

LUIS EDUARDO PEREIRA DE ANDRADE FERREIRA

**INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA
SOBRE PADRÕES REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE ÉGUAS
SUBMETIDAS A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO**

RECIFE-PE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

LUIS EDUARDO PEREIRA DE ANDRADE FERREIRA

INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA
SOBRE PADRÕES REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE ÉGUAS
SUBMETIDAS A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador:

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares

Coorientadores:

Prof.^a Dra. Aurea Wischral

Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu

RECIFE-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- F383i Ferreira, Luis Eduardo Pereira de Andrade.
 Influência da somatotropina recombinante bovina sobre padrões reprodutivos e metabólicos de éguas submetidas a transferência de embrião / Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira. – Recife, 2018.
 72 f.: il.
- Orientador(a): Anísio Francisco Soares.
 Coorientador(a): Aurea Wischral, Claudio Coutinho Bartolomeu.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2018.
 Inclui referências e anexo(s).
1. Hormônio do crescimento 2. IGF-I 3. Dinâmica folicular 4. Vascularização Folicular 5. Ultrassonografia 6. Doppler I. Soares, Anísio Francisco, orient. II. Wischral, Aurea, coorient. III. Bartolomeu, Claudio Coutinho, coorient. IV. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TROPICAL

INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA
SOBRE PADRÕES REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE ÉGUAS
SUBMETIDAS A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

Tese de Doutorado elaborada por

LUIS EDUARDO PEREIRA DE ANDRADE FERREIRA

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares

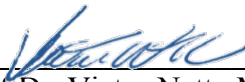
Orientador – Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof.a Dra. Sildivane Valcacia Silva
Universidade Federal da Paraíba – UFPB



Prof.a Dra. Ellen Cordeiro Bento da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof Dr. Victor Netto Maia
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG - UFRPE



Dr. André Mariano Batista
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

*Para meu filho **Eduardo Chalegre de Andrade** nascido durante a elaboração dessa tese eu a dedico.*

AGRADECIMENTOS

Após um contínuo esforço para realizar mais um objetivo acadêmico é impossível deixar de perpetuar agradecimentos aqueles que foram decisivos na construção de minha formação. Assim eu agradeço:

Primeiramente a Deus por proporcionar paciência e sabedoria para realizar os procedimentos necessário para obter este título, acreditando que sempre esta presente guiando meus passos e colocado pessoas boas no meu caminho.

A todos meus familiares no nome de meus pais, Antônio Francisco de Andrade Ferreira e Ângela Maria P. de Andrade Ferreira, que novamente participaram efetivamente de mais uma etapa da minha vida. Ajudando na execução do projeto e me proporcionando tempo para me dedicar ao doutorado, por assumirem tarefas cotidianas de minha responsabilidade.

Agradeço a minha companheira Aline Cristiane Araújo Chalegre, por mais uma vez apresentar paciência e compreensão ilimitada para entender todas as ausências e estresses ocorridos neste período, assim como ser um berço de carinho para me dar conforto e proporcionar descanso para recuperar as energias. Sendo figura efetiva no suporte para manutenção de todas as etapas do doutorado, executando inúmeras tarefas de bastidores.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Anísio Francisco Soares, Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu e Prof.^a Dra. Aurea Wischral, por aceitarem me orientar e acreditarem no meu compromisso. Em particular a Prof. Dr. Anísio Francisco Soares, por ter intermediado todas as etapas do doutorado e ainda pela sua participação na minha formação acadêmica desde da época da graduação, quando tive o privilégio de ser seu monitor.

Agradeço ao Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos e ao Laboratório de Análises Clínicas da Clínica de Bovinos de Garanhuns cedidos para mensuração das variáveis metabólicas e hormonais. Assim como aos professores Glória Isolina Boente Pinto Duarte (UFPE) e Fabio Naro (Universidade de Roma) que graças ao PVE-CAPES processo 88887102500/2015-00, pode dar o apoio necessário na aquisição de insumos para o desenvolvimento de uma das etapas. Aproveitando para deixar mais um agradecimento aos médicos veterinários da clínica de bovinos Dr. José Augusto Basto Afonso e Dra. Carla Lopes de Mendonça, por mais uma vez me aconselharem em etapas decisivas do projeto de pesquisa.

Agradeço ao Haras Brejo das Flores por proporcionar a realização das atividades de campo desta pesquisa. Disponibilizando animais, estrutura e funcionários. Por fim deixo meus agradecimentos aos membros formadores da banca de devesa e qualificação do doutorado, por aceitarem esse compromisso infinitamente importante para formação do pesquisador.

RESUMO

A ação da somatotropina recombinante bovina (r-bST) é pouco descrita em equinos, tendo objetivado avaliar a sua influência na dinâmica folicular, coleta de embriões, vascularização folicular e perfil metabólico. Dez éguas sem raça definida foram submetidas a avaliações ultrassonográficas diárias, por via transretal, durante o intervalo interovulatório, avaliando-se apenas os folículos ≥ 5 mm, sofrendo ainda coletas de sangue e avaliações ultrassonográficas em modo Doppler colorido a cada 48 horas. Cinco éguas foram tratadas com 500 mg de r-bST no primeiro e no 14º dia após ovulação, e as demais com soro fisiológico, formando o grupo tratado (GT) e controle (GC), respectivamente. A apresentarem folículos dominantes com diâmetro ≥ 40 mm, todas foram induzidas a ovular com hCG, inseminadas após 24 horas e submetidas a coleta de embrião seis dias após ovulação. No primeiro experimento os dados foram agrupados de acordo com o diâmetro do folículo dominante nas fases de emergência, divergência, dominância, pré-ovulatória, indução, inseminação e ovulação, sendo todas as éguas usadas duas vezes, no mesmo grupo, respeitando o intervalo de dois ciclos estrais, entre as repetições. No segundo experimento o percentual de vascularização folicular foi determinado subjetivamente, considerando apenas os momentos da segunda utilização das éguas. As concentrações de IGF-I, NEFA, glicose e proteína total foram mensurados em todos os momentos, com exceção do IGF-I com avaliações apenas no primeiro, sexto, 14ª e no último dia do intervalo interovulatório. O GT apresentou crescimento folicular precoce (± 3 dias) para as fases de emergência, divergência, dominância e pré-ovulatória, assim como para o seu maior folículo subordinado, que iniciou seu crescimento mais cedo. A taxa de recuperação de embriões não diferiu entre os grupos (90% para o GC e 70% para o GT), sendo coletadas 16 estruturas, obtendo uma não fecundada e as demais entre mórula e blastocisto inicial para o grupo GC e mórula e mórula compacta para o GT, com qualidade de excelente (dois grupos) a pobre (apenas no GC). O GT apresentou maior crescimento da vascularização folicular a partir do oitavo dia pós ovulação ($p \leq 0,05$), mesmo sem diferenças nas taxas de vascularização. As concentrações de IGF-I e NEFA apresentaram aumentos significativos no D6 e D14 para IGF-I e no D16 para o NEFA, porém mantendo-se dentro dos padrões fisiológicos. A glicose e a proteína total se mantiveram constantes. Desta forma, conclui-se que a r-bST influencia a dinâmica folicular das éguas, levando a uma antecipação do desenvolvimento folicular e favorecendo a vascularização folicular periférica sem prejuízos a homeostase corporal podendo ser utilizada para encurtar o ciclo estral.

Palavras Chave: Hormônio do crescimento, IGF-I, dinâmica folicular, vascularização folicular, ultrassonografia Doppler.

ABSTRACT

The action of r-bST is poorly described in equines, and this research evaluated its influence on follicular dynamics, embryo collection, follicular vascularization and metabolic profile. Ten mares were submitted to daily transrectal ultrasonography evaluation during the interovulatory interval, with only follicles ≥ 5 mm being evaluated, and blood Doppler ultrasonography was performed every 48 hours. Five mares were treated with 500 mg of r-bST at the first and 14th day post ovulation, and other five mares were treated with saline, forming the treated (TG) and control (CG) groups, respectively. When the follicle reached the diameter ≥ 40 mm, the ovulation was induced with hCG, insemination was performed after 24 hours and embryos collected six days after ovulation. In the first experiment the data were grouped according to the follicular diameter in the phases of emergence, divergence, dominance, preovulatory, induction, insemination and ovulation, all mares being used twice, respecting the interval of two estrous cycles, between repetitions. In the second experiment were evaluated the follicular diameter and follicular vascularization percentage, considering only the moments of the second use of the mares. Concentrations of IGF-I, NEFA, glucose and total protein were measured at all times, with the exception of IGF-I which was evaluated only at the first, sixth, 14th and last day of the interovulatory interval. The TG showed precocious follicular growth (3 days) for the emergence, divergence, dominance and pre-ovulatory phases, as well as for its major subordinate follicle, which began its growth early. The embryo recovery rate was 90% for the GC and 70% for the TG, with 16 structures being collected, obtaining an unfertilized and as another between morula and initial blastocyst for the CG group and morula and compact morula for the GT, with quality of excellent (two groups) to poor (only CG). The TG presented higher percentage of vascularized follicle wall, at the eighth day post ovulation, even without significant differences in the vascularization rates. The concentrations of IGF-I and NEFA showed significant increase in D6 and D14 for IGF-I and D16 for NEFA, but remained within physiological levels. Glucose and total protein concentrations remained constant. It was concluded that r-bST influenced the follicular dynamics of the mares, leading to an anticipation of follicular development and improving the follicular wall vascularization, keeping the body homeostasis, and can be used for reduce the estrous cycle period.

Keywords: Growth hormone, IGF-I, follicular dynamics, follicular vascularization, Doppler ultrasonography.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Estágios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral. (ROCHA et al., 2011)16
- Figura 2** - Imagens ultrassonográficas em modo B de ovários equinos. A figura A mostra um ovário com sete folículos (imagens anecóicas) e a figura B mostra um folículo pré-ovulatório medindo 40,0 mm.19
- Figura 3** - Imagens de ultrassonografia Doppler colorido ilustrando a vascularização do folículo pré-ovulatório (A) e do corpo lúteo quatro dias após ovulação (B).20
- Figura 4** - Imagem demonstrando os tipos de Doppler. A - Doppler colorido; B - Doppler de amplitude; C - Doppler pulsado. (adaptado de GINTHER, 2007)21
- Figura 5** - Visão superior e perspectiva de um modelo tridimensional de um folículo dominante criado a partir de um software para formação de imagens tridimensionais a partir de imagens ultrassonográficas modo Doppler bidimensionais. (ARASHIRO et al., 2013).....21
- Figura 6** - Embriões equinos segundo a graduação de qualidade. A - Embrião grau 1 no estágio de blastocisto inicial. B – Embrião grau 2 no estágio de blastocisto inicial com presença de blastômeros extrusados (setas). C - Embrião grau 3 no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas). (adaptado de MCCUE, P. M, 2011)25

ARTIGO 1

- Figura 1-** Distribuição das médias ($\pm$ desvio padrão) dos diâmetros dos folículos dominante (FD), 1ª subordinado (1ªFS) e 2ª subordinado (2ªFS) do grupo controle (A) e tratamento (B) no decorrer do ciclo estral das éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST. Segunda aplicação de r-bST (▼).....37
- Figura 2-** Distribuição das médias ($\pm$ desvio padrão) do número de folículos (em área) e dos diâmetros foliculares (em linhas) estimados através das taxas de crescimento folicular e dos diâmetros das fase de recrutamento (R), divergência (Di), dominância (Do), pré-ovulatória (Po), indução ovulatória (I), inseminação artificial (IA) no decorrer do ciclo estral das éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).38
- Figura 3-** Distribuição das médias ($\pm$ desvio padrão) dos diâmetros do 1ª folículo subordinado (1ªFS) do dos grupos controle (GC) e tratamento (GT), no decorrer do ciclo estral das éguas tratadas com r-bST. Aplicação do r-bST (▼). Folículo subordinado ≥ 22 (▽).39
- Figura 4-** Distribuição das porcentagens acumuladas de ovulações no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST.....40

ARTIGO 2

Figura 1 - Representação de três fotos do maior diâmetro folicular retiradas de um mesmo vídeo para avaliação subjetiva da porcentagem de vascularização folicular periférica obtida através de ultrassonografia Doppler colorido de ovários equinos.....49

Figura 2 - Vascularização folicular periférica média ($\pm$ erro padrão) no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).....51

Figura 3 - Exemplos de imagens ultrassonográfica em modo Doppler colorido demonstrando a vascularização folicular periférica do maior folículo em diferentes momentos do ciclo estral de uma égua tratada com r-bST.....51

Figura 4 - Níveis plasmáticos médios ($\pm$ erro padrão) do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina Tipo 1 (IGF-I) no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (grupo tratamento - GT) ou não (grupo controle - GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).....52

Figura 5 - Concentração média ($\pm$ erro padrão) de NEFA e do IGF-1 no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (grupo tratamento - GT) ou não (grupo controle - GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).....53

Figura 6 - Concentrações plasmáticas médias ($\pm$ erro padrão) de Glicose e Proteína Plasmática Total (PPT) no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (grupo tratamento - GT) ou não (grupo controle - GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).....54

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 - Estágios de desenvolvimento do embrião equino.....	25
Quadro 2 - Graduação do embrião de acordo com um sistema de 4 pontos.....	26
Quadro 3 - Expressão de RNAm para o IGF-I, IGF-II e receptores de IGF em folículos do ovário de mamíferos.....	28

ARTIGO 1

Tabela 1 - Médias ($\pm$ desvio padrão) dos dias do ciclo estral, diâmetros foliculares, taxa de crescimento folicular e vascularização folicular periférica das fases de emergência, divergência, dominância, pré-ovulatória, indução ovulatória, inseminação artificial e ovulatória de éguas tratadas com r-bST.....	41
Tabela 2 - Taxa de recuperação embrionária por coleta, número, estágio e qualidade embrionária de éguas tratadas com r-bST	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%VF - Percentual de vascularização folicular
ANOVA - Análise de variância
BMP - Proteína morfogenética óssea
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CL - Corpo lúteo
Dn - Dia número
EGF - Fator de crescimento epidérmico
ELISA - Enzimaimunoensaio
FGF - Fator de crescimento fibroblástico
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
GC - Grupo controle
GDF - Fator de crescimento e diferenciação
GH - Hormônio de crescimento
GHRH - Hormônio de liberação do hormônio do crescimento
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas
GT - Grupo Tratamento
hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana
IETS - Sociedade internacional de transferência de embrião
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP - Proteína transportadora plasmática de IGF
LH - Hormônio luteinizante
NEFA - Ácidos graxos não esterificados
ØF - Diâmetro folicular
P4 - Progesterona
PGF - Prostaglandina
PT - Proteína total
r-bST - Somatotropina recombinante bovina
TE - Transferência de embrião
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Dinâmica Folicular	14
2.1.1. Ciclo estral.....	14
2.1.2. Sazonalidade reprodutiva	15
2.1.3. Ondas foliculares	16
2.2. Vascularização folicular.....	18
2.2.1. Avaliação ultrassonográfica folicular	19
2.2.2. Ultrassonografia modo Doppler colorido	20
2.3. Transferência de embrião em equinos.....	22
2.3.1. Avaliação embrionária	24
2.4. Hormônio do crescimento (GH)	26
2.4.1. Hormônio do crescimento na reprodução animal	27
2.4.2. Hormônio do crescimento e ações metabólicas	28
2.4.3. Somatotropina Recombinante Bovina	29
3. REFERÊNCIAS.....	30
4. CAPÍTULO 1	34
5. CAPÍTULO 2	47
6. ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a dinâmica reprodutiva e os mecanismos capazes de influenciá-la ainda não estão completamente esclarecidos, existindo inúmeras técnicas para alterar a fisiologia reprodutiva. Segundo Faria e Gradela (2010) as variadas terapias hormonais, usadas como principais mecanismos de regulação fisiológica, demonstram necessidade de estudos para favorecer resultados e reduzir custos.

As éguas apresentam ovários de fácil acesso e folículos de grandes dimensões tornando-se excelente modelo experimental para estudo da dinâmica folicular ovariana para as demais espécies monovulatórias, inclusive a humana (GINTHER, 2012).

A espécie equina é poliéstrica estacional, apresentando ciclos estrais em períodos de maior luminosidade. (BRINSKO et al., 2011). Porém a pressão imposta pelo mercado leva a necessidade de potencializar esse período para garantir a obtenção de mais produtos por estação de monta.

O conhecimento preciso do ciclo estral e da dinâmica folicular são indispensáveis para o avanço nas tecnologias disponíveis. Diversas pesquisas focam no entendimento e potencialização da fisiologia reprodutiva equina, exemplificados pelos estudos da dinâmica folicular (GINTHER et al., 2003), transferência de embrião (MCCUE, 2011), superovulação (GOMES, 2007) e vascularização folicular (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Todas com intuito de obterem melhores índices reprodutivos.

A dinâmica folicular toma destaque por ser a base para os demais eventos, sendo o folículo uma estrutura em constante crescimento estimulado por mecanismos hormonais (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004) e que necessita de um aporte sanguíneo constante (AYRES; MINGOTI, 2012).

Neste cenário, o hormônio de crescimento (GH) é caracterizado como uma alternativa viável para potencializar a dinâmica folicular. Pois ele influencia vários fatores, como início da puberdade, maturação sexual, modulação gonadotrópica, esteroidogênese e gametogênese (ZULU; NAKAO; SAWAMUKAI, 2002). Nas fêmeas, em particular, potencializa o crescimento folicular e lúteo, ovulação, desenvolvimento embrionário e placentação, atuando de forma autócrina, parácrina e endócrina, demonstrando que tecidos reprodutivos não são apenas locais de ação, mas também de síntese do GH (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O GH é sintetizado e secretado pela hipófise anterior e interage com receptores nas membranas de muitos tecidos, tais como, fígado, rim, músculo e ovários, estimulando a

liberação de somatomedinas, os quais atuam em conjunto desencadeando efeitos mitogênicos em diversos tecidos (SWENSON; REECE, 1996).

A utilização exógena do GH é feita com sua molécula recombinante, tomando destaque a somatotropina recombinante bovina (r-bST), por ser comercializada em veículo de liberação lenta e apresentar fácil aquisição (KOCK et al., 2001). Esta é rotineiramente utilizada em bovinos porém já existem alguns ensaios com comprovação de sua ação em equinos (BUONOMO et al., 1996; DE KOCK et al., 2001; GOMES, 2007).

Acredita-se que fatores relacionados a melhoria dos índices reprodutivos, como o GH, podem ser acrescidos a biotecnologias, como a transferência de embrião (TE), aumentando a produção de potros por éguas, sendo ainda alternativa terapêutica para casos particulares de infertilidade. Pois este hormônio pode favorecer o crescimento folicular assim como seu aporte hormonal e nutricional, através do aumento de receptores das gonadotrofinas e da perfusão sanguínea (BEG; GINTHER, 2006).

Além das interferências reprodutivas, o GH exerce efeito metabólico, interferindo no equilíbrio nitrogenado positivo (SWENSON; REECE, 1996). O qual pode levar a desequilíbrios prejudiciais a manutenção da homeostase corporal, através da inibição do transporte de glicose para os tecidos periféricos (resistência à insulina), elevação da glicemia (atividade diabetogênica) e concomitante elevação da taxa de oxidação de lipídeos (atividade lipolítica) e aminoácidos (CRUZAT et al., 2008)

Diante das escassas informações disponíveis sobre a influência do r-bST na dinâmica folicular e metabólica de éguas submetidas a transferência de embrião, a presente pesquisa se propõe a avaliar o efeito da r-bST sobre o comportamento folicular e metabólico de éguas, com a perspectiva de utilização desta molécula heteróloga em associação com a transferência de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dinâmica Folicular

A dinâmica folicular é caracterizada por um contínuo processo de crescimento e regressão ou ovulação folicular, estando diretamente relacionada e variando em éguas de acordo com a nutrição, temperatura ambiente, estresse e fotoperíodo (GURGEL et al., 2008).

Estudos para caracterizar a dinâmica na espécie equina divergiram em seus resultados principalmente pelas metodologias empregadas. Porém, na tentativa de minimizar erros, passou-se a utilizar o intervalo interovulatório como um ciclo estral, mesmo que seja necessário continuar a avaliação após a ovulação, principalmente em casos de codominância. Assim, o dia da primeira ovulação é considerado D0 (GINTHER, 1992).

Neste contexto, o estudo da dinâmica folicular é realizado através de uma avaliação retrospectiva dos diâmetros foliculares e do número de folículos, obtidos após uma avaliação diária que inicia-se antes da primeira ovulação e termina depois da segunda (GINTHER, 1993). Esta metodologia possibilita o estabelecimento do comportamento da onda folicular e do ciclo estral equino, descritos abaixo em conjunto com seus principais fatores reguladores.

2.1.1. Ciclo estral

O período entre duas ovulações subsequentes é rotineiramente utilizado para definir o ciclo estral, composto por uma fase folicular (estro) e outra luteal (diestro). Este intervalo tem tempo médio de 21 dias, com o estro durando de quatro a sete dias, podendo sofrer uma variação entre 2-12 dias no início da estação, e o diestro de 14-15 dias. A regularidade do ciclo é mantida através de um minucioso equilíbrio entre os hormônios sintetizados pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e útero, associados ao manejo que os animais são submetidos (GINTHER, 1992).

O estro é a fase em que há predominância dos folículos produtores de estrógenos, é o momento em que a égua se encontra sexualmente receptiva ao macho, e seu trato genital está pronto para receber e transportar o sêmen até o local da fertilização. No diestro, onde há prevalência do corpo lúteo, aumento da produção de progesterona (P4) e indiferença da égua ao cortejo do garanhão, seu aparelho genital está organizado para desenvolver um embrião. O período de diestro finaliza com a luteólise e o início da próxima fase folicular (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Na maioria das espécies domésticas, a ovulação ocorre 24 a 40 horas após pico ovulatório do hormônio luteinizante (LH). Porém na égua, a ovulação acontece antes desse pico, uma vez que os níveis de LH sanguíneo estão aumentando lentamente, ocorrendo o pico aproximadamente 48 horas após a ovulação (GINTHER et al., 2008a).

A ovulação ocorre pela ruptura da parede folicular na região da fossa ovulatória, permitindo que o fluido folicular e o óócito sejam liberados. Desse modo, ocorrerá colapso da parede folicular, possível de ser sentido à palpação retal, caracterizado como cratera ou depressão no local anteriormente ocupado pelo folículo, ou visualizado em ultrassonografia como zona hipoecogênica, denominando-se de corpo lúteo (CL) (BRINSKO et al., 2011).

Geralmente, o corpo lúteo em desenvolvimento tem vida útil de até 85 dias, caso o endométrio não libere prostaglandina para a luteólise, e permanecerá produzindo progesterona e não sofrerá regressão, entretanto, nos ciclos estrais normais, a luteólise ocorre em torno de 15 dias. Porém, em éguas fertilizadas, ocorre o bloqueio da luteólise resultante do reconhecimento materno da gestação, que ocorre entre os dias 12 e 14 após a ovulação. Este mecanismo na égua é devido a movimentação embrionária livre que estimula a produção de estrógeno para suprimir a liberação endometrial de prostaglandina (LEY, 2006).

2.1.2. Sazonalidade reprodutiva

Os equinos são animais poliéstricos estacionais de dias longos, ou seja, apresentam ciclos reprodutivos consecutivos no período de luminosidade aumentada. Porém, nas regiões com menor variação da luminosidade entre as estações do ano, as éguas podem manifestar ciclos estrais durante todo o ano (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O fotoperíodo controla a dinâmica reprodutiva através da neuromodulação da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Períodos de 14 a 16 horas de estímulo luminoso natural ou artificial, reduzem a produção de melatonina pela glândula pineal, que bloqueia a síntese de GnRH, pelo hipotálamo, quando em níveis elevados (BRINSKO et al., 2011).

A frequência e amplitude dos pulsos da secreção de GnRH, por sua vez, possuem relação direta com a produção hipofisária de gonadotrofinas, permitindo liberação do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e LH, os quais são responsáveis por estimular e manter o desenvolvimento folicular antral e a ovulação (LEY, 2006).

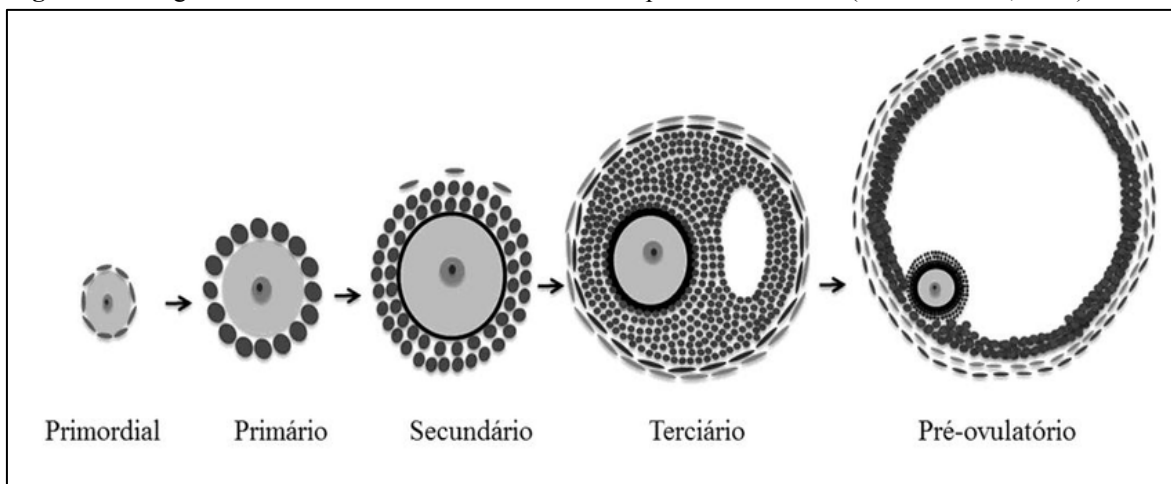
2.1.3. Ondas foliculares

A onda folicular é composta por uma sequência de eventos sincrônicos, denominados de recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia, de acordo com alterações no comportamento do folículo ovariano (DRIANCOURT, 2001). O início da onda é identificado através do crescimento folicular progressivo, demarcando a emergência folicular (GINTHER, 1992).

Os folículos são encontrados em várias fases de desenvolvimento, estando 90% da população na fase pré-antral (sem cavidade antral), classificados em primordiais, primários e secundários (Fig. 1). Os primordiais compostos por um oócito primário circundado por uma camada de células da pré-granulosa encontram-se em estágio de quiescência. Já os primários e secundários estão em desenvolvimento, aumentando gradativamente as camadas de células da teca e da granulosa e o tamanho do oócito, até formarem uma cavidade em seu interior (antro) e serem considerados folículos antrais, compreendendo os folículos terciário (dominante e subordinado) e pré-ovulatório (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Inicialmente, o controle do crescimento folicular é dependente da interação do oócito e células da glanulosa, em conjunto com secreções de vários fatores locais, como KIT ligante, fator de crescimento e diferenciação (GDF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), ativinas e inibinas (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011). Porém, a partir do desenvolvimento do antro, o folículo fica sob controle das gonadotrofinas, sendo cada onda folicular precedida por uma elevação temporária nas concentrações do FSH, passando a ser dependente do LH nas etapas finais de crescimento e ovulação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Figura 1 - Estágios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral. (ROCHA et al., 2011)



Em uma sequência temporal das fases da onda folicular, após a ativação dos folículos primordiais inicia o recrutamento folicular, caracterizado pelo crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela seleção, marcada pela manutenção do crescimento de alguns folículos, em detrimento dos demais que entram em atresia. Na espécie equina, que é monovulatória, o folículo que continua a crescer é classificado como dominante (fase de dominância) o qual irá liberar estrógeno progressivamente, de acordo com seu volume, sendo sensível ao estímulo do padrão de liberação do LH (DRIANCOURT, 2001).

A fase de seleção folicular, também denominada de divergência é o momento do desvio folicular (GURGEL et al., 2008). Em espécies monovulatórias, eventualmente dois folículos são selecionados, desenvolvendo-se em codominância. Essa etapa marca o fim da fase de crescimento comum, quando o folículo dominante cresce de forma contínua, aproximadamente 3 mm por dia, e os folículos subordinados regridem ou crescem temporariamente em taxa reduzida (BEG; GINTHER, 2006; GINTHER, 2000).

Vários fatores intrafoliculares estão envolvidos na regulação da divergência folicular, como por exemplo fatores de crescimento, peptídeos, receptores de gonadotrofinas, fatores angiogênicos e esteróides, estando presentes em concentrações diferentes nos folículos dominantes e subordinados, mesmo antes da seleção (GURGEL et al., 2008).

Para éguas os diâmetros médios dos folículos em cada fase da onda folicular já foram estabelecidos. O diâmetro médio dos folículos na fase de recrutamento é 6 mm, quando os folículos atingem 13 mm de diâmetro adquirem a capacidade de secretar inibina, o que reduz o nível de FSH e a maioria dos folículos não se desenvolvem, apenas o dominante e um dos subordinados crescem, caracterizando a fase de crescimento paralelo. A fase de divergência ocorre em média 6,2 dias após o recrutamento, com o maior folículo medindo 19 a 22 mm (GINTHER, 2000). Quando o folículo atinge diâmetro de 25 mm é considerado dominante, chegando a ovular espontaneamente aproximadamente entre 40 e 45 mm (GINTHER et al., 2008a).

Com o advento das biotecnologias essas informações ganharam maior importância, assim como o conhecimento da utilização de indutores da ovulação. Os folículos são responsivos à Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) ao atingirem 35 mm e à deslorelina entre 30 e 35 mm de diâmetro, ovulando em média em 36 e 48 horas após o tratamento, respectivamente (BRINSKO et al., 2011).

Dois tipos de ondas foliculares são descritas na égua. As ondas maiores, caracterizadas pela presença de um folículo dominante e folículos subordinados e ondas menores, nas quais o maior

folículo não atinge o diâmetro de dominância. Ainda de acordo com esta classificação, as ondas maiores dividem-se em ondas primárias e secundárias, ondas maiores primárias são aquelas que emergem durante a fase intermediária do diestro e culminam em ovulação no final do estro seguinte, e maiores secundárias são as que emergem no final do estro ou início do diestro dando origem a um folículo dominante anovulatório ou, mais raramente, a uma ovulação durante o diestro (GINTHER, 2000).

2.2. Vascularização folicular

A atividade cíclica de crescimento e regressão presentes nos folículos ovarianos requerem angiogênese contínua. Os folículos, enquanto primordiais e primários, recebem nutrientes e oxigênio por difusão passiva dos capilares presentes no estroma ovariano. A partir da formação do antro folicular, forma-se uma rede capilar ao redor do folículo, garantindo sua nutrição (ROBINSON et al., 2009).

A adequação da rede vascular às necessidades do folículo em crescimento já é estabelecida. Não se conhece completamente como o folículo estimula sua rede vascular, porém é atribuída grande importância na angiogênese folicular ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (AYRES; MINGOTI, 2012).

Os VEGFs são produzidos principalmente nas células da granulosa, distribuídas em região avascular, proporcionando o acúmulo de fator angiogênico no antro do folículo, de maneira a garantir maior disponibilidade quanto maior o tamanho folicular (BERISHA et al., 2000). O acúmulo do VEGF no antro favorece um gradiente angiogênico por sua difusão do antro para os capilares foliculares, aparentemente regulando o desenvolvimento da rede de vasos sanguíneos na parede do folículo (MATTIOLI et al., 2001).

A regulação da produção do VEGF está atribuída ao estímulo do FSH (BERISHA et al., 2000). Porém, outros fatores de crescimento, como por exemplo o fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I), podem desempenhar papel importante. Em éguas, um estudo *in vivo* mostrou que as concentrações no fluido folicular do VEGF aumentaram, no folículo subordinado, após injeção intrafolicular de IGF-I. Sendo este um ponto importante na divergência dos folículos dominantes, já que estas concentrações alteram mesmo antes de haver diferença nos diâmetros foliculares, sendo maiores nos futuros dominantes (BEG; GINTHER, 2006).

Diferenças na taxa de crescimento folicular, utilizadas para caracterizar o desvio, são observadas em conjunto com mudanças na ecogenicidade da parede folicular, atribuída a um

aumento da área vascularizada ao redor dos folículos. Sendo possível distinguir o futuro folículo dominante dos seus subordinados, cerca de um dia antes do início do desvio do diâmetro (AYRES; MINGOTI, 2012).

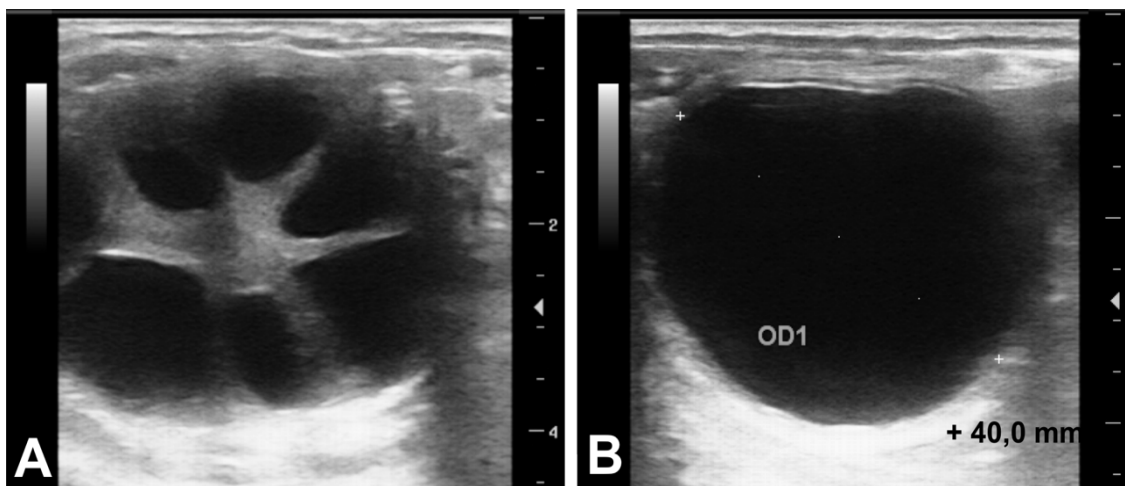
O folículo dominante deve garantir um contínuo aumento da irrigação sanguínea, além de aumentar a sensibilidade às gonadotrofinas, para manter o crescimento mesmo com concentrações de FSH reduzidas (GINTHER et al., 2003). O aumento do fluxo sanguíneo folicular também proporciona maior oferta de gonadotrofinas, nutrientes, substratos hormonais e outros componentes do sangue requeridos para a ovulação (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

Por sua vez, os folículos subordinados apresentam redução da área vascular e da velocidade do fluxo sanguíneo, o que os leva a apresentar uma taxa de crescimento reduzida e a entrarem em atresia, existindo uma degeneração vascular após a seleção (AYRES; MINGOTI, 2012).

2.2.1. Avaliação ultrassonográfica folicular

A avaliação por ultrassonografia transretal é um procedimento de eleição por ser um método minimamente invasivo. A avaliação do crescimento e número de folículos é possível pela ultrassonografia modo B (Fig. 2), que permite mensurar e avaliar o formato da parede folicular, devido a imagem anecóica característica da presença de líquidos no interior dos folículos (FELICIANO; OLIVEIRA; VICENTE, 2014).

Figura 2 - Imagens ultrassonográficas em modo B de ovários equinos. A figura A mostra um ovário com sete folículos (imagens anecóicas) e a figura B mostra um folículo pré-ovulatório medindo 40,0 mm.

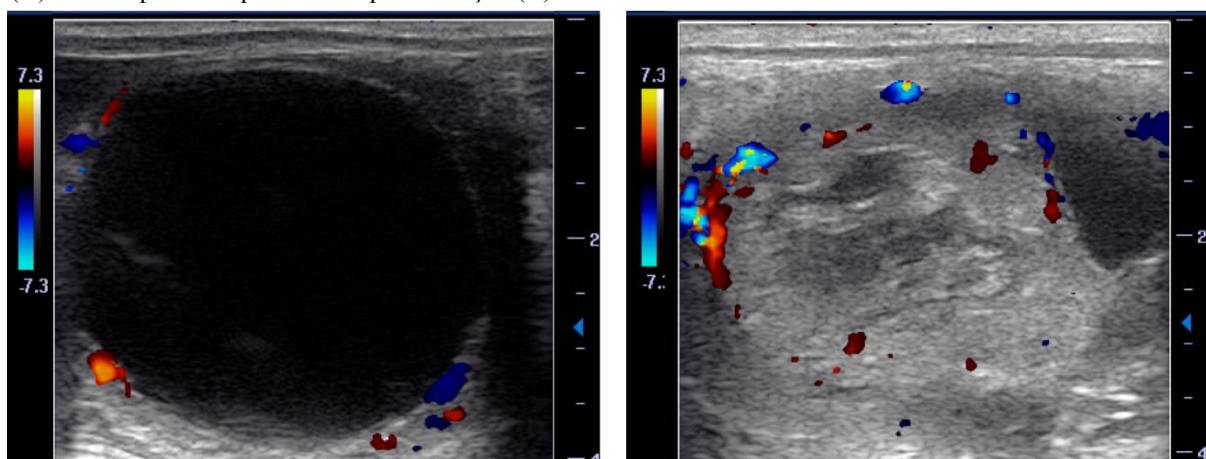


A ovulação é rotineiramente avaliada através do desaparecimento abrupto do folículo, já que o CL pode não ser reconhecido facilmente no início de sua formação, devido ao sangue coagulado. A partir de dois a quatro dias o CL é composto por células luteínicas, passando a possuir relativo grau de hipoeogenicidade, formando contraste com o cinza-brilhante do

parênquima ovariano. Por volta de oito a dez dias, o tamanho do CL decresce e apresenta-se anatomicamente como uma área firme e esponjosa dentro do estroma (ARRUDA et al., 2001).

Além da mensuração do diâmetro e da homogeneidade da parede e conteúdo do folículo ovariano podemos ainda estimar a vascularização folicular periférica e seus aspectos hemodinâmicos, em tempo real, através da ultrassonografia modo Doppler colorido (Fig. 3) (FELICIANO; OLIVEIRA; VICENTE, 2014).

Figura 3 - Imagens de ultrassonografia Doppler colorido ilustrando a vascularização do folículo pré-ovulatório (A) e do corpo lúteo quatro dias após ovulação (B).



Tal informação se torna importante pois é relatado que as mudanças no fluxo sanguíneo dentro do ovário estão intimamente relacionadas aos fatores vitais na fisiologia ovariana, como a produção de esteroides e sensibilidade aos hormônios gonadotróficos (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Assim a avaliação da vascularização com o Doppler colorido possibilita identificação de observações de grande relevância na investigação do comportamento folicular, servindo para esclarecer eventos relacionados ao desenvolvimento dos folículos (AYRES; MINGOTI, 2012).

2.2.2. Ultrassonografia modo Doppler colorido

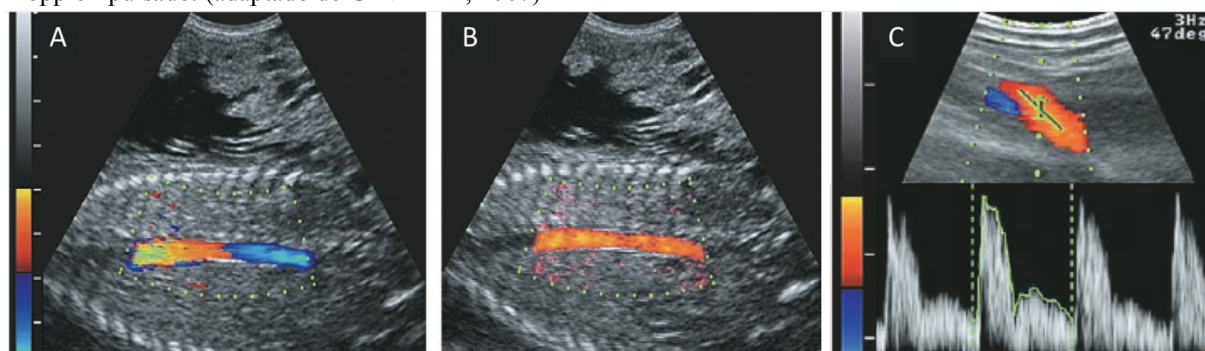
A denominação do termo Doppler, para o modo ultrassonográfico capaz de identificar o fluxo sanguíneo, advém de uma observação física. O efeito Doppler é observado quando a origem das ondas (sonoras ou eletromagnéticas) está em movimento, alterando a frequência da onda, pois a frequência aumenta quando a fonte emissora se aproxima e diminui durante seu afastamento do ponto de captação (FELICIANO; OLIVEIRA; VICENTE, 2014).

Nos vasos sanguíneos, os corpos responsáveis por refletirem a onda ultrassônica (o eco captado pelo transdutor) são as hemácias em movimento, tornando a técnica capaz de avaliar a

presença, direção e velocidade do fluxo sanguíneo em diversos órgãos, através de quatro diferentes modos Doppler (Fig. 4):

- Doppler colorido - fornece o mapeamento vascular em cores, sendo padronizado que o movimento em sentido ao transdutor, apresentando frequência maior que a emitida, é em cor vermelha e em direção oposta, com frequência menor que a emitida, é azul. O fluxo de maior velocidade é expresso por tonalidade mais clara da mesma cor, e os turbulentos em um mosaico de cores;
- Doppler de amplitude está relacionado com o número e não com a velocidade das células, reduzindo a dependência do ângulo de insonação, sendo útil na detecção de fluxos lentos e pequenos vasos;
- Doppler pulsado permite a formação de um traçado espectral e a emissão de som audível através da emissão de ondas curtas (pulsos) emitidas por um cristal piezelétrico, direcionadas para uma região específica dentro do campo de imagem (volume de amostra). O fluxo positivo, em direção ao transdutor, é apresentado acima da linha base e o negativo, em direção oposta, abaixo da linha;
- O Doppler contínuo não permite precisar a localização do volume de amostra, permitindo a avaliação de todas as estruturas móveis que atravessam o feixe (FELICIANO; OLIVEIRA; VICENTE, 2014).

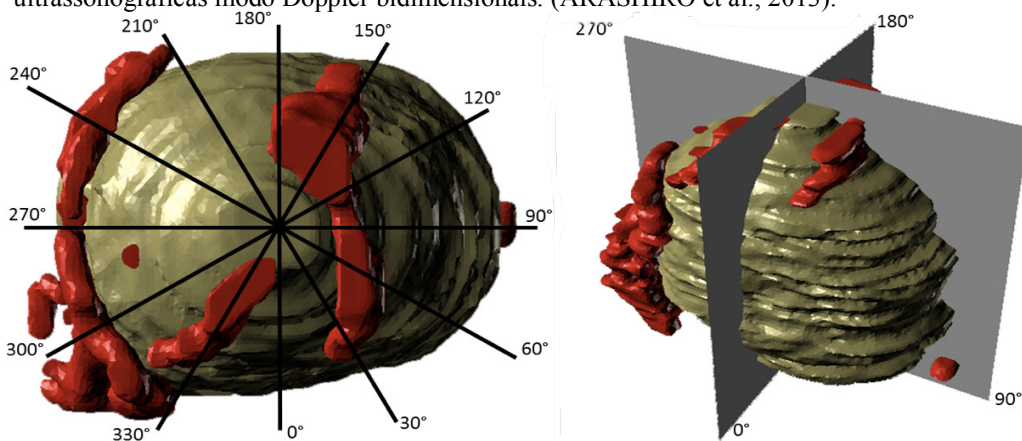
Figura 4 - Imagem demonstrando os tipos de Doppler. A - Doppler colorido; B - Doppler de amplitude; C - Doppler pulsado. (adaptado de GINTHER, 2007)



Estudos veem demonstrando a utilização do modo Doppler na dinâmica folicular de equinos, sendo esta técnica efetiva e prática para avaliação em tempo real da perfusão vascular do trato reprodutivo (FERREIRA; MEIRA, 2011). Já foram descritas pesquisas avaliando as alterações vasculares no folículo dominante (GINTHER et al., 2003), sua relação com os subordinados (AYRES; MINGOTI, 2012), o período ovulatório e a formação do corpo lúteo (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

Entre as técnicas utilizadas para mensurar a vascularização folicular periférica uma das mais estabelecidas é realizada através da avaliação subjetiva da área colorida apresentada em imagens do maior diâmetro folicular, obtidas através de vídeos (GINTHER, 2007), ou realizar análise computadorizada para avaliar a porcentagem de área colorida da parede folicular. Ambas as técnicas demonstram alta correlação na avaliação de estruturas ovarianas em éguas, porém na busca por uma demonstração mais real da arquitetura vascular, técnicas de avaliação tridimensional foram demonstradas, criadas a partir do conjunto de imagens bidimensionais (Fig. 5). Esta pode ser uma alternativa para minimizar avaliações errôneas devido à variação do arranjo vascular no entorno do foliculo (ARASHIRO et al., 2013).

Figura 5 - Visão superior e perspectiva de um modelo tridimensional de um foliculo dominante criado a partir de um software para formação de imagens tridimensionais a partir de imagens ultrassonográficas modo Doppler bidimensionais. (ARASHIRO et al., 2013).



2.3. Transferência de embrião em equinos

O primeiro relato de sucesso na transferência de embrião em equino foi na década de 70, descrita no Japão por Oguri e Tsutsumi. No Brasil, esta técnica em equinos foi primeiramente descrita em 1987 por Fleury et al. (LIRA et al., 2009)

É uma tecnologia que consiste basicamente na coleta de embrião de uma fêmea doadora e a transferência para uma fêmea receptora, incumbida de levar a gestação a termo, podendo ser realizada pela técnica cirúrgica, por incisão no flanco, ou a não cirúrgica via transcervical (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999). A técnica por via cervical é a de eleição, pois além de ser menos invasiva e rápida e demonstra resultados positivos, associada a correta avaliação e seleção de receptoras (FLEURY et al., 2007).

A técnica de recuperação embrionária por via transcervical implica na introdução cervical de um cateter com balão, o qual é inflado com ar, fixando o cateter na base do corno uterino. O processo é iniciado com a introdução da solução de lavagem (DPBS ou Soro Ringer Lactato) lavando os dois cornos simultaneamente. Este procedimento é repetido de três a quatro vezes,

com volume capaz de inflar completamente o útero (de um a dois litros), sendo o líquido recuperado em filtro milipore em cada repetição. Por último, o embrião é rastreado em placa de petri com auxílio de microscópio estereoscópico, classificado, transferido para uma placa menor contendo meio de manutenção embrionária e envasado para inovulação ou congelamento (LIRA et al., 2009).

Nos primeiros 15 a 17 dias de gestação, o embrião equino tem vida livre no útero, após sua entrada por volta do dia 5, sem formar qualquer anexo embrionário, facilitando o processo de coleta (MCKINNON; SQUIRES, 2007). O melhor momento para realizar a coleta é entre os dias sete e oito, mesmo o embrião sendo transportados da tuba uterina para o útero entre os dias cinco e seis pós-ovulação, ainda no estágio de mórula compacta ou blastocisto inicial. Porém, em casos de congelamento embrionário, a indicação primária para recuperação embrionária é no sexto dia (LIRA et al., 2009).

A coleta mais precoce é desejada na realização de congelamento embrionário devido à formação de uma cápsula entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto, especificamente no embrião equino, após o sétimo dia, a qual é uma camada acelular de mucina glicoproteica que impede a penetração dos crioprotetores. Outro fator desfavorável a criopreservação em equinos é a grande blastocele, que amplia o tempo necessário para a aquisição do equilíbrio osmótico na presença do crioprotetor. Já que o embrião equino atinge o útero medindo aproximadamente 160 μm e cresce rapidamente ocorrendo rotineiramente a obtenção de embriões maiores que 300 μm em programas de TE (SQUIRES; MCCUE, 2016).

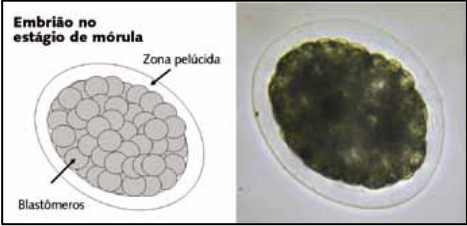
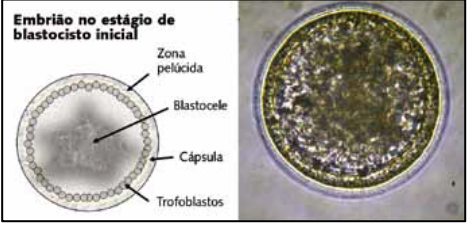
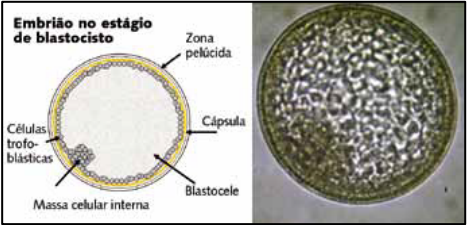
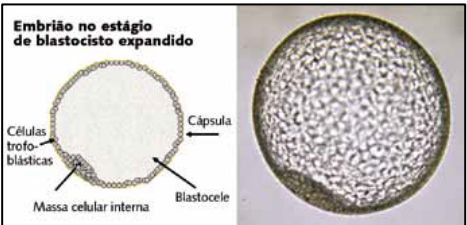
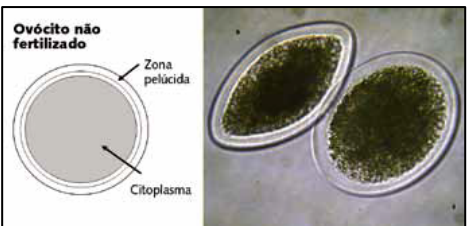
Outra particularidade da espécie equina é a anatomia dos ovários, nos quais os folículos encontram-se na região interna, pois, a égua apresenta estrutura ovariana invertida com medula, ou zona vascular, superficial, enquanto que o córtex, ou zona cortical, que contém os folículos encontra-se no interior do ovário. A existência de um local próprio, onde ocorre a liberação dos oócitos, denominado fossa ovulatória, é uma particularidade que dificulta a realização de tratamentos superovulatórios, reduzindo o número de folículos possíveis de ovular além da captação dos oócitos liberados (BRINSKO et al., 2011).

Contudo é difícil encontrar nos lavados uterinos embriões equinos de baixa qualidade pois, em sua maioria, apenas embriões de boa qualidade passam pela junção útero-tubárica (LEY, 2006). Peculiaridade correlata a interação embrionária com o oviduto que permite a passagem apenas de embriões com produção adequada de prostaglandina E, podendo o oócito ou embrião degenerado ficar retido por até sete meses no oviduto, por não apresentarem esta produção (SMITS et al., 2016).

2.3.1. Avaliação embrionária

Após a coleta, os embriões passam por uma avaliação subjetiva, sendo classificados de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da sociedade internacional de transferência de embrião (IETS). Encontrando-se geralmente nos estágios mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido (Tab.1) (MCCUE, 2011)

Quadro 1 - Estágios de desenvolvimento do embrião equino.

Imagem, Estágio e Tamanho	Descrição
 Embrião no estágio de mórula Zona pelúcida Blastômeros Mórula (150 a 200 µm)	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores; borda externa dos blastômeros de aparência “serrilhada”; possibilidade de identificação do espaço perivitelínico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento à manipulação.
 Embrião no estágio de blastocisto inicial Zona pelúcida Blastocele Cápsula Trofoblastos Blastocisto Inicial (150 a 250 µm)	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros; mínimo espaço perivitelínico, tamanho semelhante ao da mórula.
 Embrião no estágio de blastocisto Zona pelúcida Células trofoblásticas Massa celular interna Cápsula Blastocele Blastocisto (150 a 300 µm)	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina.
 Embrião no estágio de blastocisto expandido Células trofoblásticas Massa celular interna Cápsula Blastocele B. Expandido (300 a > 1,000 µm)	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade.
 Ovócito não fertilizado Zona pelúcida Citoplasma Não fertilizado (125 a 150 µm)	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola à manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados.

Fonte: adaptado de MCCUE, P. M, 2011.

Os estágios embrionários se relacionam aos dias após a ovulação, sendo encontrados embriões no estágio de mórula a blastocisto inicial entre o quinto e sexto dia pós-ovulação, aumentando drasticamente seu tamanho e chegando a blastocisto expandido já no sétimo dia (LIRA et al., 2009).

A qualidade embrionária também é avaliada, relacionado a morfologia com a viabilidade. Os embriões são classificados entre qualidade excelente à degenerado, além do oócito não fecundado, avaliando formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida. A Universidade do Colorado emprega um sistema graduado de classificação modificado, baseado em quatro pontos para a avaliação embrionária (Tab. 2 e Fig. 6). Este sistema se baseia no descrito por de Mckinnon et al. (1988), reduzindo os graus de classificação para apenas quatro, além de oócitos não fertilizados (MCCUE, 2011).

Quadro 2 - Graduação do embrião de acordo com um sistema de 4 pontos.

Grau	Comentário	Descrição
1	Excelente	Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação.
2	Bom	Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula
3	Ruim	Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula
4	Degenerado ou Morto	Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião.
Oócito não fertilizado	Oócito não fertilizado	Não fertilizado

Fonte: MCCUE, P. M, 2011.

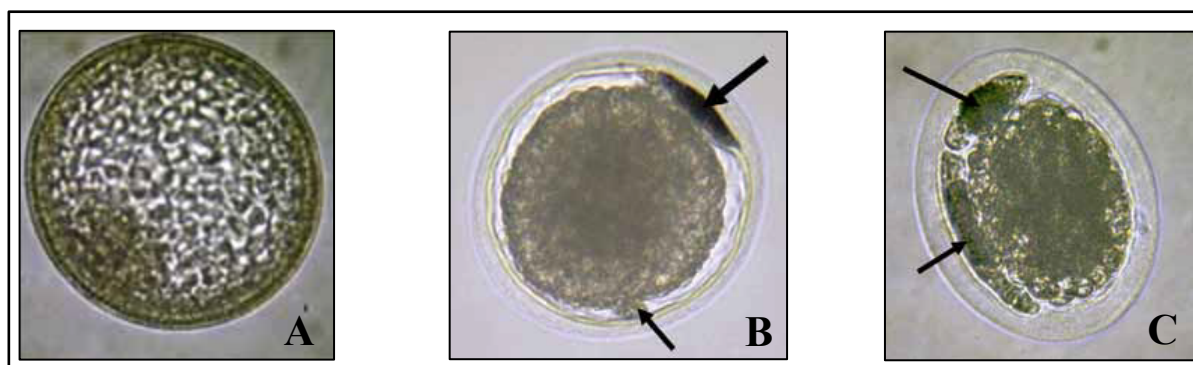


Figura 6 - Embriões equinos segundo a graduação de qualidade. A - Embrião grau 1 no estágio de blastocisto inicial. B – Embrião grau 2 no estágio de blastocisto inicial com presença de blastômeros extrusados (setas). C - Embrião grau 3 no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas). (adaptado de MCCUE, P. M, 2011)

2.4. Hormônio do crescimento (GH)

O GH tem como ação bem elucidada o estímulo do crescimento linear dos ossos longos e o equilíbrio nitrogenado positivo, ao mesmo tempo com o efeito lipolítico (SWENSON; REECE, 1996), além de estimular as células somáticas, sendo necessário principalmente durante a fase de crescimento (MARTINS et al., 2008).

O GH é uma proteína que possui 191 aminoácidos com duas pontes dissulfeto, tendo a glicina como o aminoácido mais importante presente em sua constituição e atividade biológica. Quando a glicina é substituída por outro aminoácido, o GH é convertido de potencializador para um supressor ou um antagonista de GH (MARTINS et al., 2008).

O hormônio de liberação do hormônio do crescimento (GHRH), de origem hipotalâmica, através do sistema porta-hipofisário, estimula a liberação do GH pelos somatotropos hipofisários (SWENSON; REECE, 1996). A modulação da liberação pela adenohipófise decorre mediante uma série de fatores, tais como: bloqueio pela somatostatina (hormônio inibidor do hormônio do crescimento), flutuação nas concentrações sanguíneas de glucagon, insulina, IGF-I e IGF-II, hormônios estrogênicos, além dos processos metabólicos e fisiológicos (LUCY, 2000).

O GH desempenha atividades anabólicas, estimulando o crescimento tecidual, e metabólica, alterando o fluxo, a oxidação e o metabolismo de praticamente todos os nutrientes na circulação (STROBL; THOMAS, 1994). Suas ações ocorrem de forma direta e indireta: as diretas advêm da sinalização intracelular após estímulo de receptores de GH na membrana plasmática; as indiretas são intercedidas pela regulação da síntese dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e de suas proteínas transportadoras plasmáticas (IGFBP, insulin-like growth factor binding proteins) (CRUZAT et al., 2008). Diversos órgãos são estimulados pelo GH a produzir as somatomedinas (os IGFs), porém o fígado é o principal (SWENSON; REECE, 1996).

Os IGFs consistem em IGF-I e IGF-II e são hormônios peptídicos com aspectos estruturais e metabólicos semelhantes à pró-insulina (YOSHIMURA, 2003). Seus efeitos são modulados pela disponibilidade das seis IGFBPs, com efeitos inibitórios da ação biológica dos IGFs, através de ligação seletiva (LUCY, 2000). Neste complexo sistema, ainda estão atuando as proteases da IGFBP, tal como a proteína plasmática associada à prenhez, que tem sido isolada no fluido folicular equino, e que degradam as IGFBPs aumentando a disponibilidade das IGFs (BEG; GINTHER, 2006).

A atuação das IGFs ocorre, provavelmente, pelo aumento na atividade dos ribossomos no processo de tradução, exercendo efeitos metabólicos importantes, como a inibição do transporte de glicose para os tecidos periféricos (resistência à insulina), elevação da glicemia (atividade diabetogênica) e concomitante elevação da taxa de oxidação de lipídeos (atividade lipolítica) e aminoácidos (CRUZAT et al., 2008), além de importante função reprodutiva (GURGEL et al., 2008).

2.4.1. Hormônio do crescimento na reprodução animal

A função reprodutiva do GH é demonstrada pela variedade de receptores de GH encontrados no hipotálamo, hipófise, corpos lúteos, folículos ovarianos, ovidutos, endométrio, miométrio e placenta (GURGEL et al., 2008). Porém suas ações reprodutivas ocorrem principalmente pelo mecanismo indireto, em diferentes espécies e estruturas ovarianas (Tab. 3). Sendo o IGF-I o principal responsável pela ação do hormônio do crescimento no sistema reprodutor, apresentando inclusive um maior número de receptores nos ovários (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009).

Quadro 3 - Expressão de RNAm para o IGF-I, IGF-II e receptores RI e RII de IGF em folículos do ovário de mamíferos.

Estrutura	IGF-I	IGF-II	IGF-RI	IGF-II
Folículo primordial	+ (c, p), - (b)	+ (c), - (b)	+ (p), - (b)	
Folículo primário	+ (c, p), - (b)	- (b)	+ (b, p)	
Folículo secundário	+ (c, b, m, p),	- (b)	+ (b, p)	
Folículo antral em Crescimento				
Oócito	+ (p), - (s, m)	- (b, s),	+ (b, p) - (s)	
Cúmulos	+ (s, m)	+ (s), - (b)	+ (p, b) - (s)	
Granulosa	+ (s, m)	+ (s), - (b)	+ (p, o, b, s)	+ (o, b)
Teca	+ (p), - (s, m)	+ (s, b, o, p)	+ (o, b), - (s)	+ (o, b)
Folículo pré-ovulatório				
Oócito	- (s, m)	- (s)	- (s)	
Cúmulos	+ (s, m)	+ (s)	+ (s)	
Granulosa	+ (s, m), - (p)	+ (p, s)	+ (s, p)	+ (p)
Teca	- (s, m, p)	+ (s)	- (s)	+ (p)

(+) A expressão positiva de mRNA, (-) Expressão negativa do mRNA. b: bovina, c: caprinos, m: muar, o: ovinos, p: primatas, s: suínos. (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009)

Os IGFs atuam por via endócrina, autócrina e parácrina nos tecidos reprodutivos, sendo a IGF-I a responsável por tal ação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Exercendo papel fundamental sobre a maturação de oócitos, implantação e embriogênese e apresentando sinergismo com as gonadotrofinas (FSH e LH), auxiliando na mitogênese e na esteroidogênese (ZULU; NAKAO;

SAWAMUKAI, 2002). Regula ainda a formação do antro folicular e a ação do FSH, através do aumento da atividade da aromatase (ZHOU et al., 1997).

Observações cruciais no crescimento folicular de equinos demonstram que na divergência folicular as concentrações de IGF-I aumentam, enquanto as das IGFBPs reduzem durante a aquisição da dominância (GURGEL et al., 2008). A introdução de IGF-I no antro de folículos que seriam os subordinados, no momento da divergência, resultou no aparecimento de folículos codominantes (BEG; GINTHER, 2006).

Além disso, foi demonstrado que quando os folículos dominantes de éguas são aspirados, as concentrações de IGF-I aumentam no subordinado que se tornará o dominante (DONADEU; GINTHER, 2002), mostrando que a dinâmica folicular está intimamente relacionada com as concentrações dos componentes do sistema IGF.

2.4.2. Hormônio do crescimento e ações metabólicas

O GH desempenha influências em muitos tecidos e órgãos atuando na redução do catabolismo proteico e na oxidação da glicose, concomitantemente elevando a mobilização de ácidos graxos não esterificados (NEFA) (CRUZAT et al., 2008). Porém estudos já demonstraram sua ação anabólica no balanço proteico positivo (FRYBURG; BARRETT, 1993) e na liberação de IGF-1 (BUONOMO et al., 1996)

Ações diretas do GH são observadas no metabolismo lipolítico e glicolítico, antagonistas às ações da insulina, caracterizando-o como hormônio diabetogênico, por proporcionar a elevação do nível de glicose circulante, que levam a liberação de insulina para manter a glicemia fisiológica. Assim o GH promove diminuição da oxidação da glicose, além da redução de sua captação pelos tecidos, amplificando a lipólise e oxidação dos ácidos graxos no tecido adiposo e na musculatura esquelética e cardíaca, levando a estímulo da produção hepática de glicose (GHANAAT; TAYEK, 2005).

No metabolismo proteico, os efeitos do GH ocorrem de forma direta e indireta, ocorrendo redução da síntese proteica em situações de ausência ou redução do GH. Indivíduos deficientes em GH apresentam aumento da síntese proteica quando tratados com o hormônio, porém, elevação das concentrações proteicas não foram observadas em indivíduos sadios após tratamento com GH, sugerindo que os resultados esperados não se equiparam entre indivíduos sadios e deficientes em GH (RENNIE, 2003).

A demonstração da ação direta do GH foi reforçada por não existir elevação de outros hormônios, como insulina ou IGF-I após sua administração, porém com identificação de

alterações nos níveis metabólicos (CRUZAT et al., 2008). Em equinos, foi observada a elevação do IGF-I, relacionada às alterações metabólicas, após a administração do hormônio do crescimento recombinante bovino exógeno (BUONOMO et al., 1996).

2.4.3. Somatotropina Recombinante Bovina

A utilização farmacológica do GH é realizada através de sua forma recombinante, conhecida como somatotropina recombinante ou hormônio do crescimento bioessimular. Sendo a somatotropina recombinante bovina (r-bST) um dos primeiros hormônios produzidos em escala comercial como proteína recombinante. O r-bST já é bastante utilizado para aumentar a produção de leite, em vacas, com a aplicação de 500mg de r-bST em intervalo de 14 dias, aumentando a produção em 3 a 5 kg/dia (RIBEIRO FILHO, 2009).

Em equinos, existem relatos da utilização do r-bST em animais de esporte na tentativa de identificar a utilização como anabolizante (DE KOCK et al., 2001), em éguas adultas demonstrando suas interferências metabólicas (BUONOMO et al., 1996) e em protocolos de superovulação (GOMES, 2007). Apesar de não ser alcançado o objetivo reprodutivo, a r-bST se mostrou biologicamente ativa na espécie equina nas pesquisas citadas.

Assim como a molécula bovina, as somatotropinas equina e suína também apresentam atividade biológica. Porém, a molécula suína demonstra exacerbada reação no local de aplicação e a equina apresentou difícil aquisição e necessidade de aplicação diária. Já a bovina, com 89% de homologia à equina é de fácil aquisição, apresenta baixa reação local e liberação lenta, mantendo sua ação por 14 dias (DE KOCK et al., 2001).

Desta forma, a r-bST pode ser considerada como a forma recombinante de eleição para uso na espécie equina.

3. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 127–140, 2004.
- ARASHIRO, E. K. N. et al. Three-dimensional modeling of color Doppler images : a new approach to study follicular vascularization in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 662–669, 2013.
- ARRUDA, R. P. et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenecidade do corpo lúteo detectados pela ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 233–239, 2001.
- AYRES, H.; MINGOTI, G. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 174–180, 2012.
- BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: Role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p. 365–377, 2006.
- BERISHA, B. et al. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 167, p. 371–382, 2000.
- BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. L. Manual of Equine Reproduction. Manual of Equine Reproduction, p. 85–93, 2011.
- BUONOMO, F. C. et al. The Effects of Bovine Somatotropin (bST) and Porcine Somatotropin (pST) on Growth Factor and Metabolic Variables in Horses. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p. 886–894, 1996.
- CRUZAT, V. F. et al. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 549–562, 2008.
- DE KOCK, S. S. et al. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: Effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. **Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 163–171, 2001.
- DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1111–1118, 2002.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211–1239, 2001.
- FARIA, D. R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 114–122, 2010.
- FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, M. EMILIA F.; VICENTE, W. R. R. **Ultrassonografia na reprodução animal**. 1. ed. São Paulo, MedVet, 191p, 2014.
- FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. DE. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1063–1069, 2011.
- FLEURY, P. D. C. et al. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Revista**

Brasileira Reprodução Animal, v. 31, n. 1, p. 27–31, 2007.

FRYBURG, D. A.; BARRETT, E. J. Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. **Metabolism**, v. 42, n. 9, p. 1223–1227, 1993.

GHANAAT, F.; TAYEK, J. A. Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54, n. 5, p. 604–609, 2005.

GINTHER, O. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects** (Equiservices, Ed.) Wisconsin, USA, 1992.

GINTHER, O. J. Major and Minor Follicular waves During the Equine Estrous Cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 18–25, 1993.

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

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 239–257, 2003.

GINTHER, O. J. et al. Dose-Response Study of Intrafollicular Injection of Insulin-Like Growth Factor-I on Follicular Fluid Factors and Follicle Dominance in Mares¹. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1063–1069, 2004.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: book 4, color-Doppler ultrasonography** Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O. J. et al. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 8, p. 955–963, 2008a.

GINTHER, O. J. The mare: A 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 818–828, 2012.

GOMES, G. M. **Efeito da somatotrofina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatória e recuperação embrionária em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE)**. [s.l.] Universidade estadual paulista, 2007.

GURGEL, J. R. C. et al. Dinâmica folicular em éguas : aspectos intrafolliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 122–132, 2008.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole,. 2004. 513p. ISBN 852041222X

KOCK, S. S. et al. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: Effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. **Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 163–171, 2001.

LEY, W.B. **Reprodução em Éguas para Veterinários de Equinos**, 1ª ed., São. Paulo: Roca, 2006, 240p.

LIRA, R. A. et al. Transferência De Embrião Em Equinos : Revisão. p. 132–140, 2009.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 7, p. 1635–47, 2000.

MARINONE, A. I. et al. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. **Animal Reproduction Science**, v. 158, n. July, p. 53–59, 2015.

MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista**

Brasileira de Reprodução Animal, v. 32, n. 1, p. 36–49, 2008.

MATTIOLI, M. et al. Follicle Activation Involves Vascular Endothelial Growth Factor Production and Increased Blood Vessel Extension. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1014–1019, 2001.

MCCUE, P. M. Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, p. 80–83, 2011.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: **Current Therapy Equine Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 319–334.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 319–334.

OLIVEIRA, M.; FERREIRA, R.; MINGOTI, G. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 35, n. 4, p. 418–432, 2011.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. DA C. **Obstetrícia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2017. 236p.

RENNIE, M. J. Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the Emperor's new clothes? **British Journal of Sports Medicine**, v. 37, p. 100–105, 2003.

ROBINSON, R. S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 869–881, 2009.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1193–1208, 2009.

SMITS, K. et al. The Equine Embryo Influences Immune-Related Gene Expression in the Oviduct1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 2, 2016.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M. Cryopreservation of Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 7–12, 2016.

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

STROBL, J. S.; THOMAS, M. J. Human growth hormone. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 1, p. 1–34, 1994.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 856, 1996.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Potential relevance to reproductive physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 2, p. 1–24, 2003.

ZHOU, J. et al. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 11, n. 13, p. 1924–33, 1997.

ZULU, V. C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 64, n. 8, p. 657–65, 2002.

CAPÍTULO 1

4. CAPÍTULO 1

Influência da somatotropina recombinante bovina no desenvolvimento folicular e coleta de embriões em éguas

Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira^{a,b,1}, Luís Artur Cordeiro Costa^c, Aurea Wischral^b, Claudio Coutinho Bartolomeu^b, Anísio Francisco Soares^b

^aInstituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia de Paraíba, IFPB, Av Presidente Tancredo Neves, S/n - Jardim Sorrilandia, Sousa-PB, Brasil

^bUniversidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE, Brasil

^cMédico veterinário autônomo, Rua da Restauração pernambucana, n 600, Garanhuns-PE, Brasil

¹e-mail: l_eduardo_@hotmail.com, telefone: 55 81 996936006

Resumo

O efeito da somatotropina recombinante bovina (r-bST) na dinâmica folicular e coleta de embriões em éguas foi estudada nessa pesquisa. Dez éguas sem raça definida foram submetidas à avaliações ultrassonográficas diárias, por via transretal, durante o intervalo interovulatório, avaliando-se apenas os folículos ≥ 5 mm. Cinco éguas foram tratadas com 500 mg de r-bST no primeiro e no 14º dia pós ovulação, e as demais com soro fisiológico, formando o grupo tratado (GT) e controle (GC), respectivamente. Quando o folículo dominante atingiu diâmetro ≥ 40 mm, todas foram induzidas com hCG, inseminadas 24 horas após e submetidas a coleta de embrião seis dias após ovulação. Os dados foram agrupados de acordo com o diâmetro do folículo dominante nas fases de emergência, divergência, dominância, pré-ovulatória, indução, inseminação e ovulação. Todas as éguas foram usadas duas vezes, no mesmo grupo, respeitando o intervalo de dois ciclos estrais, entre as repetições. O GT apresentou crescimento folicular precoce (± 3 dias) para as fases de emergência, divergência, dominância e pré-ovulatória, assim como para o seu maior folículo subordinado, que iniciou seu crescimento mais cedo. A taxa de recuperação foi de 90% para o GC e 70% para o GT, sendo coletadas 16 estruturas, obtendo uma não fecundada e as demais entre mórula e blastocisto inicial para o grupo GC e mórula e mórula compacta para o GT, com qualidade de excelente (dois grupos) a pobre (apenas no GC). Desta forma, conclui-se que a r-bST influencia a dinâmica folicular das éguas, levando a uma antecipação do desenvolvimento folicular que pode ser utilizada para encurtar o ciclo estral.

Palavras Chave: hormônio do crescimento, dinâmica folicular, folículo dominante, folículo subordinado.

1. Introdução

A somatotropina, hormônio de crescimento (GH) sintetizado e secretado pela hipófise anterior, vem sendo estudada e demonstrada como estimuladora da fisiologia reprodutiva [1,2], porém a égua tem sido pouco utilizada como modelo experimental [1,3]. No entanto, a espécie equina é um excelente modelo para as demais espécies monovulatórias, inclusive a humana [4], apesar de ainda necessitar melhorar seus índices reprodutivos em manejos comerciais.

O efeito anabolizante da somatotropina recombinante bovina, equina e suína em equinos já foi estudada. Os resultados mostraram que a somatotropina suína causa exacerbada reação no local de aplicação e a equina além de ser de difícil aquisição necessita de aplicação diária. Já a somatotropina recombinante bovina (r-bST) é de fácil aquisição, apresenta baixa reação local e

1 mantem sua ação farmacológica por 14 dias, devido seu veículo de aplicação, além de apresentar
2 homologia de 89% com a molécula equina [5].

3 A comprovação da r-bST como biologicamente ativa em equinos foi demonstrada através das
4 dosagens do fator de crescimento semelhante à insulina tipo um (IGF-I) [5,6], a principal
5 somatomedina mediadora de sua função [7]. Nas fêmeas das mais diversas espécies, o conjunto da
6 r-bST e da IGF-I potencializa o crescimento folicular e oocitário [8,9] e o desenvolvimento
7 embrionário [10], estando seus níveis elevados relacionados a maior ocorrência de partos
8 gemelares [11] além de apresentarem receptores no hipotálamo, hipófise, corpo lúteo, folículos
9 ovarianos, ovidutos, endométrio, miométrio e na placenta [12]. Tais ações ocorrem através de
10 mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos demonstrando que os tecidos reprodutivos não
11 são apenas locais de ação, mas também de síntese [13].

12 As IGFs estimulam a proliferação celular e produção hormonal nas células ovarianas [14],
13 interferindo na dinâmica folicular [15]. Desta forma acredita-se que a r-bST pode beneficiar os
14 índices reprodutivos, principalmente na técnica de transferência de embrião (TE) na espécie
15 equina, que tem apresentado resultados inferiores aos encontrados em outras espécies, como a
16 bovina [16].

17 Nesta pesquisa objetivou-se avaliar a interferência do r-bST na dinâmica folicular e produção
18 de embriões em éguas.
19

20 **2. Materiais e métodos**

21 **2.1. Desenho experimental**

22 O experimento foi desenvolvido entre os meses de outubro a março, no agreste meridional de
23 Pernambuco, nordeste do Brasil (8°55'47"S, 36°32'01"W). Foram utilizadas éguas cíclicas (n=10),
24 com idade e peso médio de 6,1 ($\pm$ 1,6) anos e 372,7 ($\pm$ 13,5) kg, respectivamente. Todas as éguas
25 eram saudáveis e criadas extensivamente em pastejo de *Digitaria decumbens* com água e sal
26 mineral à vontade. Os procedimentos realizados com os animais seguiram as recomendações da
27 legislação brasileira, sobre procedimentos de uso científico de animais (Lei nº 11.794 / 2008), com
28 aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de
29 Pernambuco (UFRPE) (licença nº 07/2017).

30 As éguas foram examinadas diariamente por ultrassom equipado com transdutor transretal
31 linear multifrequencial calibrado em 5MHz (M5 Vet, Mindray, China), sempre em mesmo horário,
32 possibilitando a criação retroativa dos ciclos estrais, através do número e diâmetros foliculares. As
33 que inicialmente apresentavam corpo lúteo (CL) foram tratadas com 5 mg de dinoprost
34
35

(prostaglandina F_{2α} - PGF_{2α}) (Lutalyse®, Pfizer, Brasil).

Durante as avaliações, quando o folículo dominante atingia valores acima de 35 mm, as éguas eram induzidas a ovular com 750 µg de acetato de deslorelina (Sincrorrelin®, Ouro Fino, Brasil) por via intramuscular. Em seguida, quando se identificou o desaparecimento do folículo dominante, marcando o início de um ciclo estral (dia zero - D0), as éguas foram tratadas por via subcutânea, ventralmente a inserção da calda, com 500 mg de r-bST (Lactotropin Injetável®, Elanco Saúde Animal, Brasil) (grupo tratamento - GT) ou com solução fisiológica (grupo controle - GC), sendo repetidos após quatorze dias (D14).

Posteriormente, quando um novo folículo dominante atingia diâmetro ≥ 40 mm, foram administrados 2.500 UI de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) (Vetecor®, HertapeCalier Saúde Animal S/A, Brasil), por via intravenosa, para induzir uma nova ovulação. Após 24 horas da administração do hCG, todas as éguas foram inseminadas, pelo método transcervical, com sêmen fresco contendo 1.000×10^6 espermatozoides viáveis, provenientes do mesmo garanhão.

A ovulação do folículo dominante marcou o final do ciclo estral (DF) e as éguas foram submetidas a coleta de embrião pelo método transcervical não cirúrgico [16], seis dias após a ovulação. Para as lavagens uterinas foram utilizados 3L de Solução Ringer com Lactato de Sódio divididas igualmente em três procedimentos de lavagem. As estruturas recuperadas foram classificadas de acordo com sua morfologia e estágio conforme proposto por [17], observando o formato do embrião, espessura e presença de lesão na zona pelúcida e cápsula, uniformidade dos blastômeros e citoplasmas, extrusões no espaço perivitelínico e formação da blastocle.

Os grupos foram divididos de forma aleatória e todas as éguas foram usadas duas vezes, no mesmo grupo, respeitando o intervalo de dois ciclos estrais, entre as repetições. Os intervalos entre as induções de ovulação foram considerados como um ciclo estral, obtendo-se assim vinte ciclos estrais, dez para cada grupo.

2.2. Tabulação dos dados e Análise estatística

A avaliação foi feita separando os dados obtidos em 7 fases identificadas após avaliação retrospectiva dos diâmetros foliculares: emergência (início do crescimento do maior folículo), divergência (maior folículo com diâmetro ≥ 22 mm), dominância (maior folículo com diâmetro ≥ 25 mm), pré-ovulatória (maior folículo com diâmetro ≥ 35 mm) [18], indução ovulatória (maior folículo com diâmetro ≥ 40 mm), inseminação artificial (24 horas após a indução da ovulação) e ovulatória (desaparecimento do folículo dominante). Os intervalos entre fases subsequentes foram utilizados para calcular a taxa de crescimento folicular média por fase, que foi obtida através da média das taxas de crescimento folicular dos ciclos estrais, calculadas pela diferença entre os

tamanhos foliculares de cada fase subsequente, dividido pelos dias entre essas fases e nomeados pela fase que o iniciou.

Os dados obtidos são apresentados como média e desvio padrão, como medidas de tendência central. Foi empregada a análise de variância (ANOVA) para um fator e nos casos em que houve significância no teste F ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para as variáveis não paramétricas, na comparação entre grupos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, enquanto para efeito de momento foi usado o teste de Fridman [19]. Para as avaliações embrionárias foi empregado o método descritivo.

3. Resultados e discussão

O presente estudo é o primeiro a avaliar o tratamento com r-bST durante todo ciclo estral de éguas submetidas à coleta de embrião, sem utilização de outro hormônio promotor do crescimento ou superovulatório. Poucas pesquisas têm utilizado o r-bST na reprodução de equinos, porém já foi demonstrado que este hormônio é biologicamente ativo na espécie em estudo, promovendo aumento nos níveis plasmáticos de IGF-I [5,6].

O comportamento da onda folicular foi semelhante entre os grupos (Fig. 1) caracterizando ondas foliculares maiores primárias conforme já descrito na literatura [20,21]. Em 100% dos ciclos acompanhados, foram observadas ondas foliculares únicas com presença de apenas um folículo dominante que chegou a ovular e folículos subordinados que entraram em atresia após a definição da dominância.

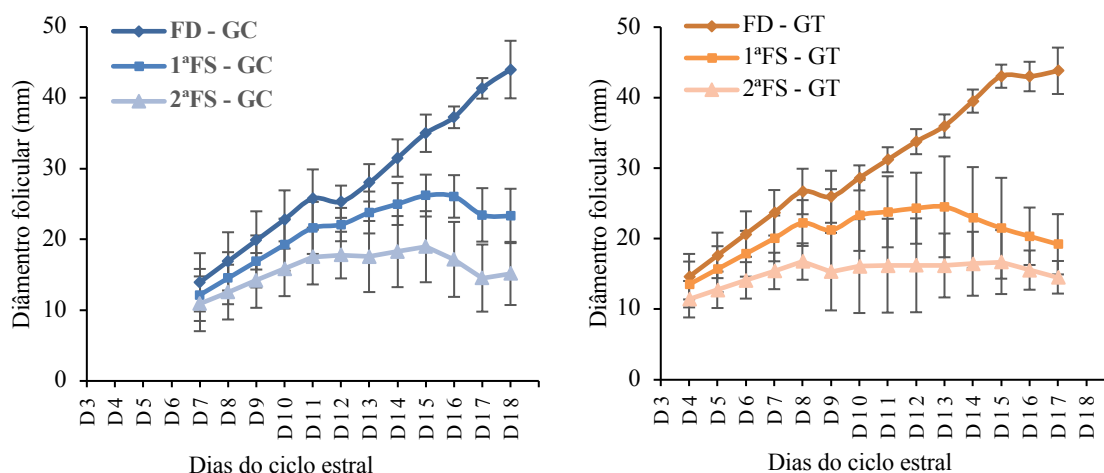


Figura 1- Distribuição das médias ($\pm$ desvio padrão) dos diâmetros dos folículos dominante (FD), 1ª subordinado (1ªFS) e 2ª subordinado (2ªFS) do grupo controle (A) e tratamento (B) no decorrer do ciclo estral das éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST. Segunda aplicação de r-bST (▼)

O número de folículos recrutados foi semelhante entre os grupos (Fig. 2), não sendo observada influência do tratamento, conforme relatado por Gomes [3], e com valores similares aos já

descritos para um ciclo estral fisiológico [20]. Levando ao entendimento que a r-bST não interfere no número de folículos, quando empregado nesses momentos.

Esta não interferência da somatotrofina pode estar relacionada com o tempo necessário para o desenvolvimento de receptores nos folículos, entre a fase primordial até a antral. Visto que o início do desenvolvimento folicular ocorre em períodos anteriores a sua identificação na onda folicular, se iniciando mais precoce e tendo tempo mais longo de acordo com o porte da espécie [22]. Desta forma a comprovada influência direta e indireta do GH sobre o desenvolvimento folicular [23], pode não ter sido potencializada em decorrência do tempo entre o início do tratamento com r-bST e o acompanhamento folicular.

Mesmo não existindo diferenças quanto ao comportamento da onda folicular e número de folículos, existiu uma interferência sobre os diâmetros foliculares. O diâmetro do folículo dominante apresentou crescimento mais rápido, demonstrando a influência do r-bST no surgimento precoce das fases de emergência e divergência da onda folicular ovariana ($P < 0,05$) (Fig. 2).

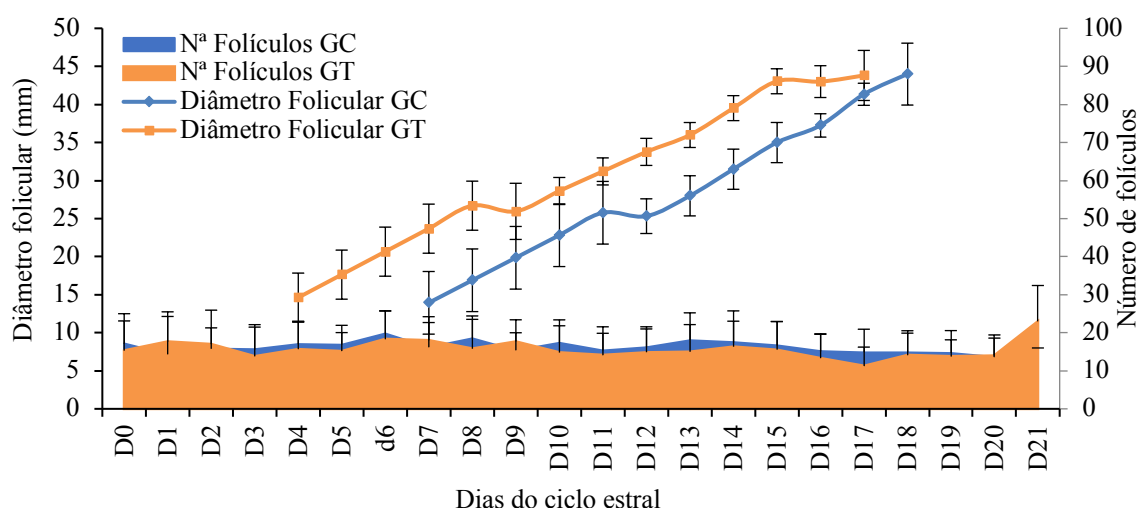


Figura 2- Distribuição das médias ($\pm$ desvio padrão) do número de folículos (em área) e dos diâmetros foliculares (em linhas) estimados através das taxas de crescimento folicular e dos diâmetros das fase de recrutamento (R), divergência (Di), dominância (Do), pré-ovulatória (Po), indução ovulatória (I), inseminação artificial (IA) no decorrer do ciclo estral das éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).

*Quando presente representa diferenças significativas em relação aos dias do ciclo estral ($p < 0,05$).

A precocidade da onda folicular do GT levou à diferenças significativas nos dias das fases de emergência, divergência, dominância e pré-ovulatória ($p \leq 0,05$). Tendo estas ocorrido aproximadamente 3 dias mais cedo que no GC. Porém as fases de indução ovulatória, inseminação artificial e da ovulação, foram semelhantes ($P > 0,05$). Estes dados corroboram com pesquisas na espécie suína [24] e bovina [8], que também observaram crescimento folicular acelerado nas fases iniciais da onda folicular e outra que demonstrou influência dos fatores de crescimento na dinâmica

reprodutiva de bovinos [2].

O momento esperado da emergência seria entre os dias 9 e 12 do ciclo estral, com folículos em torno de 13 mm [25] sendo esses dias estatisticamente diferentes entre os grupos, com o GC apresentando valores próximos aos da literatura. Provavelmente pela elevação dos níveis de IGF-I, que interferem direta [26] e indiretamente na dinâmica ovariana [27].

De forma semelhante ao folículo dominante, o maior subordinado (1ª folículo subordinado) alcançou diâmetros importantes e significativamente precoces em relação ao GC, atingindo 22 mm aproximadamente 3 dias mais cedo (Fig. 3), diâmetro utilizado como ponto de corte para indução da superovulação [28,29]. Os resultados superovulatórios ainda são muito variáveis entre as éguas e tratamentos utilizados [29], sendo o uso da r-bST considerado como uma possibilidade de melhorar os resultados de superovulação em equinos, através da elevação na concentração de IGF-I, já descrito como fator importante na superovulação em outras espécies, como em ratos e bovinos [30]. Já o terceiro maior folículo (2ª folículo subordinado) não apresentou alteração em seu comportamento.

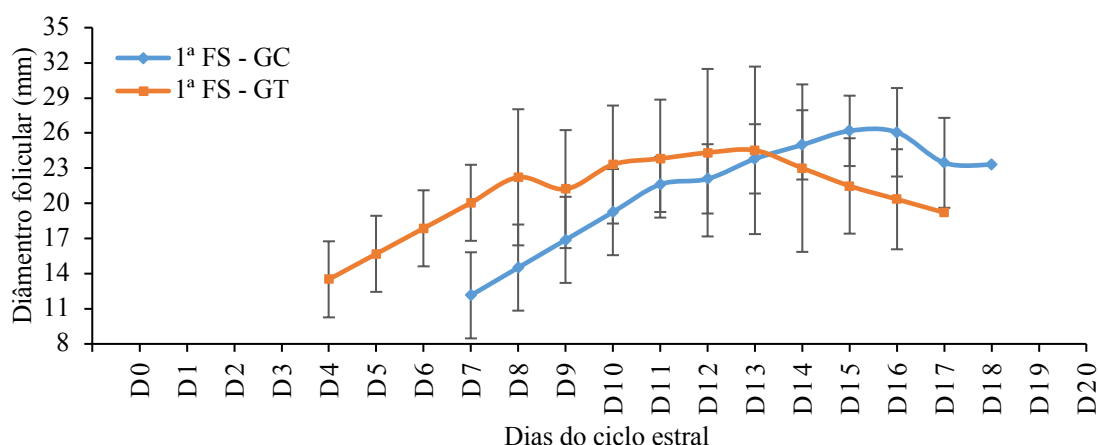


Figura 3- Distribuição das médias ($\pm$ desvio padrão) dos diâmetros do 1ª folículo subordinado (1ªFS) do dos grupos controle (GC) e tratamento (GT), no decorrer do ciclo estral das éguas tratadas com r-bST. Aplicação do r-bST (▼). Folículo subordinado ≥ 22 (∇).

*Representa diferenças significativas em relação aos dias do ciclo estral entre grupos ($p < 0,05$).

Mesmo existindo uma precocidade em algumas fases da onda folicular essas se mantiveram igualitariamente separadas. Não ocorreu interferência sobre as taxas de crescimento folicular de nenhuma fase e em nenhuma categoria de folículo (Tab. 1), sendo o crescimento do folículo dominante semelhante ao descrito na literatura, que é em torno de 3 mm por dia [25]. Porém uma menor taxa de crescimento folicular no GT nas fases finais da onda folicular levou a uma semelhança na duração total do ciclo estral.

Tabela 1 - Médias ($\pm$ desvio padrão) dos dias do ciclo estral, diâmetros foliculares, taxa de crescimento folicular e vascularização folicular periférica das fases de emergência, divergência, dominância, pré-ovulatória, indução ovulatória, inseminação artificial e ovulatória de éguas tratadas com r-bST.

Variáveis	Fases da onda folicular						
	Emergência	Divergência	Dominância	Pré-ovulatória	Indução	Inseminação	Ovulação
CONTROLE							
Dia do ciclo (dia)	6,6($\pm$ 3,0) ^A	11,7($\pm$ 2,5) ^A	12,6($\pm$ 2,8) ^A	15,8($\pm$ 3,0) ^A	17,1($\pm$ 3,1) ^A	18,2($\pm$ 2,7) ^A	19,3($\pm$ 2,8) ^A
Número de folículos	19,7($\pm$ 7,7) ^{Aa}	15,8($\pm$ 5,9) ^A	15,2($\pm$ 5,4) ^A	14,7($\pm$ 5,3) ^A	14,5($\pm$ 6,5) ^A	14,6($\pm$ 6,5) ^A	
Folículo Dominante							
Diâmetro folicular (mm)	12,75($\pm$ 4,1) ^A	24,72($\pm$ 2,3) ^A	26,59($\pm$ 2,6) ^A	36,39($\pm$ 1,5) ^A	41,56($\pm$ 1,5) ^A	43,99($\pm$ 4,1) ^A	
Taxa de crescimento (mm)	2,96($\pm$ 2,6) ^{Aa}	1,99($\pm$ 1,1) ^{Aa}	3,5($\pm$ 1,4) ^{Aa}	4,27($\pm$ 1,3) ^{Aa}	2,24($\pm$ 2,9) ^{Aa}		
1º Folículo Subordinado							
Diâmetro folicular (mm)	11,2($\pm$ 3,7) ^A	21,36($\pm$ 2,4) ^A	23,32($\pm$ 3,0) ^A	26,36($\pm$ 3,0) ^A	25,17($\pm$ 3,8) ^A	24,63($\pm$ 3,8) ^A	
Taxa de crescimento (mm)	2,37($\pm$ 1,2) ^{Aa}	2,44($\pm$ 1,9) ^{Aa}	1,2($\pm$ 1,8) ^{Aa}	-1,46($\pm$ 3,9) ^{Aa}	-0,16($\pm$ 2,9) ^{Aa}		
2º Folículo Subordinado							
Diâmetro folicular (mm)	0,24($\pm$ 3,9) ^A	17,54($\pm$ 3,3) ^A	17,3($\pm$ 5,0) ^A	17,33($\pm$ 5,3) ^A	16,24($\pm$ 4,7) ^A	16,7($\pm$ 4,5) ^A	
Taxa de crescimento (mm)	1,65($\pm$ 0,7) ^{Aa}	0,8($\pm$ 2,8) ^{Aa}	0,69($\pm$ 3,1) ^{Aa}	-0,8($\pm$ 2,0) ^{Aa}	0,66($\pm$ 3,3) ^{Aa}		
TRATAMENTO							
Dia do ciclo (dia)	4,1($\pm$ 2,2) ^B	8,5($\pm$ 1,2) ^B	9,5($\pm$ 1,4) ^B	13,2($\pm$ 1,6) ^B	15,5($\pm$ 1,3) ^A	16,8($\pm$ 1,8) ^A	17,8($\pm$ 1,8) ^A
Número de folículos	16,8($\pm$ 5,8) ^{Aa}	15,6($\pm$ 4,7) ^{Aa}	16,2($\pm$ 6,2) ^{Aa}	17,0($\pm$ 6,5) ^{Aa}	13,0($\pm$ 5,0) ^{Aa}	12,8($\pm$ 5,4) ^{Aa}	16,8($\pm$ 5,8) ^{Aa}
Folículo Dominante							
Diâmetro folicular (mm)	14,92($\pm$ 3,2) ^A	24,21($\pm$ 3,7) ^A	27,34($\pm$ 1,8) ^A	36,69($\pm$ 1,6) ^A	42,86($\pm$ 2,1) ^A	43,81($\pm$ 3,3) ^A	
Taxa de crescimento (mm)	3,02($\pm$ 2,6) ^{Aa}	3,48($\pm$ 2,4) ^{Aa}	2,57($\pm$ 0,5) ^{Aa}	3,53($\pm$ 2,6) ^{Aa}	0,28($\pm$ 2,8) ^{Aa}	3,02($\pm$ 2,6) ^{Aa}	
1º Folículo Subordinado							
Diâmetro folicular (mm)	13,73($\pm$ 3,2) ^A	19,01($\pm$ 5,8) ^A	23,06($\pm$ 5,0) ^A	24,83($\pm$ 7,2) ^A	24,15($\pm$ 4,1) ^A	22,89($\pm$ 4,3) ^A	
Taxa de crescimento (mm)	2,18($\pm$ 4,5) ^{Aa}	4,41($\pm$ 3,7) ^{Aa}	0,51($\pm$ 1,2) ^{Aa}	-1,52($\pm$ 6,5) ^{Aa}	-1,14($\pm$ 2,3) ^{Aa}		
2º Folículo Subordinado							
Diâmetro folicular (mm)	11,56($\pm$ 2,6) ^A	14,3($\pm$ 5,5) ^A	16,09($\pm$ 6,7) ^A	16,16($\pm$ 4,5) ^A	17,27($\pm$ 2,8) ^A	16,04($\pm$ 2,3) ^A	
Taxa de crescimento (mm)	1,34($\pm$ 2,9) ^{Aa}	2,06($\pm$ 5,7) ^{Aa}	0,06($\pm$ 1,2) ^{Aa}	0,24($\pm$ 3,5) ^{Aa}	-1,02($\pm$ 1,2) ^{Aa}		

^{AB/ab} Letras maiúsculas na coluna e letras minúsculas na linha quando diferentes representam diferenças significativas entre grupos ou momentos, respectivamente ($p < 0,05$).

Embora haja semelhança entre os grupos quanto ao momento da ovulação, no D18 a maioria dos animais tratados já haviam ovulado, contra uma pequena parcela do grupo controle (Fig. 4). Demonstrando, mais uma vez, a capacidade do tratamento proposto em antecipar etapas do ciclo estral. Sendo identificado apenas um ciclo curto para o GC que pode ser explicado pela variação individual. Pois, em casos como este, o principal fator de influência nos intervalos entre ovulações é a própria égua, que pode apresentar ciclos de 13 a 25 dias. De maneira que as éguas com curtos intervalos entre ovulações já demonstram folículos > 30 mm próximo ao D6 [31], conforme se apresentou este caso.

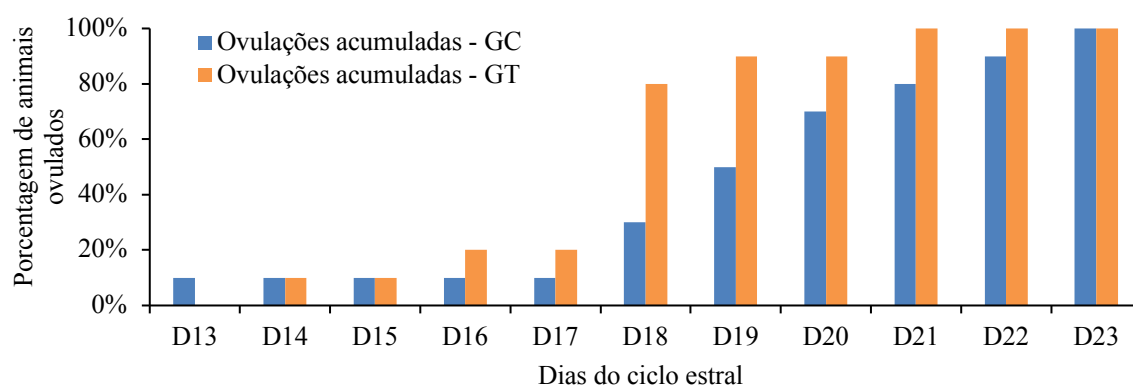


Figura 4- Distribuição das porcentagens acumuladas de ovulações no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST.

Analizando as variáveis embrionárias, não foram constatadas diferenças entre os grupos ($P > 0,05$) (Tab. 2), o que também foi observado em outras pesquisas utilizando r-bST em protocolos superovulatórios em equinos [3] e bovinos [8,32]. Da mesma forma, a emergência precoce em conjunto com um maior tempo até a indução ovulatória não influenciou tais variáveis, visto que no GT o tempo de duração do folículo dominante até ele ser induzido foi de 6 ($\pm 0,9$) contra 4,5 ($\pm 1,43$) dias para o GC, resultando em uma diferença significativa de 1,5 dias a mais para o GT ($P = 0,013$). Poderia-se esperar alguma interferência pelo maior tempo de desenvolvimento oocitário porém um fator mais importante que interfere na qualidade do oócito é o tamanho folicular final [33] e este foi semelhante entre os grupos, já que indução da ovulação dos folículos ocorreu em função do tamanho e não do tempo de desenvolvimento.

Tabela 2 - Taxa de recuperação embrionária por coleta, número, estágio e qualidade embrionária de éguas tratadas com r-bST

Variável		Grupo	
		Controle	Tratamento
Taxa de recuperação por coleta		90,00%	70,00%
Número total de estruturas/embriões		9 / 8	7 / 7
Estágio de desenvolvimento embrionário	Não fecundado	1 (12,5%)	0 (0,0%)
	Mórula compacta.	2 (25,0%)	3 (42,9%)
	Mórula	5 (62,5%)	4 (57,1%)
	Blastocisto Inicial	1 (12,5%)	0 (0,0%)
Qualidade embrionária	Excelente	6 (75,0%)	6 (85,7%)
	Regular	1 (12,5%)	1 (14,3%)
	Pobre	1 (12,5%)	0 (0,0%)

Os demais estágios e qualidades não foram encontrados

De toda maneira, poderíamos inferir que o tratamento favoreceu a uma maior homogeneidade dos estágios embrionários, por uma maior padronização nos momentos da ovulação. Porém a existência de um blastocisto inicial encontrado no GC, mesmo sendo possível de ocorrer nessa fase [34], foi proveniente de um ciclo no qual a ovulação pode ter ocorrido logo após a avaliação ginecológica, realizada no período da manhã, estando assim mais próximo do sétimo dia após ovulação do que do sexto, pois a ovulação só foi considerada na avaliação com 48 horas da IA. As ovulações foram consideradas desta forma devido a maioria das éguas ovularem durante a noite [35] e responderem ao hCG em torno de 36 horas após a aplicação [36], desta maneira quando a ovulação não foi identificada no dia seguinte à IA, esperava-se que a ovulação tivesse ocorrido nas próximas 12 horas, o que provavelmente ocorreu em sua maioria, visto os estágios embrionários encontrados.

Em um dos ciclos estrais em que não houve recuperação embrionária no GT, a inseminação foi realizada com a égua já ovulada, todos os demais ciclos foram inseminados antes da ovulação.

Resultados negativos são esperados quando se insemina uma égua após ovulação, pelo tempo de vida do oócito em conjunto com a necessidade da capacitação espermática, levando a falhas de fecundação quando não realizado em períodos até 12 horas após a ovulação [37]. Por outro lado, em 30% dos casos, em ambos os grupos, a ovulação ocorreu entre 24 e 48 horas após inseminação, desses 100% resultaram em embriões. Confirmando a necessidade de inseminação de equinos apenas a cada 48 horas, possibilitada pela viabilidade espermática [38].

Diante disto, mesmo sem uma influência sobre o modelo da onda folicular e dos resultados comerciais finais na produção de embriões, o tratamento pode levar a uma redução significativa da duração do ciclo estral em aproximadamente 3 dias se a indução da ovulação for realizada quando o diâmetro folicular atingir ao limiar de 35 mm, além de permitir o início mais cedo de um protocolo de superovulação. O que possibilita aumentar o número de coletas de embrião em um mesmo período de tempo, quando utilizados vários ciclos consecutivos, o que é desejável nas centrais de reprodução.

4. Conclusões

A r-bST influenciou o ciclo estral das éguas tratadas, levando à antecipação no desenvolvimento dos folículos podendo reduzir o tempo total do ciclo estral equino e favorecer tratamentos superovulatórios. Porém a r-bST quando aplicada durante o ciclo estral não altera a quantidade de folículos, tipo e número das ondas foliculares, bem como a qualidade e quantidade de embriões.

5. Referência bibliográficas

- [1] Cochran RA, Leonardi-Cattolica AA, Sullivan MR, Kincaid LA, Leise BS, Thompson DL, et al. The effects of equine somatotropin (eST) on follicular development and circulating plasma hormone profiles in cyclic mares treated during different stages of the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol* 1999;16:57–67. doi:10.1016/S0739-7240(98)00046-0.
- [2] Zulu VC, Nakao T, Sawamukai Y. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *J Vet Med Sci* 2002;64:657–65. doi:10.1292/jvms.64.657.
- [3] Gomes GM. Efeito da somatotrofina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatória e recuperação embrionária em éguas tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE). Universidade estadual paulista, 2007.
- [4] Alves KA, Alves BG, Gastal GDA, De Tarso SGS, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. *PLoS One* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0149693.
- [5] De Kock SS, Rodgers JP, Swanepoel BC, Guthrie AJ. Administration of bovine, porcine

- and equine growth hormone to the horse: Effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. *J Endocrinol* 2001;171:163–71. doi:10.1677/joe.0.1710163.
- [6] Buonomo FC, Ruffin DS, Brendemeuhl JP, Veenhuizen JJ, Sartin JL. The Effects of Bovine Somatotropin (bST) and Porcine Somatotropin (pST) on Growth Factor and Metabolic Variables in Horses. *J Anim Sci* 1996.
- [7] Norman AW, Litwack G. Anterior Pituitary Hormones. *Horm.* 2^a Ed., 1997, p. 133–68. doi:10.1016/B978-0-12-521441-4.50006-7.
- [8] Gong JG, Bramley T a, Wilmut I, Webb R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol Reprod* 1993;48:1141–9. doi:10.1095/biolreprod48.5.1141.
- [9] Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, Torres-Júnior JR, Nasser LFT, Tonhati H, et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on in vitro buffalo embryo production. *Anim Reprod Sci* 2009;113:51–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.06.008.
- [10] Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002;57:1371–87. doi:10.1016/S0093-691X(01)00719-1.
- [11] Cushman RA, Hedgpeth VS, Echternkamp SE, Britt JH. Evaluation of numbers of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. *J Anim Sci* 2000;78:1564–7.
- [12] Kirby CJ, Wilson SJ, Lucy MC. Response of Dairy Cows Treated with Bovine Somatotropin to a Luteolytic Dose of Prostaglandin F_{2α}. *J Dairy Sci* 1997;80:286–94. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75936-8.
- [13] Hull KL, Harvey S. Growth Hormone and Reproduction: A Review of Endocrine and Autocrine/Paracrine Interactions. *Int J Endocrinol* 2014;2014. doi:10.1155/2014/234014.
- [14] Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci* 1993;71:1232–41. doi:10.2527/1993.7151232X.
- [15] Gurgel JRC, Viana CHC, Perez EG de A, Nichi M. Dinâmica folicular em éguas : aspectos intrafoliculares. *Rev Bras Reprod Anim* 2008;32:122–32.
- [16] Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003;59:151–70. doi:10.1016/S0093-691X(02)01268-2.
- [17] McCue PM. Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião. *Rev Educ Contin Em Med Veterinária E Zootec* 2011;9:80–3.
- [18] Donadeu FX, Pedersen HG. Follicle Development in Mares. *Reprod Domest Anim* 2008;43:224–31. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01166.x.
- [19] CURI PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. Tipomic. Botucatu: 1998.
- [20] Ginther O. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects 1992:1–642.
- [21] Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:61–79. doi:10.1016/S0378-4320(00)00083-X.
- [22] Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 1997;47:3–12.

doi:10.1016/S0093-691X(96)00334-2.

- [23] Zaczek D, Hammond J, Suen L, Wandji S, Service D, Bartke A, et al. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod* 2002;67:1115–24. doi:10.1095/biolreprod.102.004754.
- [24] Echternkamp SE, Spicert LJ, Klindt J, Vernon RK, Yen JT, Buonomo FC. Administration of Porcine Somatotropin by a Sustained-Release Implant : Effects on Follicular Growth , Concentrations of Steroids and Insulin-Like Growth Factor I , and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Activity in Follicular Fluid of Control , L. *J Anim Sci* 1992;72:2431–40. doi:10.2527/1994.7292431.
- [25] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? *J Equine Vet Sci* 2008;28:454–60. doi:10.1016/j.jevs.2008.07.008.
- [26] Donadeu FX, Ginther OJ. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol Reprod* 2002;66:1111–8. doi:10.1095/biolreprod66.4.1111.
- [27] Donadeu FX, Watson ED. Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. *Anim Reprod Sci* 2007;100:225–42. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.12.001.
- [28] Meyers-Brown G, Bidstrup LA, Famula TR, Colgin M, Roser JF. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. *Anim Reprod Sci* 2011;128:52–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.09.002.
- [29] Roser JF, Meyers-Brown G. Superovulation in the Mare: A Work in Progress. *J Equine Vet Sci* 2012;32:376–86. doi:10.1016/j.jevs.2012.05.055.
- [30] Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction* 2009;137:161–80. doi:10.1530/REP-08-0362.
- [31] Marinone AI, Losinno L, Fumuso E, Rodríguez EM, Redolatti C, Cantatore S, et al. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Anim Reprod Sci* 2015;158:53–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.04.007.
- [32] Neves EF, Ramos AF, Marques AP. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. *Arq Bras Med Vet E Zootec* 2005;57:205–9.
- [33] Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47:23–32. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6.
- [34] McKinnon AO, Squires EL. Embryo Transfer and Related Technologies. *Curr. Ther. Equine Reprod.*, 2007, p. 319–34. doi:10.1016/B978-0-7216-0252-3.50055-2.
- [35] Romano MA, Mucciolo RG, Silva AEDF. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 1998;35:25–8. doi:10.1590/S1413-95961998000100004.
- [36] Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Siddiqui MAR, Beg MA. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:955–63. doi:10.1071/RD08121.
- [37] Newcombe JR, Paccamonti D, Cuervo-Arango J. Reducing the examination interval to detect ovulation below 12h does not improve pregnancy rates after postovulatory

1 insemination with frozen/thawed semen in mares. Anim Reprod Sci 2011;123:60–3.
2 doi:10.1016/j.anireprosci.2010.11.004.

- 3 [38] Saturnino HM, Monteiro J, Silva MD, Palhares S, Brandão FZ, Oliveira HN. Efeito do
4 Intervalo das Duas Últimas Inseminações sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com
5 Sêmen Fresco Diluído Effect of Interval Between the Two Last Artificial Inseminations
6 on Mares Fertility Inseminated with Diluted Fresh Semen 2002:1143–9.

CAPÍTULO 2

5. CAPÍTULO 2

Influência da somatotropina recombinante bovina (r-bST) na vascularização folicular e no perfil metabólico de éguas

Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira^{a,b,1}, Aurea Wischral^b, Claudio Coutinho Bartolomeu^b, Anísio Francisco Soares^b

^aInstituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia de Paraíba, IFPB, Av Presidente Tancredo Neves, S/n - Jardim Sorrilândia, Sousa-PB, Brasil

^bUniversidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171 – 900 - Recife/PE, Brasil

¹e-mail:l_eduardo_@hotmail.com, telefone: 55 81 996936006

Resumo

Embora a somatotropina recombinante bovina (r-bST) seja muito estudada em bovinos, a sua ação é pouco descrita em equinos, tendo esta pesquisa avaliado a sua influência na vascularização folicular e perfil metabólico de éguas. Dez éguas sem raça definida foram submetidas a coleta de sangue e avaliações ultrassonográficas em modo Doppler colorido a cada 48 horas, por via transretal, durante um intervalo interovulatório, avaliando-se apenas o maior folículo. Cinco éguas foram tratadas com 500 mg de r-bST no primeiro e no 14º dia pós ovulação, e as demais com soro fisiológico, formando o grupo tratado (GT) e controle (GC), respectivamente. Quando o folículo dominante atingiu diâmetro ≥ 40 mm, todas foram induzidas com hCG. Avaliação subjetiva da taxa de vascularização folicular periférica foi realizada em todos os momentos. Assim como as mensurações das concentrações de IGF-I, NEFA, glicose e proteína total, com exceção do IGF-I com avaliações apenas no primeiro, sexto, 14ª e no último dia do intervalo interovulatório. Apenas o GT apresentou diferenças nas taxas de vascularização folicular, com aumentos significativos no D8 e D12. As concentrações de IGF-I e NEFA apresentaram aumentos significativos no D6 e D14 para IGF-I e no D16 para o NEFA, porém mantendo-se dentro dos padrões fisiológicos. A glicose e a proteína total se mantiveram constantes. Desta forma, conclui-se que a r-bST favorece a vascularização folicular periférica sem prejuízos a manutenção da homeostase das variáveis metabólicas estudadas.

Palavras Chave: hormônio do crescimento, IGF-I, vascularização folicular, ultrassonografia doppler, metabolismo equino.

1. Introdução

A somatotropina recombinante bovina (r-bST) é um agente modificador da fisiologia animal comercialmente utilizada na pecuária bovina leiteira [1]. A partir de observações de rebanhos que a utilizaram, foram realizadas pesquisas que demonstraram a interferência da r-bST na dinâmica reprodutiva, sugerindo seu uso com alternativa para potencializar biotecnologias [2,3]. Porém, por ser de outra espécie sua utilização em éguas é escassa, deixando dúvidas sobre sua ação em tais animais.

As éguas são excelentes modelos experimentais para estudar a dinâmica ovariana pois permitem fácil acesso ao ovário e apresentam grandes folículos (> 40 mm), sendo consideradas representativas para espécies monovulatórias, como a humana [4]. Além disto a sua particular

1 anatomia ovariana invertida e sua predisposição a patologias uterinas [5], levam a necessidade de
2 técnicas que favoreçam os índices reprodutivos.

3 A vascularização folicular está relacionada à fisiologia reprodutiva, visto que a
4 neovascularização é indispensável no crescimento folicular durante todas as fases antrais, e que
5 compostos antiangiogênicos comprometem o desenvolvimento folicular [6]. Sabe-se que o
6 folículo dominante apresenta maior rede vascular que o subordinado, resultando na divergência
7 folicular, pois o aumento do aporte sanguíneo leva a maior oferta hormonal e metabólica que
8 podem levar as éguas a maiores chances de fertilização [7].

9 A r-bST interage com muitos tecidos, principalmente o fígado, desencadeando a liberação de
10 fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) [8]. O IGF tipo I (IGF-I) estimula a produção
11 de fatores angiogênicos, os quais são responsáveis pela neovascularização folicular periférica [9].

12 Deve-se considerar também que a r-bST promove alterações no metabolismo de vários outros
13 sistemas, interferindo na homeostase orgânica e por isso é importante observar seus efeitos
14 colaterais. Por ser um hormônio do crescimento (GH) sintético, a r-bST irá apresentar ação
15 anabólica e metabólica, estimulando o crescimento tecidual, interferindo no fluxo, na oxidação e
16 no metabolismo de praticamente todos os nutrientes [10].

17 Desta forma a presente pesquisa buscou avaliar a influência do r-bST na vascularização
18 folicular periférica e caracterizar suas ações no equilíbrio metabólico durante o ciclo estral de
19 éguas.

21 **2. Materiais e métodos**

23 **2.1. Desenho experimental**

25 Foram utilizadas 10 éguas cíclicas, com idade de 6,1 ($\pm 1,6$) anos e peso de 372,7 ($\pm 13,5$) kg,
26 saudáveis e criadas em manejo extensivo, com água e sal mineral à vontade. O experimento foi
27 desenvolvido entre os meses de outubro a março, no agreste meridional de Pernambuco, nordeste
28 do Brasil (8°55'47"S, 36°32'01"W). Os procedimentos realizados com os animais foram aprovados
29 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco
30 (UFRPE), seguindo as recomendações da legislação brasileira.

31 Na fase inicial, as éguas foram examinadas diariamente por ultrassonografia usando transdutor
32 transretal linear (5MHz) (M5 Vet, Mindray, China), sempre em mesmo horário. As que
33 apresentavam corpo lúteo (CL) foram induzidas à luteólise com 5 mg de dinoprost (Lutalyse®,
34 Pfizer, Brasil).

35 Durante as avaliações, quando o folículo dominante atingia valores acima de 35 mm, as éguas

foram induzidas a ovular com 750 µg de acetato de deslorelina (Sincrorrelin[®], Ouro Fino, Brasil) por via intramuscular. A ovulação do folículo dominante marcou o início do intervalo interovulatório (D0), considerando um novo ciclo estral.

No D0 as éguas receberam, por via subcutânea ventralmente a inserção da calda, 500 mg de r-bST (Lactotropin Injetável[®], Elanco Saúde Animal, Brasil) (Grupo Tratamento - GT) ou solução fisiológica (Grupo Controle -GC). Aos quatorze dias (D14) do ciclo as aplicações foram repetidas. A divisão dos grupos foi realizada por sorteio e cada grupo consistiu em cinco éguas.

A partir do D0 e a cada 48 horas, as éguas foram submetidas a coletas de sangue e a ultrassonografia ovariana, usando modo Doppler colorido. O folículo dominante foi induzido a ovular quando atingiu diâmetro ≥ 40 mm, com 2.500 UI de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) (Vetecor[®], HertapeCalier Saúde Animal S/A, Brasil), por via intravenosa.

2.2. Vascularização folicular

Com o modo Doppler colorido foi possível obter os sinais de fluxo sanguíneo periférico nos folículos, avaliando a área percentual com presença de sinais coloridos, seguindo metodologia adotada por Ginther [11]. Foram realizadas avaliações subjetivas visuais do porcentual de vascularização folicular (%VF), obtida da média de três imagens apresentando a máxima vascularização do maior diâmetro folicular (ØF) (Fig. 1). Para obtenção das imagens foram gravados vídeos no próprio aparelho, feitos durante as avaliações ultrassonográficas realizadas com movimentos lentos e contínuos sobre a superfície ovariana. Com o intuito de impedir divergências, as configurações de frequência (5 MHz), ganho (100) e cor (5) foram mantidas em todos os exames e o mesmo pesquisador realizou todas as avaliações.

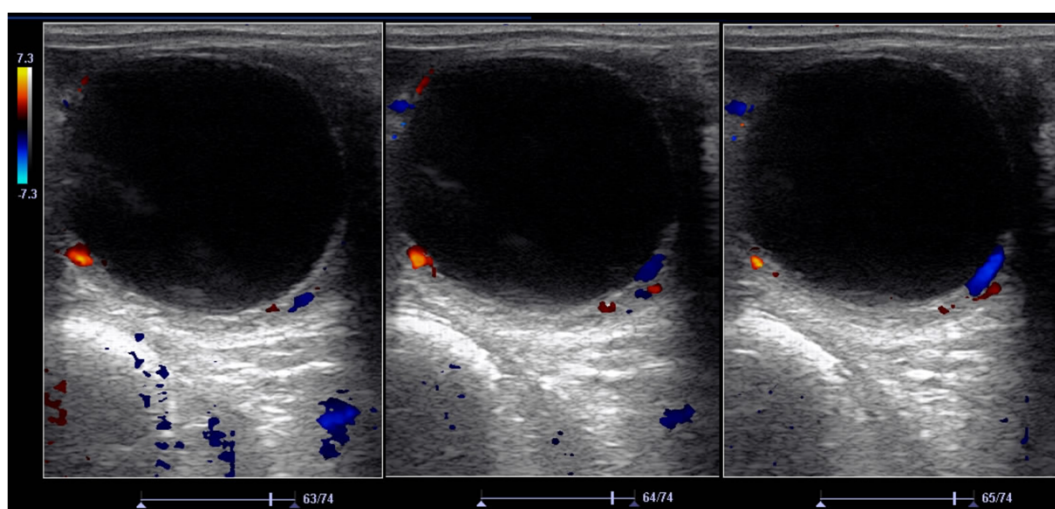


Figura11 - Representação de três fotos do maior diâmetro folicular retiradas de um mesmo vídeo para avaliação subjetiva da porcentagem de vascularização folicular periférica obtida através de ultrassonografia Doppler colorido de ovários equinos.

2.3. Variáveis sanguíneas

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular externa em tubos siliconizados estéreis a vácuo sem anticoagulante (Vacutainer® - Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), sempre antes dos tratamentos e dos exames de ultrassonografia. O soro foi armazenado em freezer (-20°C) em até seis horas da coleta do sangue para posterior análise.

No soro sanguíneo foram mensuradas as concentrações de IGF-I, ácido graxos não esterificáveis (NEFA), glicose e proteína total (PT). As concentrações de IGF-I foram determinadas utilizando o método de enzima-imunoensaio (ELISA) para IGF-I equino (Biomatik Company, Ontário, Canadá). Todas as demais análises foram efetuadas em analisador bioquímico semiautomático (Bioplus, Bio 2000), pela técnica de colorimetria. Para determinação da concentração do IGF-I foram empregadas apenas as amostras obtidas nos D0, D6, D14 e 24 horas após a indução com hCG, sendo este o dia final (DF) das avaliações, que variou entre o D18 e D20 do ciclo estral. As outras determinações foram realizadas a cada dois dias entre o D0 e o DF.

2.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguidas de comparações entre as médias, pelo teste de Student - Newman - Keuls (GraphPad.Instat 2009). Quando os dados não foram considerados dentro da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os valores foram transformados em logaritmo natural. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão da média. Valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. Resultados e discussão

O %VF foi semelhante entre os grupos até mesmo no D8, apesar do GT ter apresentado 13 pontos percentuais a mais de área colorida (GC - 17,27%; GT - 30,27%) o que representa um aumento de 76,47% (Fig. 2). Porém, o GT apresentou diferenças entre os momentos dentro do grupo, com o %VF no D8 mostrando-se superior à do D0 e D6 e o %VF do D12 superior à do D0 ($P < 0,05$). Estes dados demonstram que a manutenção de níveis elevados de r-bST levaram a uma aceleração na angiogênese vascular do folículo, porém esta foi igualada posteriormente. Pois a avaliação foi realizada em relação ao tamanho folicular, que manteve-se em crescimento e necessitando de contínuo aumento da rede vascular formada em torno de sua parede, necessária para garantir seu desenvolvimento além da fase pré-antral [12].

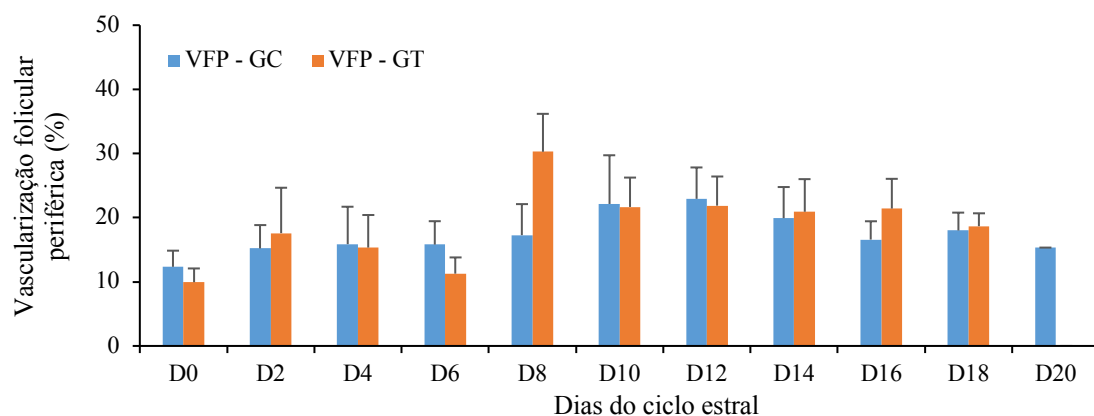


Figura12 - Vascularização folicular periférica média ($\pm$ erro padrão) no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (GT) ou não (GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (♦).

* Representa diferença significativa entre momentos no mesmo grupo.

A manutenção do %VF nos demais momentos demonstra que a rede vascular manteve seu crescimento junto com o aumento do folículo dominante, sendo um crescimento proporcional a área total do folículo, exemplificado na Figura 3. O folículo atingiu a máxima rede vascular junto com o máximo diâmetro, período próximo de 24 horas antes da ovulação, como descrito também por Gastal [13] e corroborando com pesquisas que avaliaram a vascularização folicular em equinos [14,15] e bovinos [16].

O acompanhamento da vascularização com relação ao tamanho do folículo está relacionada com as crescentes concentrações de fatores angiogênicos nos folículos dominantes [9] os quais, de fato, aumentam com o crescimento de seu diâmetro [17], garantindo um progressivo crescimento necessário principalmente em ambiente de menores concentrações de FSH [18]. Dentre os

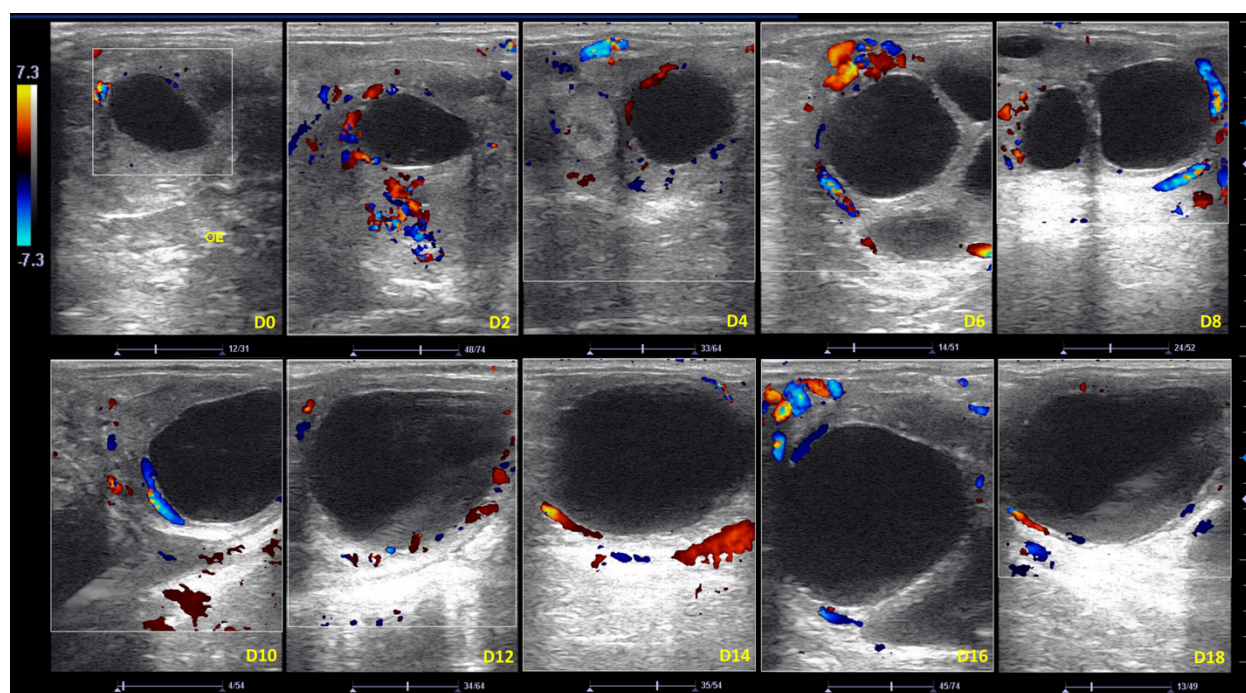


Figura13 - Exemplos de imagens ultrassonográfica em modo Doppler colorido demonstrando a vascularização folicular periférica do maior folículo em diferentes momentos do ciclo estral de uma égua tratada com r-bST.

responsáveis pela neovascularização se destaca o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) produzido em resposta ao FSH nas células da granulosa, que são avasculares, proporcionando o acúmulo do VEGF no antro folicular e garantindo constante difusão para os capilares, criando assim um gradiente angiogênico [7].

A ação do IGF-I como regulador das concentrações de VEGF já foram demonstradas. A introdução de IGF-I no antro provocou elevação na concentração de VEGF do fluido folicular, enquanto a redução da concentração foi obtida ao introduzir um quelante do IGF-I no fluido folicular [9]. Explicando a aceleração no crescimento vascular do GT no D8, visto que os animais tratados com r-bST apresentaram elevações expressivas nas concentrações de IGF-I no D6 e D14 (Fig. 5).

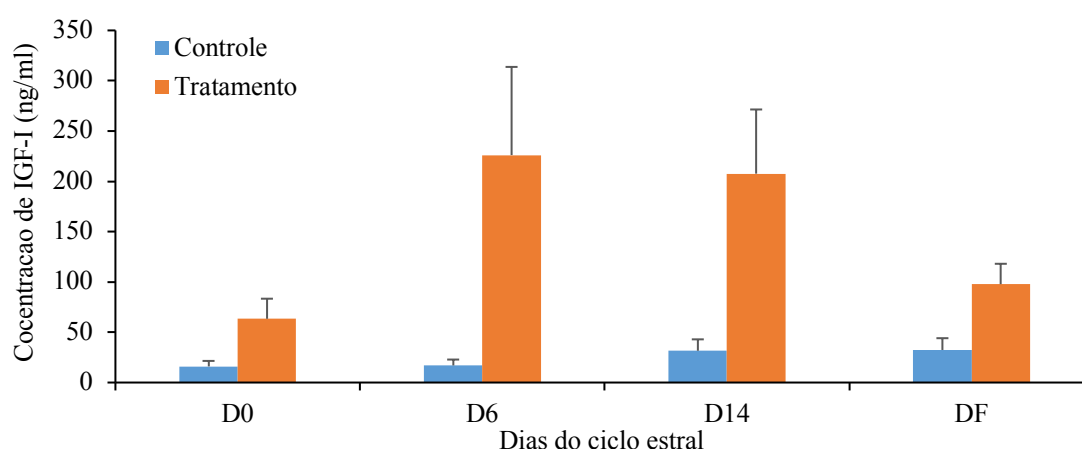


Figura14 - Níveis plasmáticos médios ($\pm$ erro padrão) do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina Tipo 1 (IGF-I) no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (grupo tratamento - GT) ou não (grupo controle - GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼).

*Representa diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

A elevação da concentração de IGF-I era esperada pois a utilização do r-bST já foi demonstrada como biologicamente ativo em equinos [19,20]. Tanto a r-bST quanto o hormônio do crescimento (GH) endógeno, tem mecanismo de ação direto e indireto, sendo a forma indireta através da regulação da síntese dos IGFs e de suas proteínas transportadoras plasmáticas (IGFBP, insulin-like growth factor binding proteins) [10].

Estudos já relataram 106% de aumento na concentração de IGF-I em equinos após tratamento com 250 mg de r-bST, chegando a níveis superiores a 200% com a elevação da dose, já após três dias [19] ou tendo início em apenas 24 horas [20]. Na presente pesquisa os níveis chegaram a 1332% de aumento no D6 e 657% no D14, porém com valores absolutos semelhantes aos basais (200 ng/ml) encontrados em equinos adultos atletas [19], potros em crescimento [21] e éguas adultas [20], avaliados através das técnicas de radioimunoensaio.

Os mecanismos regulatórios do metabolismo do GH explicam a diferença encontrada nas

concentrações, visto que o exercício físico é considerado um importante estimulador da síntese de GH [22]. Concentrações máximas fisiológicas também são encontradas nas fases de crescimento e sofrem influência da condição nutricional [10,21]. Desta forma, como os animais utilizados eram adultos e criados unicamente em pastejo, sem nenhuma influência de exercício forçado, as concentrações basais obtidas de IGF-I foram menores permitindo uma maior ação da r-bST, demonstrando ser maior a ação de um feedback positivo que ainda não esteja sendo estimulado. Assim, a grande elevação proporcional da concentração pode ser devido aos menores níveis basais.

Outros efeitos promovidos pelo GH, incluem a redução no catabolismo proteico e da oxidação de glicose, concomitantemente ao aumento da mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo, para gerar energia [23]. A administração de r-bST elevou a mobilização do NEFA em 24 horas da sua aplicação sendo significativa apenas após a segunda (Fig. 4).

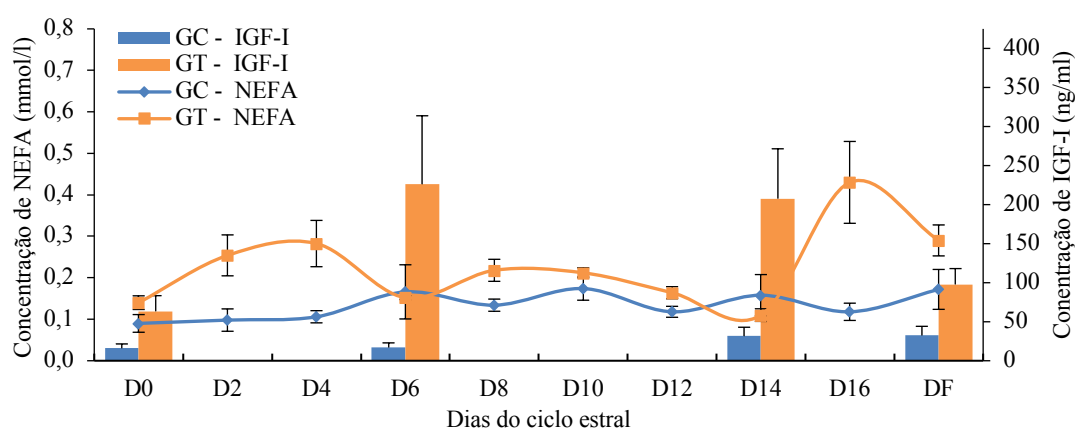


Figura15 - Concentração média ($\pm$ erro padrão) de NEFA e do IGF-1 no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (grupo tratamento - GT) ou não (grupo controle - GC) com r-bST. Aplicação do r-bST (▼)
 *▽Representa diferenças significativas entre grupos para IGF-I e NEFA, respectivamente ($p < 0,05$).

Um provável efeito acumulativo do r-bST sobre o metabolismo dos ácidos graxos ocorreu, o qual não existiu para o IGF-I, que já estava com concentração similar ao GC poucos dias após a segunda administração do r-bST. Diante disto, e da observação de que quando o IGF-I estava elevado não teve alterações nas concentrações de NEFA, pode-se inferir que a resposta do NEFA é uma ação direta da r-bST, mediada pela cascata de sinalizações intracelulares desencadeadas pela sua ligação a receptores na membrana plasmática, corroborando com pesquisa em humanos [10].

As concentrações do NEFA voltaram aos valores basais antes da metabolização completo do r-bST. Como os animais não estavam em balanço energético negativo, houve a manutenção da homeostase da reserva lipídica, assim como sugerido para vacas em lactação que apresentaram 10 dias de aumento das concentrações de NEFA após tratamento com r-bST, retornando a valores normais mesmo com os níveis de GH e IGF-I ainda elevados [24].

Com relação aos níveis glicêmicos e proteicos, não foram observadas diferenças entre grupos ou momentos (Fig. 5). Podia-se esperar que a r-bST apresentasse ação antagonista direta ao efeito da insulina [25], assim como ação anabólica proteica [26] como o GH endógeno. Entretanto os resultados sugerem que a utilização em indivíduos com baixas concentrações de IGF-I, como as encontradas, não equivale as ações em indivíduos que apresentam níveis basais maiores, como os encontrados na literatura [19,20,24], assim como descrito em comparação de tratamentos do GH em pessoas saudáveis e deficientes [27].

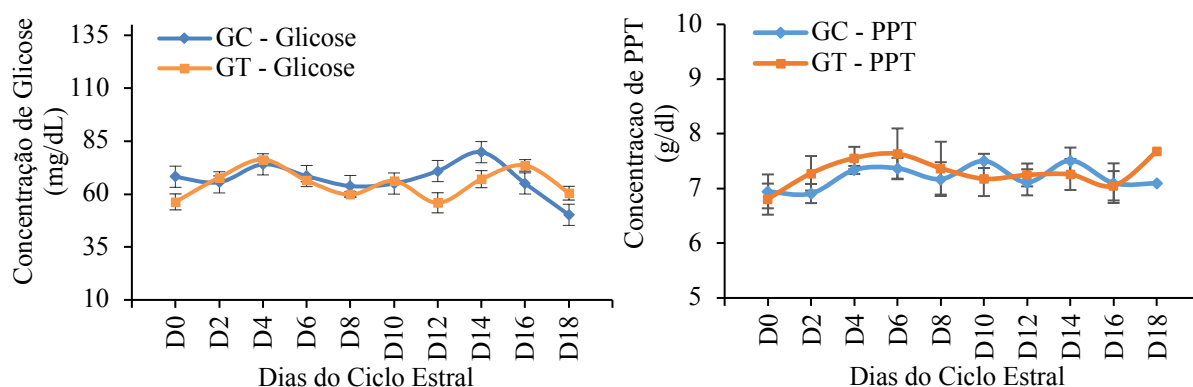


Figura16 - Concentrações plasmática médias ($\pm$ erro padrão) de Glicose e Proteína Plasmática Total (PPT) no decorrer do ciclo estral de éguas tratadas (grupo tratamento - GT) ou não (grupo controle - GC) com r-bST. Aplicação do r-bST ($\blacktriangledown$).

De toda forma, as variáveis fisiológicas estudadas mantiveram-se dentro dos valores fisiológicos [28] o que é desejado. Pois um dos principais fatores da contraindicação da utilização do GH (representando nessa pesquisa pela r-bST) é seu efeito diabetogênico, constituído pela complexidade de alterações metabólicas que envolvem variáveis lipídicas, glicêmicas e proteicas, sendo fator de risco para diversas complicações cardiovasculares [29].

Por fim foi observado leve reação inflamatória 24 horas após aplicação da r-bST, apresentando-se de aspecto nodular, indolor, de involução progressiva e estando presente até o final do intervalo interovulatório. O mesmo foi observado em outros estudos que comparam a somatotropina bovina e suína, na espécie equina, relatando processo inflamatório doloroso no local da aplicação, com reação grave para o produto de origem suína e leve para a bovina [19,20]. Embora não tenham sido identificados prejuízos para saúde do animal, mais estudos são necessários para avaliar sua utilização por maiores períodos.

4. Conclusões

A r-bST favorece a vascularização folicular periférica sem prejuízos a manutenção da homeostase das variáveis metabólicas estudadas. Sendo possível utilizá-la em éguas para estudar suas interferências na fisiologia reprodutiva.

5. Referência bibliográficas

- [1] Cushman RA, Hedgpeth VS, Echternkamp SE, Britt JH. Evaluation of numbers of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. *J Anim Sci* 2000;78:1564–7.
- [2] Cochran RA, Leonardi-Cattolica AA, Sullivan MR, Kincaid LA, Leise BS, Thompson DL, et al. The effects of equine somatotropin (eST) on follicular development and circulating plasma hormone profiles in cyclic mares treated during different stages of the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol* 1999;16:57–67. doi:10.1016/S0739-7240(98)00046-0.
- [3] Zulu VC, Nakao T, Sawamukai Y. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *J Vet Med Sci* 2002;64:657–65. doi:10.1292/jvms.64.657.
- [4] Alves KA, Alves BG, Gastal GDA, De Tarso SGS, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. *PLoS One* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0149693.
- [5] Squires EL, McCue PM. Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci* 2007;99:1–8. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.04.054.
- [6] Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 2009;138:869–81. doi:10.1530/REP-09-0283.
- [7] Ayres H, Mingoti G. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Rev Bras Reprod Anim* 2012;36:174–80.
- [8] Norman AW, Litwack G. Anterior Pituitary Hormones. *Horm.* 2ª Ed., 1997, p. 133–68. doi:10.1016/B978-0-12-521441-4.50006-7.
- [9] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Checure CM, Beg MA. Dose-Response Study of Intrafollicular Injection of Insulin-Like Growth Factor-I on Follicular Fluid Factors and Follicle Dominance in Mares¹. *Biol Reprod* 2004;70:1063–9. doi:10.1095/biolreprod.103.024844.
- [10] Cruzat VF, Donato Júnior J, Tirapegui J, Schneider CD. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. *Rev Bras Ciências Farm* 2008;44:549–62. doi:10.1590/S1516-93322008000400003.
- [11] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: book 4, color-Doppler ultrasonography. Cross Plains, WI Equiservices Publ 2007:1–258.
- [12] Araújo VR, Duarte ABG, Bruno JB, Pinho Lopes CA, De Figueiredo JR. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote* 2013;21:295–304. doi:10.1017/S0967199411000578.
- [13] Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 2006;131:699–709. doi:10.1530/rep.1.01011.
- [14] Acosta TJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Differential Blood Flow Changes Between the Future Dominant and Subordinate Follicles Precede Diameter Changes During Follicle Selection in Mares¹. *Biol Reprod* 2004;71:502–7. doi:10.1095/biolreprod.104.027896.

- [15] Silva LA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Anim Reprod* 2006;3:339–46.
- [16] Siddiqui MAR, Almamun M, Ginther OJ. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim Reprod Sci* 2009;113:287–92. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.07.008.
- [17] Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 2000;167:371–82. doi:10.1002/mrd.10386.
- [18] Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003;78:239–57. doi:10.1016/S0378-4320(03)00093-9.
- [19] De Kock SS, Rodgers JP, Swanepoel BC, Guthrie AJ. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: Effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. *J Endocrinol* 2001;171:163–71. doi:10.1677/joe.0.1710163.
- [20] Buonomo FC, Ruffin DS, Brendemeuhl JP, Veenhuizen JJ, Sartin JL. The Effects of Bovine Somatotropin (bST) and Porcine Somatotropin (pST) on Growth Factor and Metabolic Variables in Horses. *J Anim Sci* 1996;74:886–94.
- [21] Baccarin RYA, Pereira MA, Roncati N V., Furtado P V., Oliveira CA, Hagen SCF. Identificação dos níveis sêricos do fator de crescimento tipo insulina 1 em potros com osteocondrose. *Pesqui Vet Bras* 2011;31:677–82. doi:10.1590/S0100-736X2011000800008.
- [22] Gomes MDR, Pires ISDO, Castro IA De, Tirapegui J. Effect of moderate physical exercise on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-1 in adult rats. *Nutr Res* 2004;24:555–64. doi:10.1016/j.nutres.2004.04.003.
- [23] Swenson MJ, Reece WO. *Dukes Fisiologia dos animais domésticos*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1996:856.
- [24] Hodate K, Ozawa A, Johke T. Effect of a Prolonged Release Formulation of Recombinant Bovine Somatotropin on Plasma Concentrations of Hormones and Metabolites, and Milk Production in Dairy Cows. *Endocrinol Jpn* 1991;38:527–32. doi:10.1507/endocrj1954.38.527.
- [25] Ghanaat F, Tayek JA. Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers. *Metabolism* 2005;54:604–9. doi:10.1016/j.metabol.2004.12.003.
- [26] Fryburg DA, Barrett EJ. Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. *Metabolism* 1993;42:1223–7.
- [27] Rennie MJ. Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the Emperor's new clothes? *Br J Sports Med* 2003;37:100–5.
- [28] González FHD, Scheffer JFS. Perfil Sangüíneo: Ferramenta De Análise Clínica, Metabólica E Nutricional. I Simpósio Patol Clínica Veterinária Da Região Sul Do Bras 2003:73–88.
- [29] Borst SE. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age Ageing* 2004;33:548–55. doi:10.1093/ageing/afh201.

6. Anexos



THERIOGENOLOGY

An International Journal of Animal Reproduction

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.3



ISSN: 0093-691X

DESCRIPTION

Theriogenology provides an international forum for researchers, clinicians, and industry professionals in **animal reproductive biology**. This acclaimed journal publishes articles on a wide range of topics in **reproductive and developmental biology**, of domestic mammal, avian, and aquatic species as well as wild species which are the object of veterinary care in research or conservation programs.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Individuals involved in animal reproduction biology.

IMPACT FACTOR

2016: 1.986 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Focus on: Veterinary Science and Medicine

AGRICOLA

CAB Abstracts

Global Health (Index Veterinarius, Veterinary Bulletin) MEDLINE®

BIOSIS

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Elsevier BIOBASE

Science Citation Index

Derwent Biotechnology

Abstracts Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

F. Gandolfi, DVM, Istituto di Anatomia degli Animali Domestici, Milan, Italy

Associate Editors

L. Brito, Madison, WI, USA

D.C. Sharp, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Editorial Board

C. Aurich, Veterinarmedizinische Universität Wien, Vienna, Austria

M.R. Bakst, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, USA

I. Barrier Battut, Ecole Nationale Professionnelle des Haras, Exmes, France

S.J. Bedford-Guaus, Center for Regenerative Medicine in Barcelona, Barcelona, Spain

S. Bilodeau-Goeseels, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Lethbridge, Alberta, Canada

R. Boni, University of Basilicata, Potenza, Italy

P. Comizzoli, Smithsonian's National Zoological Park, Washington, District of Columbia, USA

M-A. Driancourt, Astek Consult, Chateaufort sur Sarthe, France

B. Gadella, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

F.C. Gwazdauskas, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, Virginia, USA

K. Hinrichs, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

S. Hochi, Shinshu University, Ueda, Japan

R. Kasimanickam, Washington State University, Washington, USA

K. Kikuchi, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan

H. Men, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA

S. Nagy, Pannon Egyetem, Veszprém, Hungary

H. Niemann, Institute of Farm Animal Genetics, Neustadt, Germany

C.E. Pope, Audubon Center for Research of Endangered Species, New Orleans, Louisiana, USA

T. Rijsselaere, Universiteit Gent, Merelbeke, Belgium

N. Songsasen, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia, USA

M. Thibier, Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, France

J.C. Thundathil, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

M. Yeste, Universitat de Girona, Girona, Spain

GUIDE FOR AUTHORS

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal

of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and

avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option. Use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication,

etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your

manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oögonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else,

including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

theriochart.jpgchart

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μL - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year

Routes of treatment

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding

[preparation of your manuscript.](#)*Additional information*

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes

precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



CEUA - UFRPE
Aprovado em
06/04/2017
Validade
05/02/2019

Comissão de ética no uso de animais – CEUA- H- 03

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	07/ 2017
Número do processo	23082/017818/2016-70
Data de emissão da licença	06 de fevereiro de 2017
Título do Projeto	Influência da somatotropina recombinante bovina em padrões reprodutivos de éguas submetidas a transferência de embrião
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Anísio Francisco Soares
Colaboradores	Claúdio Coutinho Bartolomeu; Aurea Wischral; Luiz Eduardo Pereira de Andrade Ferreira; Luis Artur Cordeiro Costa
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Equideo: 10 Fêmeas. Mestiça Idade: 3 anos Total: 10 animais

Profa.. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Profª Drª Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA