

Fonte: Mohamed et al.2001.

A absorção dos carotenos ocorre principalmente na mucosa do jejuno proximal, devido à formação de miscelas mistas pelos sais biliares e colesterol, solubilizando-os. Os componentes das miscelas, com exceção dos sais biliares, penetram nas células da mucosa através da parte lipídica da membrana. Os carotenos absorvidos e não metabolizados são incorporados aos quilomicrons e, pela vias linfáticas, chegam ao sangue. Através de lipoproteínas carreadoras chegam aos tecidos alvos (McDowell, 1989, Combs, 1992, Cantrell et al., 2003).

2.1.2 Vitamina A, β -caroteno e reprodução

Pesquisadores têm demonstrado a participação, direta ou indireta, da vitamina A e do β -caroteno na reprodução, melhorando o desempenho reprodutivo dos animais.(Chew, 1993, Besenfelder et al., 1993 Chew, 1994, Besenfelder et al., 1996).

Vitamina A

A vitamina A tem sua função primordial na manutenção das funções fisiológicas dos animais como o crescimento e alguns aspectos da reprodução,

podendo sua deficiência levar à perda da visão, devido a falhas na formação da rodopsina pela retina, defeitos no crescimento ósseo e queda da atividade reprodutiva, como falhas na espermatogênese no macho e reabsorção fetal nas fêmeas e, ainda, o aumento da susceptibilidade a infecções, devido a defeitos no crescimento e diferenciação dos tecidos epiteliais (Combs, 1992).

A participação da vitamina A nas funções reprodutivas, melhorando o desempenho reprodutivo dos animais, envolve a ação direta e/ou indireta de vários processos como a diferenciação dos epitélios e proliferação celular, proteção da integridade funcional das células e síntese de glicoproteínas (Brief & Chew, 1985).

Em bovinos a suplementação de vitamina A diminui a incidência de folículos atrésicos e cistos ovarianos, sugerindo a participação direta desta vitamina na função ovariana e na foliculogênese (Schweigert & Zucker, 1988, Schweigert et al., 1988).

Os retinóis podem afetar diretamente o desenvolvimento embrionário por meio da regulação dos processos de proliferação e diferenciação celular (Schindler, 1986) ou transcrição de genes (Chiocca et al., 1988, Chiocca et al., 1989), citados por Chew (1993). Por outro lado, através da ação moduladora da esteroidogênese pela vitamina A (Talavera e Chew, 1988), a produção de progesterona aumenta, influenciando a secreção das proteínas pelas células uterinas, melhorando o ambiente uterino e favorecendo, indiretamente, o desenvolvimento embrionário (Chew et al., 1982, Chew, 1993, Jindal et al., 1996, Whaley et al., 1977, Thomas et al., 1992).

A vitamina A regula a síntese de glicoproteínas em vários tecidos, inclusive no útero, que são importantes nutrientes para o embrião (Roberts & Bazer, 1988). As proteínas transportadoras do retinol (RBPs) têm sido encontradas no útero, ovários, testículos e outros tecidos nos mamíferos (Chew, 1993).

Harney et al. (1990) demonstraram que as RBPs são produzidas pelos embriões de suínos no período da implantação no útero e pelo endométrio, sugerindo que o retinol é importante para o desenvolvimento do embrião.

β -Caroteno

Os mecanismos através dos quais o β -caroteno atua na reprodução e nos processos reprodutivos não estão bem elucidados. A maioria dos pesquisadores atribui a sua participação nos processos reprodutivos a suas propriedades antioxidantes, advindas da sua estrutura molecular, ajudando a prevenir os danos causados pelos radicais livres aos tecidos (Chew, 1994, Young et al., 1995, Stahl et al., 1997, Rapoport et al., 1998, Arikan & Rodway, 2000, Cantrell et al., 2003).

O β -caroteno está presente nos ovários, corpos lúteos e adrenais em altas concentrações e em outros tecidos onde ocorre a produção de esteróides (O' Fallon & Chaw, 1984, Holt et al., 1995, Arikan et al., 2002). Nas reações de hidroxilação, envolvendo a biosíntese de esteróides, são produzidos grandes números de radicais livres, daí a necessidade da presença deste caroteno nestes locais.

Por ser uma molécula altamente lipofílica, o β -caroteno é encontrado predominantemente nas frações subcelulares contendo altas concentrações de lipídios, especialmente na membrana microsomal onde ocorrem as reações da esteroidogênese (Holt et al., 1995). O transporte da molécula de β -caroteno no organismo é realizado por lipoproteínas de alta densidade (HDLs) em bovinos e lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) nos humanos (Arikan et al., 2002).

Devido à sua capacidade antioxidante, a molécula de β -caroteno age como absorvente do oxigênio “singlet” e dos radicais hidroxil, produzidos nas reações de oxiredução, os quais causam a peroxidação lipídica levando à ruptura

das membranas celulares. A produção dos radicais livres ocorre nas etapas da esteroidogênese e diminuem a atividade das enzimas citocromo P450 e citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450scc) nas adrenais e tecidos ovarianos, diminuindo a produção de progesterona pelas células luteais (Young et al., 1995).

Estudos comprovam que o β -caroteno regula a esteroidogênese ovariana e a função ovariana normal (Chew, 1994), melhora a produção de esteróides, principalmente progesterona (Young et al., 1995, Graves-Hoagland et al., 1988, Arikan & Rodway, 2000a) e melhora o desenvolvimento e a qualidade folicular em bovinos (Mayer et al., 1975, Schams et al., 1997), citados por Arikan & Rodway, (2000b).

Outro mecanismo pelo qual o β -caroteno pode afetar a função das células luteais é pela estimulação da transcrição do gene 43 conexin, que codifica as proteínas de transmembrana, aumentando a formação das junções densas (Arikan & Rodway, 2000b). A formação destas junções melhora a coordenação entre as células luteais, favorecendo a ação dos hormônios e estimulando a esteroidogênese (Redmer et al., 1991), citados por Arikan & Rodway (2000b).

Rapoport et al. (1998) observaram uma correlação significativa entre as concentrações de β -caroteno e da enzima P450scc no corpo lúteo e a produção de progesterona em bovinos.

Outros estudos têm demonstrado a ação do β -caroteno sobre a sobrevivência embrionária dos animais.

Em ratos suplementados com β -caroteno, observou-se uma alta taxa de crescimento fetal e queda da mortalidade dos filhotes (Chew & Archer, 1983).

Já em suínos, Brief & Chew (1985), suplementando marrãs com 228 mg de β -caroteno injetável, semanalmente do dia da cobertura até três semanas após o parto, observaram uma redução na mortalidade embrionária e o aumento do

tamanho das leitegadas quando comparadas com as não suplementadas. Coffey et al. (1989), citado por Chew, 1993, suplementando porcas multíparas com β -caroteno injetável, nas dosagens de 0, 50, 100 e 200 mg, constataram um aumento linear do tamanho das leitegadas.

Nos bovinos, Bindas et al. (1984) observaram que vacas suplementadas com β -caroteno apresentavam alta intensidade de cio, aumento das taxas de concepção e redução dos cistos foliculares quando comparadas com vacas suplementadas somente com vitamina A.

Na espécie eqüina, poucas são as pesquisas sobre os efeitos da suplementação de β -caroteno na performance reprodutiva da égua e do garanhão.

Em estudo citado por Lewis, (1985), a taxa de concepção em 155 éguas de 6 fazendas suplementadas com β -caroteno via oral, no segundo dia do cio e repetido 2 a 3 dias depois, foi de 91,6% e em 108 éguas que não receberam a suplementação, esta taxa foi de 67,65%.

A suplementação de β -caroteno ativa as respostas do sistema imunológico e diminui a degeneração celular causada pelos radicais livres, tanto nos garanhões como nas éguas.

Já Peltier et al. (1997) não observaram alterações nas concentrações de β -caroteno de éguas mantidas a pasto durante as fases do ciclo estral. A suplementação das éguas com β -caroteno, com injeções diárias de 400 mg durante o estro ou diestro, não teve efeito sobre as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona e no desenvolvimento folicular. Houve efeito da suplementação sobre as concentrações plasmáticas do β -caroteno. Concluíram os autores que a suplementação de β -caroteno nas éguas somente afetaria as funções reprodutivas nos animais submetidos a dietas pobres em caroteno.

2.2 Superovulação

Nos programas de transferência de embriões em eqüinos a maioria dos embriões recuperados é oriunda de uma ovulação simples, a cada ciclo das éguas, sendo que, em apenas 50% das coletas de embriões realizadas, se obtém um embrião (Squires et al., 1999, Squires et al., 2003).

Métodos para o aumento do crescimento folicular e indução de ovulações múltiplas em éguas, por meio de vários protocolos superovulatórios, estão sendo pesquisados no intuito de aumentar o número de embriões recuperados por doadora e, conseqüentemente, aumentar a eficiência dos programas de transferência de embrião, reduzindo seus custos. Além disso, estes métodos podem propiciar a aplicação de outras biotecnologias como a fertilização in vitro (IVF), a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e a injeção de esperma intracitoplasmática (ICSI) (Douglas, 1979, McCue, 1996, Squires et al., 1999, Squire et al., 2003).

Contudo, os resultados científicos obtidos com a aplicação destes métodos são ainda inconsistentes para que a superovulação possa se tornar uma técnica padrão nos programas de transferência de embrião em eqüinos (Squires et al., 2003, McCue, 1996, Hofferer et al., 1991).

O conhecimento do desenvolvimento folicular, que envolve uma série de eventos celulares e hormonais, é necessário para facilitar o entendimento dos mecanismos fisiológicos desencadeados pelo emprego das técnicas de superovulação e, conseqüentemente, aumentar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (Fortune, 2003).

Segundo McCue (1996) as tentativas de induzir ovulações múltiplas nas éguas tem incluído a administração de: gonadotrofina coriônica eqüina (eCG); hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); hormônio foliculo estimulante

de origem suína (FSH-P) e eqüina; extrato de pituitária eqüina (EPE) e vacinas contra a inibina.

2.2.1 Desenvolvimento folicular

Nos eqüinos, a estacionalidade reprodutiva é bem marcante, principalmente nas éguas, apresentando períodos de atividade (estação ovulatória) e inatividade reprodutiva (estação anovulatória, anestro) associados com o comprimento do dia (fotoperíodo), condições climáticas e nutricionais (Nagy et al., 2000).

Durante a estação ovulatória (primavera e verão), o ciclo estral das éguas tem duração média de 21 dias e apresenta uma ou duas ondas de crescimento folicular (Ginther, 1992).

Nas éguas, podem ser observados dois tipos de ondas foliculares durante o ciclo estral: ondas maiores ou ovulatórias, caracterizadas pela presença de folículos dominantes e subordinados, e ondas menores, nas quais os folículos não atingem o diâmetro de folículo dominante e regridem (Ginther, 2000).

As ondas ovulatórias podem ser caracterizadas por uma seqüência de fenômenos, que são denominados recrutamento, com uma fase de crescimento comum dos folículos recrutados; divergência ou seleção e dominância (Driancourt, 2001, Ginther, 2000, Ginther et al., 2002, Donadeu & Ginther, 2003).

Para que ocorra o recrutamento são necessárias concentrações mínimas de FSH, que é considerado o hormônio chave na regulação deste fenômeno (Driancourt, 2001).

Pesquisadores relatam que, nas éguas, a fase de crescimento comum dos folículos tem duração de 6 dias, iniciando com o aparecimento da onda e se estendendo até o início da fase de divergência. Cerca de 7-11 folículos, com

diâmetro médio de 6 mm, estão presentes nesta fase. Com o aumento endógeno de FSH ou a administração de FSH exógeno, experimentalmente, esta fase pode ser prolongada, bloqueando a ocorrência da seleção e possibilitando que vários folículos se tornem dominantes, tanto em vacas como em éguas. Assim, todos os folículos presentes na fase de crescimento comum têm potencial para se tornarem dominantes e podem chegar à ovulação, propiciando a ocorrência de ovulações múltiplas (Driancourt, 2001, Ginther et al., 2001, Ginther et al., 2002, Squires et al., 1986 Rosas et al., 1998).

Segundo Gastal et al.(1997), a fase de divergência é caracterizada pelo crescimento contínuo do folículo maior da onda para tornar-se folículo dominante e a redução ou cessação do crescimento dos demais folículos, denominados subordinados. A diferença entre os diâmetros do futuro folículo dominante e os subordinados ocorre gradualmente desde o surgimento da onda, porque o futuro folículo dominante surge, em média, um dia antes dos demais. Os diâmetros médios dos dois folículos maiores atingiram 22,5 mm e 19,0 mm no início da fase de divergência, 3 dias depois do pico de FSH. O folículo maior rapidamente bloqueia o crescimento do segundo folículo maior, impedindo que ele atinja diâmetro similar.

Durante a fase de dominância folicular ocorre a maturação e o crescimento do folículo ovulatório e os outros (subordinados) regridem totalmente sofrendo atresia (Pierson & Ginther, 1990). O futuro folículo dominante adquire a capacidade de induzir a diminuição das concentrações circulantes de FSH, abaixo daquelas necessárias ao crescimento dos outros folículos e de usar essas baixas concentrações de FSH para o seu crescimento e maturação (Ginther et al., 2002). O LH também é importante no mecanismo da dominância, crescimento e maturação do folículo dominante (Gastal et al., 2000).

Há uma correlação direta entre a presença do folículo dominante e a ausência de recrutamento, uma vez que após a cauterização do folículo dominante, inicia-se imediatamente o recrutamento (Driancourt, 2001).

2.2.2 Aspectos hormonais

O conhecimento das mudanças hormonais durante o ciclo estral das éguas é importante no estudo dos métodos de controle reprodutivo artificial (Ginther, 1992), resumidos na Figura 2.

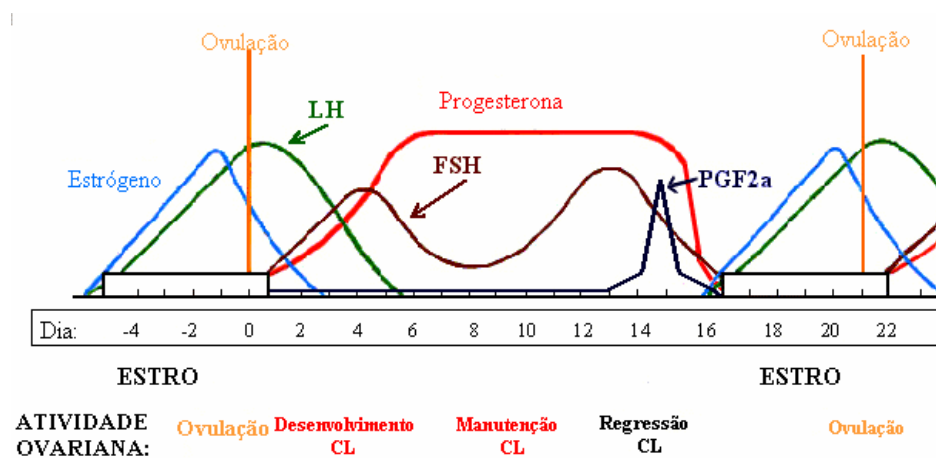


FIGURA 2. Ciclo estral regular das éguas – hormônios.

A ação das gonadotrofinas (FSH e LH) sobre os folículos nos ovários depende do estágio de desenvolvimento folicular e da presença ou não do folículo dominante (Pierson e Ginther, 1990, Driancourt, 2001).

O aparecimento das ondas foliculares maiores e menores nas éguas está associado ao aumento das concentrações de FSH que atingem seu platô ou pico quando o folículo maior atinge o diâmetro de 13 mm (Gastal et al., 1997) e

diminuem dando início ao fenômeno de divergência folicular da onda ovulatória. O declínio das concentrações circulatórias de FSH é necessário para o estabelecimento da divergência, uma vez que a administração de FSH ou o aumento endógeno do FSH com vacinas contra a inibina atrasa ou previne a sua ocorrência (Ginther et al., 2002).

O FSH é essencial ao desenvolvimento folicular (Ginther, 2000, Pedersen et al., 2002). O declínio das concentrações de FSH é causado pelo aumento das concentrações circulatórias de inibina e estradiol, produzidos pelos folículos em crescimento, dando início à fase de divergência folicular e, conseqüentemente, da dominância. Após a divergência, a inibina passa a ser produzida somente pelo folículo dominante (Ginther et al., 2002).

Ginther et al. (2002) também relatam que as concentrações de FSH, após o início da fase de divergência, são suficientes para a continuação do desenvolvimento do folículo dominante e baixa para o desenvolvimento dos demais. Isto acontece porque os folículos dominantes desenvolvem uma sensibilidade maior ao FSH e também ao LH, devido à presença de mais receptores nas células da granulosa.

As concentrações circulatórias de LH aumentam gradualmente durante o estro (McCue, 1996). O LH é necessário para a continuação do crescimento, maturação e ovulação do folículo ovulatório na égua. A expressão de receptores é maior no futuro folículo dominante do que nos outros folículos antes do início da divergência folicular (Watson et al., 2002, Ginther et al., 2002, Donadeu & Ginther, 2003).

2.2.3 Hormônios utilizados na superovulação das éguas

Não há comercialmente produtos hormonais disponíveis para induzir ovulações múltiplas nas éguas. Vários produtos homólogos ou heterólogos têm sido utilizados nas diversas pesquisas que investigam a aplicação da técnica de superovulação na espécie eqüina (Squires et al., 2003).

Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG)

A gonadotrofina coriônica eqüina é uma glicoproteína secretada nos cálices endometriais de éguas prenhes do 42^o ao 150^o dia de gestação, usada para induzir superovulação nos ruminantes. Nas pesquisas, a utilização de doses muito altas deste hormônio nas éguas não afetou o desenvolvimento folicular ou a ovulação, provavelmente devido à incapacidade do eCG de se ligar aos receptores de FSH nos ovários (Squires et al., 2003, McCue, 1996).

Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)

O GnRH é um hormônio protéico (decapeptídeo de cadeia única) produzido pelo hipotálamo, cuja função principal é estimular a liberação de gonadotrofinas (FSH e LH) pela hipófise.

A administração de GnRH induz ovulações múltiplas nas éguas em anestro (Allen et al., 1987, Ginther & Bergfelt, 1990, Johnson, 1987, Jonhson, 1986, Jonhson & Becker, 1988), citados por McCue (1996). Éguas que receberam 100 µg de GnRH por hora ovularam, em média, 3,5 folículos. Estes pesquisadores consideram que, após a administração de GnRH, ocorre o pico de FSH, que é responsável pelas ovulações múltiplas.

Nas éguas cíclicas, a administração de GnRH não foi efetiva para a indução de ovulações múltiplas. Embora o GnRH exógeno estimule a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, os folículos em desenvolvimento secretam inibina que, por mecanismo de feedback negativo, inibe a liberação de FSH endógeno adicional pela hipófise, impedindo o desenvolvimento dos pequenos folículos da onda folicular (McCue, 1996).

Hormônio folículo estimulante (FSH)

A maioria das pesquisas realizadas em eqüinos com FSH utiliza os produtos comerciais disponíveis para medicina veterinária de origem suína (Squire et al., 2003).

No estudo conduzido por Irvine (1981) a ocorrência de ovulações múltiplas foi observada utilizando-se duas injeções subcutâneas de altas doses de FSH-P (150 e 200 mg aplicadas as 8 e 9 horas da manhã, respectivamente) nos dias 15 a 18 pós-ovulação (Dia 0= dia da ovulação). O número médio de folículos pré-ovulatórios foi maior (3,8) nas éguas tratadas do que nas do grupo controle (1,0) e as taxas de ovulação média foram de $1,7 \pm 0,6$ e $1,0 \pm 0,0$, respectivamente.

Squires et al. (1986) compararam a utilização de FSH de origem suína (FSH-P) e EPE para superovular éguas. Após o acompanhamento de um ciclo estral normal dos animais, as éguas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: 1) controle (n=30); 2) tratamento com EPE (n=30) e 3) tratamento com FSH-P (n=18). No dia 12 do diestro (dia 1= primeiro dia do diestro), os animais dos grupos 2 e 3 receberam EPE uma vez ao dia e 150 mg de FSH-P duas vezes ao dia, respectivamente. Observaram que os tratamentos com FSH-P e com EPE alteram ($p < 0,05$) a duração do cio das éguas. As éguas controle tiveram períodos de estro mais curtos (4,3 dias) do que as éguas tratadas com EPE (5,6

dias) e FSH-P (5,4 dias). Os números médios de ovulações foram de 1,0, 2,2, e 1,6 e a porcentagem de ovulações múltiplas 3%, 44,4% e 72,2% para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Concluíram os autores que o EPE foi mais efetivo do que o FSH-P para induzir ovulações múltiplas nas éguas.

Fortune & Kimmich (1993) realizaram uma série de experimentos com FSH-P (Folltropin[®]) visando aumentar a taxa de ovulação das éguas. Testaram doses crescentes de 0, 2, 4, 8, 16 e 32 mg, aplicadas duas vezes ao dia. Os tratamentos foram iniciados no 6^o dia após a ovulação (dia 0 = dia da ovulação) até o aparecimento de folículos \geq a 40,0 mm de diâmetro. A prostaglandina F_{2 α} foi administrada nos dia 5 e 6. As taxas de ovulação obtidas foram, em média, de 1,20; 1,20; 1,00; 1,80; 1,50 e 1,50 e a porcentagem de ovulações duplas de 19%, 17%, 0%, 83%, 54% e 50% nas dosagens de 0, 2, 4, 8, 18, 32 mg, respectivamente. A dosagem de 8 mg foi a mais eficiente e utilizada em estudos subseqüentes durante a estação ovulatória de 1992, nos quais os resultados das taxas de ovulação e porcentagem de duplas ovulações foram similares entre os grupos tratados e controle.

O FSH de origem eqüina (eFSH) foi utilizado por Rosas et al. (1998), que observaram um aumento médio das taxas de ovulação, $2,8 \pm 0,4$ e $4,6 \pm 1,6$ por égua, respectivamente.

Extrato de pituitária eqüina (EPE)

O extrato de pituitária eqüina é o mais utilizado para induzir ovulações múltiplas em éguas. As taxas de ovulação variam porque a quantidade de FSH e LH das preparações não é padronizada. Assim, como nas éguas com ovulação espontânea, a coleta de embriões por ovulação é de aproximadamente 50%, ou seja, éguas que respondem ao EPE com quatro ovulações, geralmente produzem

dois embriões. A coleta de embriões de éguas tratadas com EPE é três a quatro vezes maior do que as não tratadas (Squires et al., 2003).

O primeiro trabalho que obteve sucesso na superovulação de éguas foi feito por Douglas et al. (1974). Éguas em anestro foram tratadas com duas injeções diárias de EPE por um período de 14 dias e 58% dos animais tratados tiveram mais de duas ovulações.

Lapin & Ginther (1977) foram os primeiros pesquisadores a conseguir induzir superovulações durante a estação de monta. As éguas foram tratadas com EPE no final do diestro (dias 11 a 16 após a ovulação) ou durante o estro (do dia 1º ao 6º). Quatro das sete éguas que receberam EPE durante o diestro e 3 das 7 éguas tratadas no estro tiveram mais de duas ovulações.

Douglas (1979), utilizando éguas cíclicas e o protocolo com injeções diárias de EPE nos dias 14 a 20 após a ovulação e a aplicação de 4000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) no dia 20, observou que 6 das 8 éguas tratadas tiveram mais de uma ovulação e as não tratadas, ovulações simples. A porcentagem de embriões coletados em relação ao número de ovulações das éguas tratadas foi menor (35%) em comparação ao grupo controle (65%).

Woods e Ginther (1982) utilizaram EPE para induzir ovulações múltiplas nas éguas, na estação anovulatória, quando iniciado em diferentes estádios de desenvolvimento folicular. As éguas foram tratadas com doses diárias de EPE durante 14 dias até que fosse observada a presença de folículo maior que 45 mm ou a ovulação. Além disso, em alguns ensaios o hCG foi administrado quando o maior folículo atingiu diâmetro \geq a 35 mm, no intuito de melhorar as taxas de ovulação. O EPE induziu ovulação em 95% das éguas e 64% das éguas tiveram ovulações múltiplas. Os melhores resultados foram obtidos quando um folículo maior estava presente no início do tratamento. O número médio de ovulações por égua tratada foi de $2,4 \pm 1,5$ e o número de médio de éguas com ovulações múltiplas, foi de $3,1 \pm 1,4$.

Existem várias limitações quando se utiliza EPE para induzir ovulações múltiplas em éguas. Uma dessas limitações é a possível redução da viabilidade dos embriões das éguas superovuladas e a redução do número de embriões coletados por ovulação (Douglas, 1979, Dippert et al., 1994, Hinrichs, 1998).

Vários pesquisadores têm tentado otimizar as taxas de ovulação das éguas superovuladas. Dippert et al. (1992), estudando éguas cíclicas, compararam o período em que foi iniciado o tratamento: EPE (25 mg) no início do diestro (dia 5 após a ovulação), grupo 1, e no final do diestro (dia 12), grupo 2. Verificaram que a porcentagem de éguas com ovulações múltiplas foi maior (73,3%) no tratamento iniciado no dia 5, quando comparado com o iniciado no dia 12 (13,3%). Os tratamentos não influenciaram na duração do cio. O número de embriões coletados por égua foi similar ($p>0,05$) entre os tratamentos, entretanto, o número de embriões coletados por ovulação foi menor no grupo 1 ($0,4 \pm 0,5$) em relação ao grupo 2 ($0,8 \pm 0,6$).

Outros pesquisadores têm demonstrado que a resposta aos tratamentos superovulatórios é dependente do tamanho do folículo presente no início do tratamento (Woods & Ginther, 1982, Pierson & Ginther, 1990).

Rosas et al. (1998), estudando dois tratamentos superovulatórios, EPE e fração enriquecida de FSH eqüino, observaram o aumento das taxas de ovulação por égua tratada ($3,6 \pm 0,7$ e $4,6 \pm 1,6$, respectivamente) sem interferir na taxa de recuperação embrionária. Os tratamentos não influenciaram a duração do estro.

Alvarenga et al. (2001), com o objetivo de investigar o efeito de duas injeções diárias de EPE (25 mg) sobre a resposta superovulatória de éguas cíclicas e a produção de embriões, observaram que o número de ovulações das éguas tratadas duas vezes ao dia foi maior (7,1) do que daquelas tratadas uma vez ao dia (2,4). O número de embriões coletados foi 1,6 e 3,5 nas éguas tratadas uma ou duas vezes ao dia, respectivamente. Concluíram que duas injeções

diárias aumentam a resposta superovulatória e a taxa de recuperação embrionária.

Scoggin et al. (2002) estudaram o efeito da dose e da frequência do tratamento com EPE sobre a resposta ovulatória, a produção de embrião e do pré-tratamento com GnRH análogo para estimular o desenvolvimento folicular após o tratamento com EPE. Verificaram que o GnRH não melhorou a resposta ovariana ao EPE ou as taxas de coleta de oócitos.

Imunização contra inibina

A inibina é um hormônio glicoprotéico produzido pelas células da granulosa dos folículos em crescimento e presente no fluido folicular responsável pela inibição da produção de FSH pela hipófise por meio do mecanismo de feedback negativo. A imunização ativa ou passiva contra inibina tem sido utilizada para aumentar as taxas de ovulação das éguas, induzindo o aumento da secreção endógena de FSH (McCue, 1996, Ginther et al., 2002, Squires et al., 2003).

Segundo Ginther et al. (2002) a inibina-A pode ser um dos hormônios que contribuem para o aumento da sensibilidade dos folículos às gonadotrofinas em associação com o mecanismo da divergência. Porém estes mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos nas éguas.

2.3 Transferência de embriões em eqüinos

Nas duas últimas décadas a utilização da transferência de embriões e de outras biotecnologias em eqüinos aumentou significativamente em países como a Argentina, Estados Unidos da América (EUA), França e Brasil, após a liberação do uso desta biotecnologia pela maioria das associações de raça (Squires et al.,2003).

O sucesso da técnica de transferência de embriões e do desenvolvimento de novas tecnologias da reprodução em eqüinos depende de uma série de fatores que afetam, direta ou indiretamente, os procedimentos inerentes às técnicas. Estes fatores devem ser identificados para maximizar a aplicação destas biotecnologias (Squires & Seidel, 1995, Squires et al., 1999, Carnevale et al., 2000, Squires et al., 2003).

2.3.1 Fatores que afetam a coleta de embriões

Segundo Squires et al. (1999) os três fatores que mais afetam a coleta de embriões são: a história reprodutiva da doadora, o dia em que é realizada a coleta e a fertilidade dos garanhões.

História reprodutiva da doadora

Diversos estudos têm demonstrado que as taxas de coleta embrionária e de prenhez são menores quando se utilizam doadoras consideradas velhas e/ou com histórico de infertilidade em comparação com aquelas reprodutivamente saudáveis (Squires & Seidel, 1995, Carnevale et al., 2000, Squires et al., 2003).

Carnevale et al. (1995) verificaram que éguas velhas produzem oócitos defeituosos, independente de alterações no oviduto ou patologias uterinas. Já

Ball et al. (1989), descrevem que as causas da redução das taxas de coleta nestes animais são provenientes de patologias uterinas e do oviduto, que favorecem a mortalidade embrionária precoce.

Dia da realização da coleta

A maioria das coletas em éguas doadoras é realizada no 7^o ou 8^o dia após a ovulação (dia 0 = dia da ovulação) e o número de embriões coletados é similar nas coletas realizadas no 7^o, 8^o e 9^o dias. Porém, nas coletas realizadas no 6^o dia, há uma queda de 10% a 15% nas taxas de recuperação embrionária, ou seja, número de embriões recuperados em função do número de coletas realizadas (Squires et al., 2003).

Os embriões coletados no 6^o dia após a ovulação são menores e mais resistentes ao congelamento e descongelamento porque possuem uma alta relação superfície/volume que permite uma desidratação adequada antes que o congelamento intracelular ocorra (Slade et al., 1985)

Fertilidade do garanhão

A influência do garanhão sobre os índices de recuperação embrionária é relatada por Douglas (1979), que obteve índices de recuperação embrionária de 36% e 72% com doadoras submetidas à monta natural utilizando dois garanhões. Resultados semelhantes foram relatados por Mckinnon & Squires (1998a) utilizando garanhões com características seminais normais.

Fleury et al. (2001a, b) recomendam cuidados especiais com os garanhões nos programas de transferência de embrião ao observarem efeito significativo ($p < 0,05$) da fertilidade do garanhão sobre as taxas de recuperação embrionária de doadoras.

2.3.2 Fatores que afetam as taxas de prenhez

Diversos estudos mostram que as taxas de prenhez após a transferência do embrião são influenciadas por vários fatores como o método de transferência, o tamanho e a idade do embrião, a idade e a história reprodutiva das doadoras, a receptora, a qualidade embrionária, a estação do ano e outros (Squires et al., 2003, Carnevale et al., 2000, Squires et al., 1999, McKinnon & Squires, 1988b, Squires & Seidel, 1995, Carney et al., 1991).

A qualidade do embrião equino é considerada o fator mais importante e que mais afeta as taxas de prenhez nos programas de transferência de embrião (Squires et al., 2003).

Qualidade embrionária e desenvolvimento embrionário

A avaliação da qualidade embrionária e, conseqüentemente, da viabilidade embrionária dos eqüinos, pode ser feita por meio de cinco testes: a) avaliação morfológica; b) desenvolvimento em cultura; c) metabolismo de substratos fluorescentes; d) fluorescência das células e e) testes metabólicos (Vanderwall, 1996).

O estágio de desenvolvimento embrionário deve ser identificado após a coleta para que se possa fazer corretamente a avaliação da qualidade embrionária.

Os embriões dos eqüinos chegam ao útero no 5^o ou 6^o dia após a ovulação (Oguri & Tsutsumi, 1974), no estágio de desenvolvimento mórula, caracterizado por uma massa compacta formada por 16 ou mais células, denominadas blastômeros. Com a continuação das divisões celulares, clivagens, os estádios de desenvolvimento seguintes são: o de blastocisto inicial, no qual observa-se o início da formação de uma cavidade denominada blastocelo;

blastocisto e blastocisto expandido, este apresentando blastocele completamente formada e circundado por uma cápsula, que é uma membrana protéica acelular (Squires & Seidel., 1995, Squires et al., 2003).

Segundo Vanderwall (1996), a avaliação da qualidade embrionária por meio da avaliação morfológica é o método mais utilizado, porque é mais rápido, não invasivo e requer equipamentos relativamente simples para sua realização.

O sistema de classificação morfológica utilizado nos programas de transferência de embrião, descrito por McKinnon & Squires (1988b), classifica os embriões em categorias (escores) de 1 a 5: 1 = excelente; 2 = bom; 3 = moderado; 4 = pobre; 5 = não fertilizados ou mortos. As características avaliadas são: compactação dos blastômeros, blastômeros danificados, coloração e forma do embrião, tamanho do espaço perivitelínico, integridade da zona pelúcida e estágio de desenvolvimento comparado com a idade do embrião. Mais recentemente, alguns pesquisadores têm modificado o sistema de categorias de cinco pontos para quatro, incluindo os embriões mortos ou com degenerações graves na categoria 4 (Carney et al., 1991).

Estudos têm demonstrado a importância da avaliação morfológica dos embriões como um bom indicador da viabilidade embrionária e da probabilidade do estabelecimento de prenhez nos programas de transferência de embrião em equinos (Carney et al., 1991, Vanderwall, 1996, Carnevale et al., 2000).

A transferência de embriões classificados nos escores 1 e 2 resultaram em taxas de prenhez maiores, 60% a 70%, quando comparadas com as de embriões classificados nos escores de 3 ou mais, 30% a 45% (Ball et al., 1989, Squires et al., 1999, Carnevale et al., 2000, Squires et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Período e local

O experimento foi conduzido no período de novembro de 2002 a abril de 2003 na Fazenda Santo Antônio, localizada no município de Três Corações, sul de Minas Gerais, Brasil. O município situa-se a 21° 41' 15'' S de latitude e 45° 18' 45'' W de longitude.

3.2 Animais

No experimento foram utilizadas 16 éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador, de 4 a 18 anos, aptas à reprodução, pertencentes a duas categorias, éguas solteiras e potras, mantidas a pasto e recebendo suplementação diária de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e sal mineralizado *ad libitum* durante todo o período experimental.

3.3 Período pré-experimental

Todos os animais foram submetidos a uma anamnese prévia, com exame ginecológico completo: útero (tamanho, consistência, simetria, contratilidade e conteúdo) e ovário (tamanho, consistência e funcionalidade), por meio da palpação transretal e inspeção dos órgãos genitais externos e zonas adjacentes, para avaliação da capacidade reprodutiva.

As éguas foram acompanhadas durante um ciclo estral normal para avaliação do comportamento sexual e detecção de anormalidades do ciclo estral. A rufiação foi feita diariamente, individual ou em grupo, para detecção do início e final do estro, sendo considerados em estro os animais que apresentavam, pelo

menos, dois dos sintomas clássicos do estro, ou seja, contração e relaxamento dos lábios vulvares com eversão do clitóris, eliminação de fluxo e/ou urina, levantamento de cauda.

Por meio da palpação transretal diária, durante o período do estro, foi feito o controle folicular das éguas, as mensurações do tamanho dos ovários (comprimento, largura e espessura), do diâmetro dos folículos e número de folículos, obedecendo ao sistema proposto por Greenhof & Kenney (1975). Os dados referentes ao comportamento sexual, desenvolvimento folicular e ovulação foram anotados em fichas individuais.

3.4 Tratamentos

Foram utilizadas duas dosagens de β -caroteno injetável (800 e 1200 mg), intramuscular, fornecido pela Vallee S.A¹ em éguas tratadas ou não com FSH-P - Folltropin -V^{®2} injetável, conforme mostrado na Figura 3. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis tratamentos, em duas etapas:

Etapa 1 - Coleta nº 1

Tratamento 1 (n=8): não tratadas;

Tratamento 2 (n=8): protocolo superovulatório: as éguas receberam duas injeções diárias de Folltropin-V[®] de 10 mg cada, intramuscular, aplicadas as 8 e 18 horas, nos dias 15, 16, 17, 18, 19 e 20 após a ovulação (ovulação = dia 0) ou até detecção de um ou mais folículos com diâmetro = 3,0 cm.

¹ Valle S.A. Av Hum, 1500 – Distrito Industrial – CEP 39404-003 – Montes Claros – Minas Gerais.

² Folltropin V (Vetrepharm- Ontário, Canada, fornecido pela Nutricell[®]): Extrato de FSH altamente purificado obtido de glândulas pituitárias suínas, liofilizado. Cada frasco de 20 ml contém FSH equivalente a 400 mg de NIH-FSH-P1. Quando reconstituída, a solução final contém 20 mg de FSH/ml.

3.5 Manejo reprodutivo

3.5.1 Controle do desenvolvimento folicular

Todos os animais foram rufiados diariamente para detecção do início do estro e de sua duração. Após o início do estro, foi feita a palpação transretal dos ovários, diariamente, para o acompanhamento do desenvolvimento folicular, tamanho e número de folículos, e da ovulação, da mesma maneira descrita no período pré-experimental.

As éguas com folículo $\geq 3,5$ cm foram cobertas por monta natural com o mesmo garanhão, de fertilidade conhecida, em dias alternados até a detecção da ovulação (dia 0 = dia da ovulação).

3.6 Coleta de embriões

Foram realizadas duas coletas por animal, totalizando 32 coletas, sendo que, após a 1ª coleta, as éguas receberam uma aplicação de 2 ml de PGF_{2 α} (Lutalyse® - Dinoprost Trometamina- Tuco – Divisão de Upjohn Produtos Farmacêuticos LTDA., São Paulo, Brasil), intramuscular, para promover o retorno da atividade cíclica. O estro seguinte ao tratamento com prostaglandina não foi aproveitado para efeito dos tratamentos. Todas as coletas foram realizadas no 6º dia após a ovulação, conforme esquema de coletas e aplicação de PGF_{2 α} , Figura 4.

Diagrama de coletas

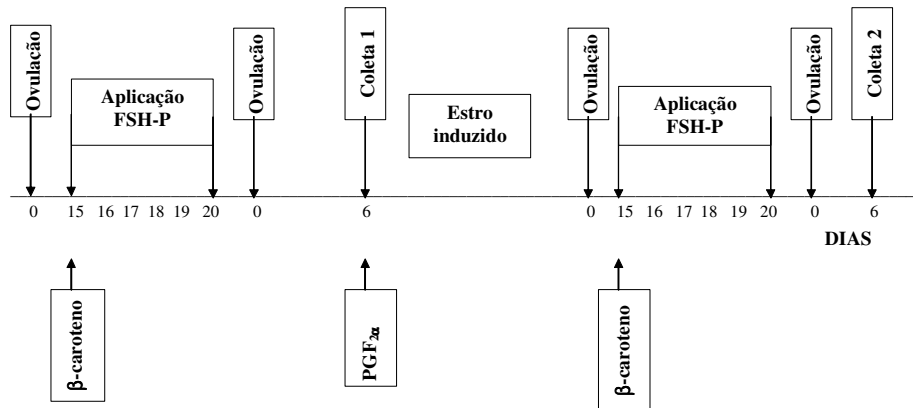


FIGURA 4: Esquema de coletas, aplicação de FSH-P e suplementação de β-caroteno.

Para a coleta dos embriões foi utilizado o método não-cirúrgico, segundo a metodologia proposta por Squires & Seidel (1995).

Para a realização das coletas os animais foram mantidos em tronco de contenção onde foram feitas inicialmente a bandagem da cauda, com atadura de crepe, que foi erguida e fixada com auxílio de uma corda, seguida da limpeza e higienização dos órgãos genitais externos, com água corrente e sabão de coco e a secagem com papel-toalha, antes de se iniciar o procedimento de coleta.

Em seguida, efetuou-se a passagem do cateter (Sonda Equina Bivona[®] – Bivona Medical Technologies, USA), possuindo balão de capacidade de 75 ml, por entre os lábios vulvares e, por via mano-vaginal, foi introduzido pela cérvix até atingir o corpo do útero. Logo após, o balão foi inflado com 50 ml de ar e o cateter tracionado para que o balão fosse mantido em íntimo contato com a porção uterina da cérvix, a fim de impedir refluxo do meio infundido. Uma vez fixado o cateter no corpo uterino, foi acoplado ao cateter o equipo Nutricell[®]

(Nutricell[®]- Nutrientes Celulares LTDA., Campinas, SP) para proceder à irrigação e drenagem uterina para a colheita dos embriões. Estas manobras foram orientadas através da palpação transretal e com a ajuda de auxiliares.

Para a irrigação e lavagens uterinas foi utilizado, solução fisiológica de ringer com lactato de sódio[®] (Laboratório Sanobiol LTDA., Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil) pré-aquecido a 37°C. Para cada coleta foram utilizados três litros do meio de coleta, que foram infundidos por gravidade e de maneira fracionada. Todo o líquido drenado do útero passou através do coletor de embriões Millipore[®] (Nutricell[®]- Nutrientes Celulares LTDA., Campinas, SP, Brasil) As manobras de irrigação e drenagem foram feitas com auxílio da manipulação do útero, por meio da palpação transretal, a fim de controlá-las e evitar retenção de líquido em excesso no útero. Após cada coleta, a sonda uterina Bivona[®] (Bivona Medical Technologies – USA) foi lavada com detergente neutro e, em seguida, com água destilada e acondicionada em saco plástico lacrado até o próximo procedimento de coleta.

Logo após a realização da coleta, o conteúdo do coletor de embriões foi transferido para uma placa de petri de 100 mm x 20 mm, não pirogênica e estéril (Corning Incorporation- Corning, NY, EUA), com fundo quadriculado para facilitar a localização dos embriões. O coletor foi lavado com o meio de coleta (50 ml), utilizando seringa descartável estéril, sem êmbolo de borracha, e o líquido passado para outra placa de petri.

Com o auxílio de uma lupa, os embriões foram rastreados, localizados e, por meio de palheta de 0,5 cc, acoplada a seringa de insulina, aspirados e transferidos para uma placa de cultura de tecido de 35 mm (Iwaki-brand, Japan), estéril, contendo meio de manutenção DPBS (Dulbecco modificado - Dulbecco's phosphate-buffered saline) com BSA (albumina sérica bovina) 0,4%[®] (Nutricell[®]-Nutrientes Celulares LTDA., Campinas, São Paulo, Brasil), previamente filtrado (filtro para esterilização, 25 mma, 22 – Millex - Milipore

Brasil) onde permaneciam por 30 minutos e, em seguida, submetidos ao protocolo de congelamento.

Enquanto permaneciam no meio de manutenção, os embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, e blastocisto expandido) e qualidade, de acordo com o sistema de classificação morfológica, descrito no Quadro 1, classificados de 1 a 5, sendo 1= excelente e 5 = morto.

QUADRO 1: Sistema de classificação morfológica e grau de qualidade de embriões eqüinos.

Grau 1	Excelente – um embrião ideal, esférico, com células de tamanho, cor e textura uniformes
Grau 2	Bom – imperfeições secundárias tais como poucos blastômeros extrusados, forma irregular ou separação trofoblástica
Grau 3	Moderado – embrião definido, mas nenhum problema severo, presença de blastômeros extrusados, células degeneradas ou blastocele colapsada.
Grau 4	Pobre – problemas severos, blastocele colapsada, numerosos blastômeros extrusados, células degeneradas mas com uma massa embriônica aparentemente viável
Grau 5	Não fertilizados ou mortos – oócitos não fertilizados ou embriões totalmente degenerados.

Fonte: Adaptado de Vanderwall, 1996.

Todos os embriões foram congelados em palhetas de 0,25 ml (Nutricell-Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP , Brasil) em glicerol a 10%, utilizado

como crioprotetor, pelo método tradicional de resfriamento lento proposto por Picket (1985) modificado.

3.7 Análise estatística

As variáveis estudadas e analisadas foram: duração do estro, tamanho do folículo ovulatório, crescimento folicular, número de folículos palpáveis, qualidade embrionária.

Com a ausência de efeito interativo dos tratamentos analisados separadamente, foram testados os efeitos principais (ou seja, agruparam-se tratamentos semelhantes): tratamento com FSH-P (n=16, tratamentos 2, 5 e 6) versus não tratados (n=16, tratamentos 1, 3 e 4); suplementação com β -caroteno (n=16, tratamentos 3, 4, 5 e 6) versus não suplementados (n=16, tratamentos 1 e 2).

A análise do efeito do tratamento com FSH-P, suplementação de β -caroteno e a possível interação sobre a duração do estro, tamanho do folículo ovulatório, número de folículos palpáveis e qualidade embrionária, após a realização do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, foi realizada pelo procedimento GENMOD (SAS, 1995) uma vez que os dados seguem a distribuição de Poisson. As médias foram obtidas pelo procedimento GLM do SAS (1995).

A análise de regressão linear foi utilizada para verificar o efeito do tratamento com FSH-P e da suplementação de β -caroteno sobre o crescimento folicular do folículo ovulatório, pelo procedimento PROCREG, do SAS (1995).

A taxa de recuperação embrionária foi definida como o número de embriões recuperados dividido pelo número de ovulações obtidas nas 32 coletas realizadas no experimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) e *cross over* em fatorial 2 x 2 (suplementadas com β -caroteno X não suplementadas e tratadas com FSH-P X não tratadas).

O modelo estatístico foi:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{(ij)}, \text{ em que:}$$

Y_{ij} = efeito do i -ésimo tratamento com FSH-P no j -ésimo suplementação de β -caroteno no k -ésimo animal;

μ = média geral do experimento;

A_i = efeito do tratamento com FSH-P i ($i=0,1$);

B_j = efeito da suplementação de β -caroteno j ($j=0,1$);

AB_{ij} = efeito da interação entre os fatores;

$e_{(ij)}$ = erro experimental.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade morfológica embrionária

A suplementação de β -caroteno melhorou a qualidade dos embriões coletados ($P=0,04$) (Tabela 1), mas não foi observado efeito do tratamento com FSH-P sobre o número e qualidade embrionária ($P=0,20$) (Tabela 2).

TABELA 1: Efeito da suplementação com β -caroteno injetável sobre a qualidade embrionária e número de embriões

Tratamento	Nº de coletas	Nº de embriões	Qualidade média dos embriões ³	Erro padrão da Média	Probabilidade ¹
β -caroteno ²	16	9	1,22	0,22	P = 0,041
Sem β -caroteno	16	8	2,62	0,21	
Total geral	32	17	1,88	0,64	

¹ GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com β -caroteno injetável (Vallee S.A.), 800 e 1200 mg, intramuscular, no 15º dia após a ovulação.

³ Qualidade morfológica: **1-** Excelente; **2-** Bom; **3-** Regular; **4-** Ruim; **5-** Morto ou degenerado (Vanderwall, 1996).

TABELA 2: Efeito do tratamento com FSH-P sobre a qualidade embrionária e o número de embriões coletados

Tratamento	Nº de coletas	Nº de embriões	Qualidade média dos embriões³	Erro padrão da média	Probabilidade¹
Tratadas com FSH-P²	16	9	1,47	0,21	P = 0,20
Não tratadas	16	8	2,37	0,22	
Total geral	32	17	1,88	0,64	

¹GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com 10 mg de Folltropin® intramuscular, duas vezes ao dia, nos dias 15 a 20 após a ovulação ou até a presença de um folículo $\geq 3,5$ cm.

³ Qualidade morfológica: **1-** Excelente; **2-** Bom; **3-** Regular; **4-** Ruim; **5-** Morto ou degenerado (Vanderwall, 1996).

Na literatura consultada, não existem relatos de pesquisas avaliando a utilização da suplementação β -caroteno em doadoras de embriões da espécie eqüina.

Estudos em outras espécies têm demonstrado a importância do β -caroteno e da vitamina A na regulação das funções reprodutivas (Thompson, 1975, Chew, 1993). Além de ser o principal precursor da vitamina A, importante moduladora da esteroidogênese ovariana (Talavera & Chew, 1988), o β -caroteno tem uma ação direta na reprodução devido, principalmente à sua capacidade antioxidante, que previne a peroxidação lipídica causada pelos radicais livres e, conseqüentemente, seus efeitos danosos sobre as células foliculares, do corpo lúteo, uterinas e embrionárias (Chew, 1993, Young et al., 1995, Stall et al., 1997, Rapoport et al., 1988, Arikan e Rodway, 2000a, b, Arikan et al., 2002, Cantrell et al., 2003).

De acordo com estes estudos, a melhora da qualidade dos embriões das éguas doadoras promovida pelo β -caroteno no presente estudo pode ser explicada pela ação direta deste caroteno, por meio de suas propriedades antioxidantes, preservando a integridade e atividade funcional das células, principalmente ovarianas, uterinas e embrionárias, ou indireta, favorecendo a esteroidogênese ovariana e a produção de progesterona, pela ação da vitamina A, melhorando o ambiente uterino e tubárico e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário (Schams et al., 2002, Jindal et al., 1996, Whalley et al., 1997, Thomas et al., 1992, Bazer, 1975).

4.2 Número de folículos palpáveis e resposta superovulatória

Observa-se, na Tabela 3, que o número médio de folículos palpáveis nos ovários das éguas doadoras durante o estro foi maior ($P=0,0175$) nos animais tratados com FSH-P em relação àqueles não tratados, porém, não houve diferença no número médio de ovulações.

TABELA 3: Número médio de folículos palpáveis nos ovários e ovulações de éguas tratadas ou não com FSH-P

Tratamento	Nº de éguas	Nº médio de ovulações/égua ³	Nº médio de folículos	Erro padrão da média	Probabilidade ¹
Tratadas c/ FSH-P ²	16	1 ± 0,0	3,19	0,34	P = 0,0175
Não tratadas	16	1 ± 0,0	1,87	0,34	
Total geral	32	1 ± 0,0	2,53	1,35	

¹ GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com 10mg de Folltropin® intramuscular, duas vezes ao dia, nos dias 15 a 20 após a ovulação ou até a presença de um folículo $\geq 3,5$ cm.

³ Média \pm Erro padrão da média.

De acordo com este resultado, o tratamento com FSH-P induziu o crescimento dos folículos do grupo recrutado, ao qual pertencia o folículo ovulatório, tornando-os palpáveis por via transretal. Mas, uma vez estabelecida a seleção e a dominância do folículo ovulatório, os demais tornaram-se subordinados e sofreram atresia, impedindo a ocorrência de ovulações múltiplas. Conforme Pierson & Ginther (1990), após a seleção fisiológica do folículo ovulatório os outros sofrem atresia.

Segundo Ginther et al. (2002) e Ginther (2000), o pico de FSH endógeno ocorre quando os folículos das ondas ovulatórias nas éguas (ondas maiores) atingem 13 mm de diâmetro e promove o crescimento de vários folículos do grupo recrutado, inclusive do futuro folículo ovulatório. À medida que estes folículos se desenvolvem produzem estradiol e inibina que, por mecanismo de feedback negativo, promovem a diminuição das concentrações endógenas de FSH, dando início aos mecanismos de divergência (desvio) e dominância. Uma vez ativados estes mecanismos, os folículos menores (subordinados), devido às

baixas concentrações de FSH endógeno, entram em atresia. O folículo dominante continua crescendo, provavelmente devido ao aumento de receptores de FSH nas células da granulosa induzido pelo estradiol folicular. Assim, de acordo com estas observações, pode-se inferir que o tratamento com FSH-P utilizado neste estudo, apesar de ter aumentado o número de folículos palpáveis nos ovários dos animais tratados, não foi capaz de evitar ou retardar o fenômeno da divergência e dominância e, conseqüentemente, não foi capaz de promover ovulações múltiplas nas éguas.

McCue (1996) e Driancourt (2001) também observaram que o FSH é o hormônio chave para induzir o recrutamento dos folículos e o crescimento inicial dos mesmos.

A resposta superovulatória das éguas pode ser influenciada por outros fatores, entre eles o período do ciclo estral (Dippert et al., 1992, Squires et al., 1986 e 1987, Woods et al., 1983a, Rosa et al, 1988, Alvarenga et al., 2001, Lapin & Ginther, 1977) e a existência de divergência entre os diâmetros dos dois folículos maiores (Woods e Ginther, 1982, 1985) no momento do início dos tratamentos superovulatórios.

No presente estudo, o início do tratamento se deu no 15^o dia após a ovulação (final do diestro). Woods e Ginther (1982, 1985), estudando a dinâmica folicular em éguas tratadas com EPE, verificaram que o número de folículos presentes nos ovários (> 10 mm) no 15^o dia após a ovulação representava o número de folículos que poderiam chegar à ovulação após a administração do EPE, mas que a existência de uma diferença maior em diâmetro entre os dois folículos maiores, no momento do início do tratamento com EPE, diminuiu a eficiência do tratamento para induzir ovulações múltiplas. A não ocorrência de múltiplas ovulações, no presente estudo, pode ter sido influenciada por estes fatores que, interagindo, afetaram a ação das gonadotrofinas sobre os folículos ovarianos. Além disso, é possível que, nesta

fase do ciclo estral, segundo Pierson e Ginther (1990), a ação hormonal tenha sido afetada pelo estágio de desenvolvimento folicular e a presença ou não do folículo dominante.

Ao contrário do que foi observado neste estudo, a ocorrência de ovulações múltiplas é relatada por outros pesquisadores que utilizaram o FSH-P com a finalidade de promover superovulação nas éguas. Irvine (1981), utilizando altas doses de FSH-P (injeções subcutâneas de 150 e 200 mg as 8 e 9 horas da manhã, respectivamente, nos dias 15 a 18 pós-ovulação), observou que as éguas tratadas tiveram 3,8 folículos pré-ovulatórios e as éguas controle apenas 1,0 e taxa de ovulação média de $1,7 \pm 0,6$ e de $1,0 \pm 0,0$, respectivamente. Squires et al. (1986), utilizando FSH-P na dose de 150 mg, duas vezes ao dia, associado a aplicação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ no primeiro dia do tratamento superovulatório, relataram um aumento no número de folículos com diâmetro entre 25 e 30 mm antes da ovulação e a ocorrência de 44,4% de múltiplas ovulações. Porém, estes resultados foram semelhantes ao do grupo controle. Também, em uma série de estudos com FSH-P (Folltropin®), Fortune e Kimmich (1993) obtiveram taxas de ovulações duplas melhores nas doses de 8 (83%), 16 (54%) e 32 mg (50%), injetadas duas vezes ao dia, do 6º dia até a presença de folículos ≥ 40 mm, e aplicação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ nos dias 5 e 6.

Assim, quando comparados os resultados desses trabalhos com os resultados obtidos no presente estudo, em relação aos protocolos utilizados e a ocorrência ou não de ovulações múltiplas, pode-se inferir que, possivelmente, à utilização de dosagens mais altas do hormônio superovulatório (FSH-P) ou a associação com prostaglandinas poderiam melhorar a resposta superovulatória dos animais.

Não houve efeito da suplementação de β -caroteno sobre o número de folículos palpáveis e na resposta superovulatória das éguas ($P=0,50$), conforme Tabela 4.

TABELA 4: Número médio de folículos palpáveis e ovulações de éguas suplementadas ou não com β -caroteno

Tratamento	Nº de éguas	Nº médio de ovulações/égua ³	Nº médio de folículos	Erro padrão da média	Probabilidade ¹
β - caroteno ²	16	1 \pm 0,0	2,69	0,34	P = 0,50
Sem β -caroteno	16	1 \pm 0,0	2,37	0,34	
Total geral	32	1 \pm 0,0	2,53	1,35	

¹ GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com β -caroteno injetável (Vallee S.A.), 800 e 1200 mg, intramuscular, no 15º dia após a ovulação.

³ Média \pm Erro padrão da média.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos sobre os efeitos da suplementação de β -caroteno sobre a resposta dos equinos aos tratamentos superovulatórios.

Trabalhos em outras espécies têm demonstrado que a vitamina A, principal metabólito oriundo da clivagem da molécula de β -caroteno no organismo animal, não afeta a resposta superovulatória (Chew, 1994, Eberhart et al., 1999), o que também não ocorreu no presente estudo.

4.3 Duração do estro

As Tabelas 5 e 6 mostram que não houve efeito do tratamento com FSH-P (P=0,80) e da suplementação de β -caroteno (P=0,90) sobre a duração do estro das éguas.

TABELA 5: Efeito da aplicação de FSH-P sobre a duração do estro das éguas

Tratamento	Número de estros (n)	Duração média do estro (dias)	Erro padrão de média	Probabilidade ¹
Tratadas com FSH-P²	16	8,00	0,46	P = 0,80
Não tratadas	16	8,25	0,46	
Total geral	32	8,12	1,86	

¹GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com 10 mg de Folltropin® intramuscular, duas vezes ao dia, nos dias 15 a 20 após a ovulação ou até a presença de um folículo $\geq 3,5$ cm.

TABELA 6: Efeito da suplementação de β -caroteno sobre a duração do estro das éguas

Tratamento	Número de estros (n)	Duração média do estro (dias)	Erro padrão da média	Probabilidade ¹
β-caroteno ²	16	8,06	0,46	P = 0,90
Sem β-caroteno	16	8,18	0,46	
Total geral	32	8,12	1,86	

¹ GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com β -caroteno injetável (Vallee S.A.), 800 e 1200mg, intramuscular, no 15º dia após a ovulação.

A não interferência dos tratamentos na duração dos estros das éguas no presente estudo, possivelmente, pode ser atribuída à não influência dos tratamentos sobre as concentrações intrafoliculares e sanguíneas de estradiol e progesterona durante a fase folicular. Apesar do aumento do número de folículos palpáveis promovido pelo FSH-P, apenas o folículo dominante se desenvolveu e os demais tornaram-se subordinados e sofreram atresia. Assim, provavelmente,

as concentrações de estradiol e progesterona não se alteraram e, conseqüentemente, não se verificaram diferenças na duração do estro. Resultados semelhantes foram observados por Lapin e Ginther (1977) e Rosas et al. (1988).

Já nos estudos realizados por Squires et al. (1986), os tratamentos com EPE e FSH-P alteraram ($P < 0,05$) a duração do estro. As éguas não tratadas tiveram períodos de estros mais curtos do que as éguas tratadas.

A duração média geral do estro neste estudo ($8,12 \pm 1,85$ dias) é similar às encontradas nos estudos de Lapin e Ginther (1977), Diminick et al. (1992), Dowsett et al. (1993), Johnson & Becker (1993) e Rosas et al. (1998). Concluiu-se que a duração média do estro das éguas da raça Mangalarga Marchador é semelhante à de outras raças.

4.4 Diâmetro do folículo ovulatório

O diâmetro médio do folículo ovulatório dos animais não foi afetado pelo tratamento superovulatório ($P=0,99$) ou pela suplementação com β -caroteno ($P=0,86$), conforme ilustrado nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

TABELA 7: Efeito da aplicação de FSH-P sobre o diâmetro médio do folículo ovulatório das éguas

Tratamento	Número de folículos ovulatórios (n)	Diâmetro médio do folículo ovulatório (cm)	Erro padrão da média	Probabilidade ¹
Tratadas com FSH-P²	16	4,56	0,18	P = 0,99
Não tratadas	16	4,56	0,18	
Total geral	32	4,56	0,74	

¹GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com 10 mg de Folltropin® intramuscular, duas vezes ao dia, nos dias 15 a 20 após a ovulação ou até a presença de um folículo $\geq 3,5$ cm.

³ Média \pm Erro padrão da média (Proc. GLM; SAS, 1995)

Tabela 8: Efeito da suplementação de β -caroteno sobre o diâmetro médio do folículo ovulatório das éguas

Tratamento	Número de folículos ovulatórios (n)	Diâmetro médio do folículo ovulatório (cm)	Erro padrão da média	Probabilidade ¹
β-caroteno ²	16	4,50	0,18	P = 0,87
Sem β-caroteno	16	4,62	0,18	
Total geral	32	4,56	0,74	

¹ GENMOD (SAS, 1995).

² Éguas tratadas com β -caroteno injetável (Vallee S.A.), 800 e 1200 mg, intramuscular, no 15º dia após a ovulação.

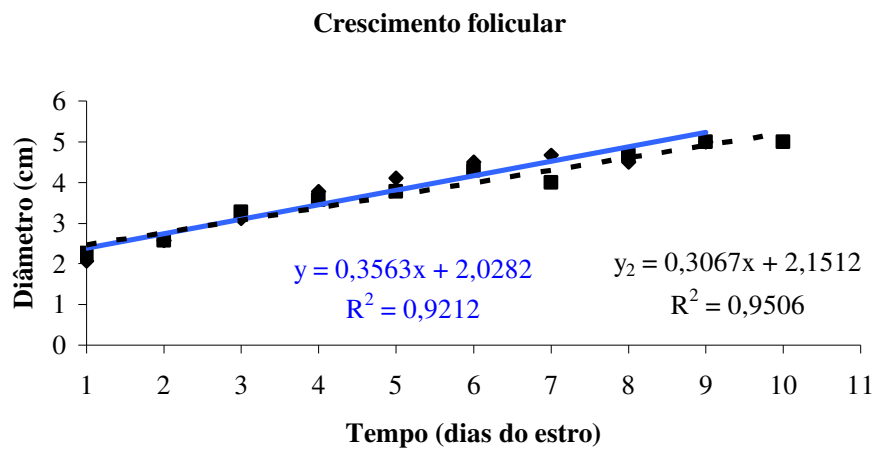
Dippert et al. (1992), Becker & Johnson (1992), Johnson & Becker (1993) e Rosas et al.(1998) também não observaram efeito dos tratamentos superovulatórios sobre o diâmetro médio do folículo ovulatório .

A média geral do diâmetro do folículo ovulatório ao tempo da ovulação neste estudo ($4,56 \pm 0,74$ cm) foi similar à obtida por Dimmick et al. (1992), estudando ciclos estrais normais.

Segundo Ginther et al. (2002), o diâmetro do folículo ovulatório pode ser um indicativo de sua capacidade de produção hormonal, principalmente esteróides, e ovulatória. Folículos menores são menos vascularizados e possuem as camadas da teca e da granulosa menos desenvolvidas e, conseqüentemente, sua funcionalidade prejudicada.

4.5 Crescimento do folículo ovulatório

Não houve diferença ($p > 0,05$) quanto ao crescimento do folículo ovulatório durante o período de estro dos animais submetidos ou não ao tratamento com FSH-P (Figura 5) e dos animais suplementados ou não com β -caroteno (Figura 6).



----- Éguas tratadas com FSH-P = y_2
 _____ Éguas não tratadas = y

FIGURA 5 Crescimento do folículo ovulatório em diâmetro (cm) durante os dias de estro dos animais submetidos ou não ao tratamento com FSH.

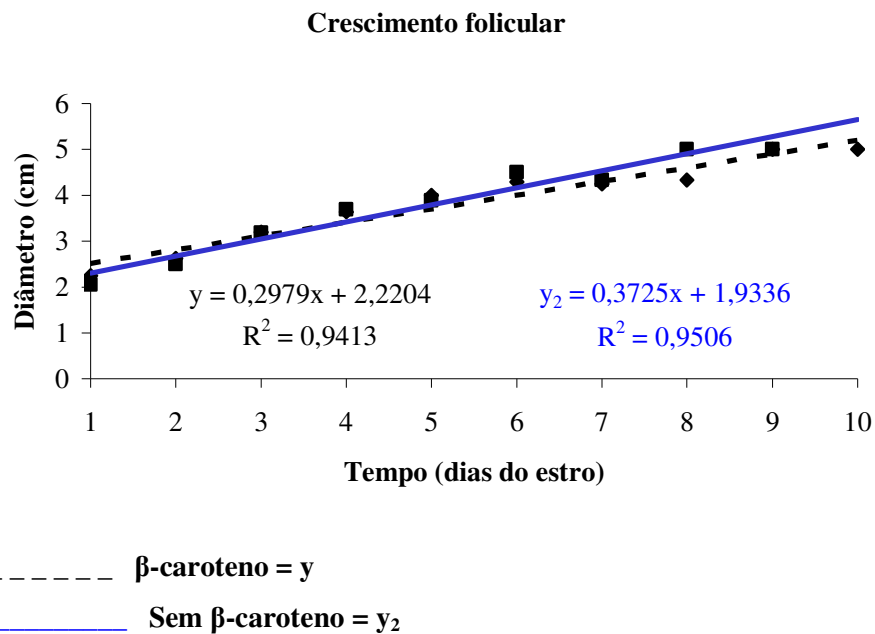


FIGURA 6 Crescimento do folículo ovulatório em diâmetro (cm) durante os dias de estro dos animais suplementados ou não com β -caroteno.

Observa-se que, no presente estudo, o padrão de crescimento folicular foi linear e crescente (positivo) em relação à variável tempo (dias do estro) para os efeitos principais testados ($R^2 = 0,95$ e $0,92$, tratamento com FSH-P versus não tratados; $R^2 = 0,94$ e $0,95$, suplementação com β -caroteno versus não suplementação, respectivamente). A taxa de crescimento folicular diária foi: tratamento com FSH-P ($0,30$ cm/dia); não tratados ($0,35$ cm/dia); suplementadas β -caroteno ($0,29$ cm/dia) e não suplementadas ($0,37$ cm/dia).

Donadeu & Ginther (2003), por meio de ultra-sonografia, descreveram taxa de crescimento médio de até $2,7$ mm/dia dos folículos ovulatórios de éguas durante a estação ovulatória.

Segundo Ginther et al. (2002), o crescimento folicular nas éguas e, principalmente, do folículo ovulatório é influenciado pela interação de vários fatores, como as gonadotrofinas (LH e FSH) e a presença de seus receptores, além de reguladores intra-ovarianos.

4.6 Taxa de recuperação embrionária

Reunindo-se os dados de todo o experimento foram recuperados 17 embriões de um total de 32 ovulações observadas e 32 coletas realizadas nas éguas, obtendo-se uma taxa de recuperação embrionária de 53,12%, conforme Tabela 9.

TABELA 9: Taxa de recuperação embrionária, número total de coletas e de ovulações das éguas (total geral)

	Nº de coletas (n)	Nº de ovulações (n)	Nº de embriões recuperados (n)	Taxa de recuperação embrionária
Tratadas com FSH-P¹	16	16	9	9/16 (56%)
Não tratadas	16	16	8	8/16 (50%)
Total geral	32	32	17	17/32 (53,12%)

¹ Éguas tratadas com 10 mg de Folltropin® intramuscular, duas vezes ao dia, nos dias 15 a 20 após a ovulação ou até a presença de um folículo $\geq 3,5$ cm.

Segundo Squires et al. (2003), o número médio de embriões recuperados de ovulações simples das éguas doadoras, em programas comerciais de transferência de embriões, é de aproximadamente 50%. Vários fatores influenciam as taxas de recuperação embrionária, como a idade da égua doadora, a qualidade do sêmen, o número de ovulações e o dia da coleta.

Todas as coletas de embrião no presente estudo foram realizadas no 6º dia após a ovulação (dia 0 = ovulação). Estudos comparando o efeito do dia da coleta sobre a taxa de recuperação embrionária foram realizados e observou-se que, nas coletas realizadas no 6º dia após a ovulação as taxas de recuperação embrionária são significativamente (10% a 15%) menores do que as realizadas nos dias 7 a 9 após ovulação (Squires et al.,1999).

Iuliano & Squires (1985) relataram que as taxas de recuperação embrionária de coletas realizadas no 6º dia após a ovulação foram menores (66%) do que aquelas realizadas no 8º dia (82%). Porém, as realizadas no 7º dia não diferiram das demais (75%).

5 CONCLUSÕES

A suplementação das éguas com β -caroteno melhorou a qualidade embrionária, confirmando uma das hipóteses do presente estudo, mas não interferiu na resposta do animais ao tratamento superovulatório com FSH-P. Este, apesar de ter promovido o aumento do número de folículos em crescimento, não foi capaz de aumentar o número de ovulações e de estruturas coletadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Woburn, v. 56, n. 5, p. 879-887, Sept. 2001.

ARIKAN, S.; RODWAY, R. G. Effects of cyclodextrin-encapsulated β -carotene on progesterone production by bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 64, n. 3/4, p. 149-160, Dec. 2000a.

ARIKAN, S.; RODWAY, R. G. Effects of high density lipoprotein containing high or low β -carotene concentrations on progesterone production and β -carotene uptake and depletion by bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 253-263, Sept. 2000b.

ARIKAN, S.; SANDS, H. S.; RODWAY, R. G.; BATCHELDER, D. N. Raman spectroscopy and imaging of β -carotene in live corpus luteum cells. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 71, n. 3/4, p. 249-266, June 2002.

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; WEBER, J. A.; WOOD, V. M. Survival of Day-4 embryos from young, normal and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 85, n. 1, p. 187-209, Jan. 1989.

BAZER, F. W. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 41, n. 5, p. 1376-1382, Nov. 1975.

BECKER, S. E.; JOHNSON, A. L. Effects of gonadotropin-releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 4, p. 1208-1215, Apr. 1992.

BESENFELDER, U.; SOLTY, L.; SEREGI, J.; BREM, G. Influence of β -carotene on fertility when using embryo transfer programs. **Theriogenology**, Woburn, v. 39, n. 5, p. 1093-1109, May 1993.

BESENFELDER, U.; SOLTY, L.; SEREGI, J.; MULLER, M.; BREM, G. Different roles for β -carotene and vitamin A in the reproductive of rabbits. **Theriogenology**, Woburn, v. 45, n. 8, p. 1583-1591, June 1996.

BINDAS, E. M.; GWAZDAUSKAS, F. C.; AIELLO, R. J.; HERBEIN, J. H.; MCGILLIARD, M. L.; POLAN, C. E. Reproductive and metabolic characteristics of dairy cattle supplemented with β -carotene. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 6, p. 1245-1249, June 1984.

BRIEF, S.; CHEW, B. P. Effects of vitamin A and β -carotene on reproductive performance in gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, n. 4, p. 998-1004, Apr. 1985.

CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 36, n. 1, p. 23-32, July 1991.

CANTRELL, A.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, G. T.; RANCAN, F.; BÖHM, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in model membrane environment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 412, n. 1, p. 47-54, Apr. 2003.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction**, Madison: 1995. (Monograph Series). in press.

CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, Woburn, v. 56, n. 5, p. 965-979, Oct. 2000.

CHEW, B. P. Beta-carotene appears to improve reproductive performance. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 9, p. 14, May 1994.

CHEW, B. P. Effects of supplemental β -carotene and vitamin A on reproduction in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 1, p. 247-252, Jan. 1993.

CHEW, B. P.; ARCHER, R. G. Comparative role of vitamin A and β -carotene on reproduction and neonate survival in rats. **Theriogenology**, Woburn, v. 20, n. 4, p. 459-472, Oct. 1983.

CHEW, B. P.; RASMUSSEN, H.; PUBOLS, M. H.; PRESTON, R. L. Effects of vitamin A and β -carotene on plasma progesterone and uterine protein secretions in gilts. **Theriogenology**, Woburn, v. 18, n. 6, p. 643-654, Dec. 1982.

CHIOCCA, E. A.; DAVIES, P. J. A.; STEIN, J. P.; The molecular basis of retinoic acid action. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 23, p. 11584-11589, Aug. 1988.

CHIOCCA, E. A.; DAVIES, P. J. A.; STEIN, J. P. Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 39, n. 3, p. 293-304, Mar. 1989.

COMBS JR, G. F. **The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health**. 2. ed. New York: Academic Press, 1992. 526 p.

DIMMICK, M. A.; GIMENEZ, T.; SCHIAGER, R. L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian vs. Quarter Horse mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 31, n. 1/2, p. 123-129, Mar. 1993.

DIPPERT, K. D.; HOFFERER, S.; PALMER, E.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L. initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, Woburn, v. 38, n. 4, p. 695-710, Oct. 1992.

DIPPERT, K. D.; JASKO, D. J.; SEIDEL Jr., G. E.; SQUIRES, E. L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 41, n. 7, p. 1411-1423, May 1994.

DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Interrelationships of estradiol, inhibin, and gonadotropins during follicle deviation in pony mares. **Theriogenology**, Woburn, Oct. 2003. In press.

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

DOUGLAS, R. H.; NUTI, L.; GINTHER, O. J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, Woburn, v. 2, n. 1, p. 133-42, 1974.

DOWSETT, K. F.; KNOTT, L. M.; WORDSWART, R. A.; BODERO, D. A. V. Seasonal variation in the estrous cycle of mares in the subtropics. **Theriogenology**, Woburn, v. 39, n. 3, p. 631-653, Mar. 1993.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, Apr. 2001.

DURING, A.; SMITH, M. K.; PIPER, J. B.; SMITH, J. C. β -Carotene 15, 15'-Dioxygenase activity in human tissues and cells: evidence of an iron dependency. **Journal of Nutricional Biochemistry**, New York, v. 12, n. 11, p. 640-647, Nov. 2001.

EBERHARDT, D. M.; WILL, W. A.; GODKIN, J. D. Retinol administration to superovulated ewes improves in vitro embryonic viability. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 60, n. 6, p. 1483-1487, June 1999.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; CLEGHINI, E. C. C.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Influência do garanhão e da técnica de inseminação sobre os índices de recuperação embrionária e de gestação em um programa de transferência de embriões em eqüinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 34-37, 2001a.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001b.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3/4, p. 135-163, Oct. 2003.

FORTUNE, J. E.; KIMMICH, T. L. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. **Equine Veterinary Journal Supplement**, London, v. 15, p. 95, 1993.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, n. 6, p. 1320-1327, Dec. 1997.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; NOGUEIRA, G. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 4, p. 925-940, Mar. 2000.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare (basic and applied aspects)**. 2. ed. Cross plains: Equiservices, 1992. 642 p.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 119-126, Jan. 1990.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 61-79, July 2000. Supplement.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 65, p. 638-647, July. 2001.

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

GRAVES-HOAGLAND, R. L.; HOAGLAND, T. A.; WOODY, C. O.; Effect of β -caroteno and vitamin A on progesterone production by bovine luteal cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1058-1062, Apr. 1988.

GREENHOF, G. R.; KENNEY, R. M. Evaluation of reproductive status of nonpregnant mares. **Journal of American Veterinary Medicine Associate**, Washington, v. 10, n. 9, p. 449-458, Sept. 1975.

HARNEY, J. P.; MIRANDO, L. C.; SMITH, L. C.; BAZER, F. W. Retinol-binding protein: A major secretory product of the pig conceptus. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 42, n. 3, p. 523-532, Mar. 1990.

HINRICHS, K. Production of embryos by assisted reproduction in the horse. **Theriogenology**, Woburn, v. 49, n. 1, p. 13-21, Jan 1998.

HOFFERER, S.; DUCHAMP, G.; PAMER, E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 341-349, 1991. Supplement.

HOLT, A. J.; RODWAY, R. G.; FINDLAY, J. B. C.; SANDS, H.; BATCHELDER, D. N. Studies on β -carotene in bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility: Abstracts Series**, Cambridge, v. 15, p. 46-47, 1995.

IRVINE, C. H. G. Endocrinology of the estrous cycle of the mare: applications to embryo transfer. **Theriogenology**, Woburn, v. 15, n. 1, p. 85-104, Jan. 1981.

IULIANO M. F.; SQUIRES, E. L. Effect of the age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, n. 1, p. 258-263, Jan. 1985.

JINDAL, R.; COSGROVE, J. R.; AHERNE, F. X.; FOXCROFT, G. R. Effect of nutrition on embryonal mortality in gilts: Association with progesterone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 3, p. 620, Mar. 1996.

JOHNSON, A. L.; BECKER, S. E. Hormonal control of ovulation in the mare. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, n. 1/4, p. 209-226, Oct. 1993

LAPIN, D. R.; GINTHER, O. J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 44, n. 5, p. 834-842, May. 1977.

LEWIS, L. D. **Alimentação e cuidados do cavalo**. São Paulo: Livraria Rocca, 1995.

McCUE, P. M. Superovulation. **Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 1-11, Apr. 1986.

McDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 486.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 305-333, Aug. 1988a

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of equine embryo- a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Washington, v. 192, n. 3, p. 4016, Feb. 1988b.

MOHAMED, N.; HASCHIM, R.; RAHMAN, N. A.; ZAIN, S. M. An insight to the cleavage of β -carotene to vitamin A: a molecular mechanics study. **Journal of Molecular Structure (Theochemistry)**, Amsterdam, v. 538, n. 1/3, p. 245-252, Mar. 2001

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 245-262, July 2000.

O'FALLON, J. V.; CHEW, B. P. The subcellular distribution of β -carotene in bovine corpus luteum. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 177, n. 3, p. 406-411, Dec. 1984.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non –surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 41, n. 2, p. 313-320, Dec. 1974.

PEDERSEN, H. G.; BERROCAL, B.; THOMSON, S. R. M.; WATSON, E. D. Gonadotropic control of follicular growth in the mare. **Theriogenology**, Woburn, v. 58, n. 2-4, p. 465-468, Aug. 2002.

PELTIER, M. M.; PELTIER, M. R.; SHARP, D. C.; OTT, E. A. Effect of β -Carotene administration on reproductive function of horse and pony mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 48, n. 6, p. 893-906, Oct. 1997.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development. **Animal of Reproduction Science**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 131-144, Apr. 1990.

PICKETT, B.W. Techniques for freezing Mammalian Embryos. Short Course Proceedings. **Animal Reproduction Laboratory**, Colorado State University, 1985.

RAPOPORT, R.; SKLAN, D.; WOLFENSON, D.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; HANUKOGL, L. Anti oxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine oestrous cycle. **Biochemistry Biophysics Acta**, Paris, v. 1380, n. 1, p. 133-140, Mar. 1998.

REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Contact – dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. **Endocrinology**, Bethesda, v. 129, n. 5, p. 2757-2766, Nov. 1991.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The functions of uterine secretions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 875-892, Mar. 1988.

ROSAS, C. A.; ALBERIO, R. H.; BARAÑAO, J. L.; AGÜERO, A.; CHAVES, M. G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 49, n. 7, p. 1257-1264, May. 1998.

SAS INSTITUTE. **SAS/Stat user's guide**. Version 6. 12. 4. ed. Cary, 1995. v. 2, 1686 p.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Woburn, v. 232, n. 1/2, p. 53-65, July 2002.

SCHINDLER, J. Retinoids, polyamines, and differentiation. In: SHERMAN, M. I. (Ed.). **Retinoids and cell differentiation**. New York: CRC Pres, 1986. p. 137.

SCHWEIGERT, F. J.; WIERICH, M.; RAMBECK, W. A.; ZUCKER, H. Carotene cleavage activity in bovine ovarian follicles. **Theriogenology**, Woburn, v. 30, n. 5, p. 923-930, Nov. 1988.

SCHWEIGERT, F. J.; ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 575-579, Mar. 1988.

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 cycles mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 58, n. 1, p. 151-164, July 2002.

SLADE, N.P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E.L.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL Jr, G.E. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, Woburn, v.24, n. 1, p. 45-58, July 1985.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BREMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, Woburn, v. 59, n. 1, p. 151-170, Jan. 2003.

SQUIRES, E. L.; GARCIA, R. H.; GINTHER, O. J.; VOSS, J. L.; SEIDEL, G. E. Comparisson of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 26, n. 5, p. 661-669, Nov. 1986.

SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Woburn, v. 51, n. 1, p. 91-104, Jan. 1999.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. **Collection and transfer of equine reproduction**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, n. 8, Jan, 1995.

STAHL, W.; NICOLAI, S.; BRIVIBA, K.; HANUSCH, M.; BROSZEIT, G.; PETERS, M.; MARTIN, H. D.; SIES, H. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. **Carcinogenesis**, Arlington, v. 18, n. 1, p. 89-92, Jan. 1997.

TALAVERA, F.; CHEW, B. P. Comparative role of retinol, retinoic acid and β -carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 611-615, Mar. 1988.

THOMAS, P. G. A.; LESLIE, M. V.; HANSEN, P. J. Retinol binding protein is produced by bovine endometrium and accumulates in uterine secretions in a progesterone-dependent manner. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 55-66, Feb. 1992.

THOMPSON, S. Y. Role of carotene and vitamin A in animal feeding. In: BOURN, G. H.; BASEL, S. K. (Ed.). **Word review of nutrition and dietetic**. New York, 1975. v. 21, p. 224.

VANDERWALL, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 61-83, Apr. 1996.

WHALEY, S. L.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Evidence that injection of vitamin A before mating may improve embryo survival in gilts fed normal or high-energy diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 4, p. 1071-1077, Apr. 1997.

WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; STEELE, M.; HEALD, M.; LEASK, R.; GROOME, N. P.; RILEY, S. C. Concentration of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 55-67, Mar. 2003.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Ovarian response, pregnancy rate, and incidence of multiples fetuses in mares treated with an equine pituitary extract. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 415-421, 1982. Supplement.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, Woburn, v. 20, p. 347-355, 1979.

YOUNG, F. M.; LUDERER, W. B.; RODGERS, R. J. The antioxidant β -carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. *Mol. Cell. Endocrinology*, Bethesda, v. 109, n. 1, p. 113-118, Mar. 1995.