

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NO VERÃO PODE EVITAR O
ANESTRO ESTACIONAL NA ÉGUA?

Autor: Fabíola Freire Albrecht de David

Orientador: Prof.Dr. Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NO VERÃO PODE EVITAR O
ANESTRO ESTACIONAL NA ÉGUA?

Autor: Fabíola Freire Albrecht de David

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof.Dr. Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

FABÍOLA FREIRE ALBRECHT DE DAVID

FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NO VERÃO PODE EVITAR ANESTRO
ESTACIONAL NA ÉGUA?

Aprovado em:

APROVADO POR:

Prof.Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador e presidente da comissão

Prof.Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

Prof.Dr. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Membro da Comissão

Prof.Dr. Ricardo Macedo Gregory
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Rodrigo, pelo carinho e confiança. Seu desprendimento ao dividir conhecimentos foi uma grande lição.

Aos meus queridos pais e irmão; sem vocês, as realizações de meus sonhos não seriam completas.

À minha querida cunhada Beta, pelo amor e ajuda inestimáveis. Sua dedicação e seriedade farão muita diferença na profissão que escolheu!

Ao meu marido, pelo apoio e compreensão incondicionais. Que paciência!

Aos amigos e parceiros de pesquisas que fiz no Reprolab, e que tanto me ajudaram.

Aos animais, grandes companheiros e colaboradores em meu contínuo aprendizado da Medicina Veterinária.

*“Das quatro estações, nenhuma dura para sempre; dos dias, alguns são longos
e alguns são curtos.”*

Sun Tzu

RESUMO
FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NO VERÃO PODE EVITAR O ANESTRO
ESTACIONAL NA ÉGUA?

Dissertação de Mestrado
Autor: Fabíola Freire Albrecht de David
Orientador: Rodrigo Costa Mattos

A égua é classificada como poliéstrica estacional, o que implica suspensão da atividade reprodutiva cíclica usualmente a partir da metade do outono, na maioria destes animais. Esta resposta é devida à diminuição gradual no fotoperíodo natural, considerado como fator primário na sazonalidade reprodutiva. A ausência de ciclos ovulatórios durante os meses de inverno e a inconsistência da fase de ressurgência atingem não só os criadores de raças que procuram o nascimento de potros mais cedo na temporada reprodutiva oficial, mas principalmente aqueles que empregam a técnica da transferência de embriões. A obtenção de ovulações ao longo do ano possibilitaria a utilização reprodutiva ótima de éguas doadoras e receptoras. A fim de verificar a ciclicidade reprodutiva durante outono e inverno, dezessete éguas em uma propriedade do sul do Brasil foram distribuídas ao acaso em dois grupos. De quinze de Janeiro a doze de Setembro de 2009, os animais do grupo Tratamento foram submetidos a fotoperíodo diário fixo de 15 horas. Duas vezes por semana, o trato reprodutivo de todos os animais foi avaliado por ultrassonografia transretal, para verificação da presença de folículos dominantes e corpo lúteo. Dosagem de progesterona foi utilizada para confirmação de anestro. Oitenta e cinco por cento dos animais submetidos ao tratamento mantiveram ciclicidade reprodutiva, enquanto oitenta por cento dos animais controle entraram em anestro de inverno. Houve aumento na duração dos ciclos, devido a fatores endógenos, nutricionais e ambientais. Os resultados demonstram que o tratamento foi efetivo para obtenção de ciclos ovulatórios durante os meses de inverno.

Palavras-chave: Égua, sazonalidade, fotoperíodo, inverno

ABSTRACT

COULD ARTIFICIAL PHOTOPERIOD IN SUMMER AVOID SEASONAL ANESTRUS IN THE MARE?

Master's Dissertation

Author: Fabíola Freire Albrecht de David

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

The mare is classified as a seasonal polyestric, which means the suspension of reproductive activity usually from the first half of autumn, most of the mares. This is a response to the gradual decline in the natural photoperiod, considered as a primary factor of reproductive seasonality. The absence of ovulatory cycles during winter months and the inconsistency of the resurging phase strike both breeders who aim foals' birth early in the official breeding season and those who employ the embryo transfer technique. Achieving ovulation throughout the year would enable the optimal reproductive use of donors and recipient mares. In order to check autumn and winter cyclicity, seventeen mares on a farm in southern Brazil were randomly assigned into two groups. From January 15th to September 12th 2009, animals in Treatment group were subjected to a fixed 15 hours daily photoperiod. Twice a week, the reproductive tract of all animals was examined by transrectal ultrasonography, searching for dominant follicles and presence of corpora lutea. Progesterone levels were used to confirm winter anestrus. 85% mares undergoing treatment maintained reproductive activity, while 80% of Control mares showed winter anestrus. There were changes in length of cycles, due to endogenous, nutritional and environmental factors. Results demonstrate that the treatment was effective to attain ovulatory cycles during winter months.

Key-words: Mare, seasonality, photoperiod, winter

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Duração média dos ciclos	26
FIGURA 2 – Condição corporal média	27
FIGURA 3 – Duração média dos ciclos e condição corporal média	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número médio de ovulações, duração média do ciclo, média de dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação; entre o início do tratamento e anestro e respectivas medianas	24
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofinas

N - Norte

FSH – Hormônio folículo-estimulante

LH – Hormônio luteinizante

S – Sul

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

O - Oeste

MHz – Mega Hertz

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

° C – graus centígrados

ml- mililitro

ng - nanograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Seleção dos animais	20
3.2 Aplicação do tratamento	20
3.3 Exames	21
3.4 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	31
APÊNDICE A – Média mensal de horas de luz	32
APÊNDICE B – Concentrações plasmáticas médias de progesterona para os animais que entraram em anestro	33
APÊNDICE C – Número de ovulações, média da duração do ciclo, dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação, e dias decorridos entre o início do tratamento e o anestro no grupo Controle	34
APÊNDICE D – Número de ovulações, média da duração do ciclo, dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação, e dias decorridos entre o início do tratamento e o anestro no grupo Tratamento	35
APÊNDICE E - Número de ovulações, média da duração do ciclo e duração do maior ciclo nas éguas cíclicas do grupo Controle	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo da égua não é constante ao longo do ano. Devido a fatores sazonais e evolutivos, a estação reprodutiva fisiológica na maioria destes animais inicia após um anestro de inverno, com uma fase transicional de ressurgência, para então apresentar comportamento de estro acompanhado de ovulação periodicamente, a partir do final da primavera até o fim do verão (GINTHER et al., 2004). Posteriormente, uma fase transicional de outono aparece, levando novamente ao anestro de inverno.

A sazonalidade reprodutiva da égua tem importantes conseqüências para a criação comercial eqüina. Criadores que utilizam a técnica da transferência de embriões precisam adequar o manejo do período reprodutivo de doadoras ao calendário esportivo destes animais. Além disso, criadores pertencentes às associações de raças que adotam a idade hípica como critério de nivelamento de potros nascidos na mesma temporada, procuram acasalar as éguas o mais cedo possível, para obter vantagem de idade sobre os produtos nascidos mais tarde (LANGLOIS e BLOUIN, 1996). A obtenção de ovulações durante todo o ano poderia representar uma utilização ótima de éguas reprodutoras, especialmente aquelas doadoras e receptoras de embriões.

A pesquisa sobre a reprodução em éguas vem buscando melhor entender e manipular os mecanismos que determinam sua sazonalidade reprodutiva; para antecipação da primeira ovulação do ano, o método mais prático é a aplicação de fotoperíodo artificial, simulando dias longos (GINTHER, 1992).

Este estudo objetivou verificar a ciclicidade reprodutiva de éguas através do aumento artificial do fotoperíodo a partir da primeira metade do verão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fotoperiodismo é a habilidade de organismos em acessar e usar a quantidade de informação luminosa percebida durante o dia como dado antecipatório aos eventos sazonais do ambiente onde vivem (BRADSHAW e HOLZAPFEL, 2007). A duração do dia, em horas de luz, constitui um calendário altamente confiável utilizado por várias espécies em preparação à próxima estação. Ainda, ao contrário de temperatura e precipitação pluviométrica, o comprimento do fotoperíodo em um dado local no planeta é o mesmo tanto hoje quanto no mesmo dia dos próximos anos (BRADSHAW e HOLZAPFEL, 2007). Na maior parte das espécies, é o fator primário na determinação de atividades tão diversas quanto migração, troca de pelagem e reprodução, visando a ótima adequação dos indivíduos ao ambiente. Isto foi bem definido por Hofman (2004): “A informação fotoperiódica tem sido demonstrada como sendo o mais poderoso sincronizador de funções estacionais na maior parte das espécies.”

As respostas à duração do dia desenvolvem-se como uma consequência de interações entre o ciclo ambiental claro-escuro e o funcionamento de um “relógio” interno circadiano, que prediz a alternância de fases de luz e escuridão. O ritmo circadiano fotoperiódico está baseado na organização estrutural do chamado eixo fotoperiódico, um conjunto de elementos neurais e endócrinos interconectados que governam as respostas fotoperiódicas (HAZLERIGG e WAGNER, 2006). Este sistema fotoneuroendócrino (MARONDE e STEHLE, 2007) funciona a partir da captação da informação luminosa na retina e conduzida pelo nervo óptico ao núcleo hipotalâmico supraquiasmático. Por sua vez, este controla a secreção noturna de melatonina, um neuro-hormônio que é produzido e secretado durante a noite pela glândula pineal. Este sinal, através de efeitos na função neuroendócrina, controla as respostas fotoperiódicas sazonais. Porém, o sítio exato de ação da melatonina não foi estudado em equinos (NAGY et al., 2000). Apesar do papel da melatonina na sazonalidade reprodutiva não ser totalmente conhecido, é aceito que durante as horas escuras, a secreção de melatonina é estimulada pela norepinefrina secretada pelos neurônios sinápticos pós-ganglionares do gânglio cervical superior (NAGY et al., 2000). Em cavalos, isto foi confirmado através da aplicação de um agonista alfa-adrenérgico, que estimulou a secreção de melatonina (SHARP et al., 1980).

Melatonina tem sido objeto de muitos estudos em cavalos, por pelo menos duas décadas, e há forte evidência de que seja um dos elementos chave no controle da reprodução sazonal encontrada nos equinos (NAGY et al., 2000). Aparentemente, o sinal hormonal desencadeado pela melatonina parece iniciar uma cadeia de eventos que afetam direta e indiretamente o hipotálamo e a produção de GnRH.

Em éguas, concentrações elevadas de melatonina estão fortemente associadas com a fase escura; a secreção aumenta ao início da fase escura e cai rapidamente ao final da noite (NAGY et al., 2000). Entretanto, quando o padrão secretório de melatonina sérica foi analisado durante um ano em éguas no Missouri (cerca de 36° N - 41° N), mantidas em condições naturais, Diekman et al. (2002) concluíram que neste experimento não houve relação entre as concentrações séricas de melatonina e o anestro sazonal na égua, e que os meios pelos quais o fotoperíodo é usado como sinalizador para regulação da atividade cíclica através das estações permanece não claro.

Analisando peso e gordura corporal e níveis circulantes de leptina, um produto dos adipócitos (Kentucky: 38°N), Fitzgerald e McManus (2000) demonstraram que a resposta reprodutiva à diminuição no fotoperíodo ou a um sinal inibitório de melatonina é modificada pela disponibilidade de energia, que pode ser sinalizada ao eixo hipotalâmico-hipofisário via mudança na concentração circulante de leptina.

O início e duração dos períodos de atividade e repouso reprodutivos estão na dependência de vários fatores sazonais, ambientais, orgânicos e individuais, sendo o comprimento do fotoperíodo diário admitido como fator primário de sazonalidade reprodutiva na égua (SHARP, 1980; GINTHER, 1992).

A função reprodutiva de fêmeas poliéstricas estacionais desenvolve-se em um determinado período do ano, após o qual usualmente há uma fase de inatividade reprodutiva com baixa atividade ovariana. A égua, uma poliéstrica estacional, tem um padrão reprodutivo que determina uma incidência mínima ou nula de ovulações durante o inverno, aumentando gradualmente durante a primavera, maximizando a atividade no verão e novamente decrescendo no outono (GINTHER et al., 2004c). Nos equinos, a circulação de melatonina a partir de determinado nível acaba por inibir a produção de GnRH no hipotálamo; a modulação da frequência e amplitude da liberação de GnRH pelo hipotálamo afeta a produção hipofisária das gonadotrofinas FSH e LH.

O reinício de sua estação reprodutiva coincide com a primavera, onde o fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de alimentos são maiores. Forjada sobre o

período gestacional de onze meses dos equinos, a estratégia de concepção no final da primavera assegura o nascimento de produtos em uma época ótima do ano para sua sobrevivência e desenvolvimento (GINTHER et al., 2004c). O nascimento de potros durante o outono exporia estes animais às exigências e escassez do inverno.

Os estudos sobre a sazonalidade reprodutiva equina tem sido feitos, em sua grande maioria, com dados obtidos a partir de zonas temperadas que começam nas latitudes 23° N e 23° S, aproximadamente, onde a diferença no comprimento entre o maior e menor dia é cerca de duas horas (GINTHER et al., 2006); Cerca de 20% das éguas apresentam um período anovulatório de inverno (GINTHER, 1974; DIEKMAN et al., 2002), mesmo em latitudes tão altas quanto 61° N (KOSKINEN et al., 1996, apud BOETA et al., 2006).

Um estudo feito no México (BOETA et al., 2006) mostrou que 38% das éguas apresentaram anestro verdadeiro durante os meses de inverno na latitude 19° N, e que a duração deste período anovulatório variou dramaticamente entre os indivíduos - de setenta a cento e noventa e seis dias; e, mesmo nestas éguas, houve exibição de comportamento estral (não acompanhado de ovulação) durante o mesmo período. Mesmo em latitudes tão baixas quanto 15° N – 22° N parece haver redução na atividade ovariana durante os meses de inverno, de acordo com estudo feito por Saltiel et al., em 1982. Neste trabalho, os pesquisadores encontraram atividade ovariana (corpos lúteos e grandes folículos), entre novembro e fevereiro, menor do que entre março e outubro.

Resumidamente, a fase anovulatória de inverno subdivide-se em três períodos (DONADEU e WATSON, 2007):

- Fase transicional de outono

Corresponde ao período inicial de declínio na atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, primariamente devido à diminuição no fotoperíodo. Comparando animais avaliados no último período ovulatório da temporada e na fase transicional, Nunes et al.(2002) verificaram que a ausência de diferença no diâmetro máximo do folículo dominante, demonstra que os folículos de algumas éguas podem crescer até níveis pré-ovulatórios, mas falham em ovular. Adicionalmente, níveis plasmáticos decrescentes de progesterona medidos durante os últimos diestros da estação ovulatória e início do outono, podem ser prenúncio de anestro iminente. No estudo de King et al.

(1988), os quatorze animais que demonstraram esta característica entraram em anestro de inverno; as restantes seis éguas mantiveram ciclicidade ao longo de todo o ano.

-Anestro profundo

O período de mais baixa atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, correspondendo aos meses de inverno. Tem sido chamado de fase inativa ou estação anovulatória (GINTHER, 1992). Ginther et al. (2003a) observaram que folículos maiores ou iguais a 28mm em diâmetro continuaram a se desenvolver após a última ovulação do ano em duas de seis éguas, enquanto que nas demais uma redução imediata para menos de 25mm em diâmetro ocorreu seguindo-se à última ovulação do ano, para então chegarem a uma média de 16mm durante os meses de inverno. Para Donadeu e Ginther (2002), seria mais adequada a terminologia fase anovulatória. Estudos de Donadeu e Ginther em 2003 identificaram estatisticamente tanto a emergência de ondas foliculares menores (com diâmetro folicular médio 16mm), como ondas de FSH durante a fase anovulatória central: A ablação de todos os folículos maiores de 5mm durante este período resultou em um pulso imediato de FSH e crescimento de uma onda folicular menor; o maior folículo alcançou uma média de 17mm de diâmetro.

Aparentemente, concentrações de LH são mínimas durante a estação anovulatória central, e aumentam gradativamente ao longo da estação ovulatória (FREEDMAN et al., 1979; SILVIA et al., 1986; DONADEU e GINTHER, 2003; GINTHER et al., 2004c; DONADEU e WATSON, 2007;).

A maneira como se apresenta a cessação estacional fisiológica da atividade reprodutiva em éguas foi descrita como ocorrendo de três maneiras distintas: após lise de corpo lúteo de duração prolongada (HUGHES et al., 1975; KING et al., 1993), após lise de corpo lúteo de duração normal (KING et al., 1993) ou após crescimento folicular seguido de atresia (HUGHES et al., 1975; KING et al., 1993)

-Fase transicional de primavera

Coincide com o aumento gradual natural do fotoperíodo diário e é uma fase de recrudescência do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, em que a égua pode exibir períodos variáveis de sinais comportamentais de estro sem efetivamente chegar à ovulação. O nível de crescimento folicular pode ser um tanto variável entre diferentes

animais e entre o início e o final do período (DONADEU e WATSON, 2007). Os níveis de determinados fatores presentes no fluido folicular são menores durante a estação anovulatória, quando comparados à estação ovulatória seguinte, sugerindo que o crescimento folicular na transição vernal está temporalmente associado com mudanças nos níveis foliculares de fatores como inibina, estradiol, androstenediona e progesterona (DONADEU, 2006).

Sabe-se que diversos outros fatores interagem com o efeito do fotoperíodo, e.g.: Estado nutricional, idade e temperaturas ambientais médias; o efeito de tais fatores, por sua vez, pode ser influenciado em algum grau por prolactina, catecolaminas, neurotransmissores, opióides endógenos, hormônios tireóideos e serotonina.

O efeito da disponibilidade de nutrientes e condição corporal desempenham um bem documentado papel modificador do efeito do comprimento do fotoperíodo na sazonalidade reprodutiva equina, relatado por vários autores (KUBIAK et al., 1987; STICKER et al., 1995a; STICKER et al., 1995b; CARNEVALE et al., 1996; GENTRY et al., 2002). Kubiak et al. (1987) demonstraram um menor intervalo para a primeira ovulação após a fase transicional, em éguas com baixo nível de gordura corporal que receberam uma dieta rica em energia; o menor intervalo ocorreu naquelas que apresentaram mais de 15% de gordura corporal, em relação às que apresentaram índice de gordura corporal menor de 15%. Em éguas alimentadas com uma dieta deficiente em energia ou proteína durante o inverno, Sticker et al. (1995) observaram secreção diminuída de IGF-1, um importante fator para o desenvolvimento folicular. O tempo até o primeiro estro acompanhado de ovulação foi menor em éguas que ganharam peso, comparativamente às que perderam peso (CARNEVALE et al., 1996). Confirmando a conclusão de Kubiak et al. (1987), éguas mais velhas (acima de 10 anos de idade) tendem a acumular mais adiposidade (consequentemente, maiores níveis circulantes de leptina) e maior peso corporal, o que explicaria sua propensão tanto para entrar em anestro de inverno mais tarde que éguas abaixo de dez anos de idade, quanto para exibir atividade reprodutiva constante durante o inverno (FITZGERALD; McMANUS, 2000). Segundo estes autores, a resposta reprodutiva a um decréscimo no fotoperíodo ou um sinal inibitório desencadeado pela secreção aumentada de melatonina é modificada pela disponibilidade de energia, traduzida para o eixo hipotalâmico-hipofisário através de uma mudança na concentração de leptina, um produto dos adipócitos.

Carnevale et al. (1996) concluíram que há um efeito estimulatório de disponibilidade de pastagem verde sobre o momento da primeira ovulação da temporada. Estudando o efeito da condição corporal produzida por restrição alimentar durante a transição outonal, Gentry et al. (2002) demonstraram menores níveis de IGF-1, leptina, progesterona e prolactina nas éguas mantidas com escore 3,0 – 3,5 (escala 1 a 9) do que naquelas com escore 7,5 – 85 (escala 1 a 9), e também um profundo período anovulatório sazonal. Quando comparado com o trabalho de Fitzgerald e McManus (2000), aquele experimento leva à conclusão de que os baixos níveis de leptina, e ingesta insuficiente e/ou inadequada de nutrientes, independem da idade da égua. E que, embora níveis baixos de leptina sejam consistentes com uma baixa condição corporal, éguas em boa condição corporal podem apresentar diferenças nos níveis do hormônio.

Temperatura ambiental é um dos fatores externos que pode exercer influência sobre o efeito sinalizador do fotoperíodo. Sob condições semelhantes de iluminação, nutrição e sistema de manejo, temperatura poderia desempenhar influência sobre o ritmo reprodutivo circannual (NAGY et al., 2000).

Dentre os diversos esforços desenvolvidos para antecipação da temporada reprodutiva, está a manipulação farmacológica através da aplicação de medicamentos e hormônios em determinados períodos, tais como prolactina, antagonistas dopaminérgicos e antagonistas opióides. A prolactina, um hormônio hipofisário, tem correlação direta com temperatura e comprimento do fotoperíodo (JOHNSON, 1986), e pode adiantar o início da estação ovulatória (THOMPSON et al., 1997). A secreção de prolactina seria favorecida pela aplicação de antagonistas dopaminérgicos (BESOGNET et al., 1996; MARI et al, 2009).

Opióides endógenos agem primariamente no sistema nervoso central e, via inibição de GnRH, regulam a liberação de LH. Em éguas experimentando anestro estacional, a administração de naloxone, um antagonista opióide, resulta em aumento imediato na secreção de LH (AURICH et al., 1996).

Foi sugerido que a cessação da atividade reprodutiva durante os meses típicos de anestro pode ser devida, em parte, ao decréscimo da atividade neuronal estimulatória.

Em todos os animais, o comprimento do dia é acessado dentro do cérebro e a transmissão do sinal fotoperiódico para os órgãos-alvo envolve, em algum momento, hormônios peptídeos através do caminho (BRADSHAW e HOLZAPFEL, 2007).

As estratégias iniciais para adiantar a primeira ovulação do ano, e assim obter produtos nascidos mais cedo no calendário hípico, inicialmente focaram-se na manipulação do fotoperíodo (SHARP e GINTHER, 1975).

Primeiramente relatado na década de 40 na Inglaterra (BURKHARDT, 1947), o aumento artificial do fotoperíodo demonstrou ser o método de maior sucesso para antecipação do processo de transição vernal nas éguas submetidas ao tratamento. Vários métodos de administração de luz artificial tem sido usados com sucesso, sendo o mais comum, aquele que proporciona quatorze a dezesseis horas de luz por dia durante todo o período de estimulação ou, alternativamente, fornecendo pequenos incrementos na luz artificial, procurando mimetizar as condições que ocorrem naturalmente: Usualmente adicionando trinta minutos de estímulo luminoso diário a intervalos semanais, até atingir quatorze a dezesseis horas diárias de luz total.

A atividade ovariana pode ser induzida em éguas sazonalmente anovulatórias, através da aplicação de um pulso de luz nove a dez horas após o início da escuridão (SCRABA e GINTHER, 1985). Palmer et al. (1982) determinaram que, mais importante do que as horas diárias totais de luz, é o estímulo luminoso nove horas e meia a dez horas e meia após o início da escuridão. Malinowski et al. (1985) demonstraram a existência de fase fotossensitiva oito a dez horas após o início da escuridão, através de diversos protocolos de aplicação de fotoperíodo artificial. Sharp (1993) sugeriu que os melhores resultados seriam obtidos quando a luz suplementar fosse adicionada ou ao final do período de luz natural do dia, ou no começo e final do período natural de luz diária, ao invés de adicionada somente no começo do dia.

Tradicionalmente, a fotoestimulação deve ser iniciada sessenta dias antes do início da temporada oficial, sendo atingida a ciclicidade em cerca de setenta dias após o início do tratamento (GUILLAUME et al., 1996).

Tanto reprodutores de dia longo, quanto de dia curto, podem experimentar um período de fotorrefratariedade (ausência de responsividade ao comprimento do fotoperíodo diário), que pode interferir com o ritmo circanual; reprodutores de dia longo cessam a reprodução tanto por efeito da ação de dias curtos, quanto pela ação de dias longos, estes mesmos induzindo a um estado de fotorrefratariedade seguido de regressão gonadal (BRADSHAW e HOZAPFEL, 2007). Palmer e Guillaume (1992) evitaram o desenvolvimento de fotorrefratariedade aumentando ou diminuindo o comprimento do fotoperíodo diário a intervalos regulares.

Dois experimentos avaliaram a aplicação de fotoperíodo estimulante por longos períodos. No primeiro estudo (KOOISTRA e GINTHER, 1975), um grupo de éguas foi submetido a fotoperíodo diário de quinze horas e vinte e três minutos, começando no solstício de verão e estendendo-se por oito meses. Setenta e um por cento das éguas tratadas desenvolveu uma fase anovulatória no inverno, ainda que significativamente mais tarde do que os animais controle (expostos a condições naturais).

Em um segundo experimento (BISOL et al., 2007), animais foram mantidos em fotoperíodo artificial de nove horas de escuridão, iniciando dois meses após o solstício de verão. Neste estudo, todas as éguas tratadas e todas as éguas controle acabaram por ingressar em uma fase anovulatória ainda durante o outono. Não houve diferença entre os dois grupos quanto ao tempo decorrido entre o início do tratamento e a verificação do anestro. Os autores concluíram que a diferença de luminosidade entre o solstício de verão e o início do tratamento (mais de uma hora de diferença) pode ter influenciado negativamente o resultado, possivelmente porque uma transição irreversível para o anestro já estivesse sido estabelecida; ainda, foram verificados déficit pluviométrico e queda na qualidade e quantidade de pastagens durante o período do experimento, que potencialmente interferiram na resposta ao tratamento.

Condições artificialmente impostas podem reproduzir efeitos de uma determinada época. Assim, é possível que o aumento artificial e constante do fotoperíodo em uma data não muito distante do solstício de verão, signifique continuidade da atividade reprodutiva nas éguas, durante os meses de inverno (SHARP e GINTHER, 1975).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos Animais

Dezessete éguas com idade entre quatorze e vinte e dois anos, com adequada saúde geral e condição corporal variando de três a quatro (escala de 1 a 5), foram utilizadas. Todas as éguas foram acompanhadas por palpação e ultrassonografia transretal duas vezes por semana, durante os meses de novembro e dezembro, para verificar a ciclicidade e a saúde reprodutiva. Foram utilizadas éguas cíclicas. O experimento foi realizado em uma propriedade em Alegrete, Rio Grande do Sul, localizada geograficamente aos 29°40'S e 56°16'O. Durante o período experimental (janeiro a setembro de 2009), o índice de pluviosidade total foi de 777,6 mm, correspondente a 50,99% da precipitação anual média para a região segundo o INMET. A temperatura média neste período foi de 17° C.

3.2 Aplicação do Tratamento

As éguas foram distribuídas ao acaso em dois grupos. A partir de quinze de janeiro, a doze de setembro de 2009, as sete integrantes do grupo Tratamento eram retiradas do piquete ao final da tarde e submetidas à aplicação de luz mista à razão de dez Watts por metro quadrado de cocheira, obtendo-se um período de escuridão de nove horas. As éguas controles eram alojadas em um espaço distante, de maneira a não receberem influência do tratamento. Durante o período noturno, apenas água era oferecida a todos os animais.

No solstício de verão de 2008 (vinte e um de dezembro), as horas de luz foram de 14 horas e 5 minutos, ocorrendo o nascimento do sol às 5h41min e o ocaso, às 19h46min. Na data do início do experimento (quinze de janeiro de 2009) o nascimento do sol ocorreu às 5h59min e o ocaso, às 19h50min, totalizando 13 horas e 51 minutos de luz. No equinócio de outono houve um período de luz de 12 horas e 9 minutos; no solstício de inverno (vinte e um de junho de 2009), 10 horas e 16 minutos. Considera-se o instante do nascimento e ocaso do sol como o momento em que o limbo superior do sol cruza o horizonte do observador ao nível do mar. A média mensal das horas de luz na propriedade para o período experimental, de acordo com o Observatório Nacional, pode ser observada no Apêndice A.

3.3 Exames

Duas vezes por semana, todos os animais do experimento eram submetidos a exame transretal e avaliação ultrassonográfica do útero e ovários (sonda endorretal linear 5MHz, ecógrafo ultrassônico WED-9618, Shenzhen). Grau de contratilidade uterina à palpação, ecotextura uterina e medidas dos ovários e cornos uterinos eram anotados em fichas individuais para cada égua. Nestas fichas, todos os folículos e corpos lúteos, quando presentes, eram representados em milímetros, em duas dimensões, e as áreas dos corpos lúteos representadas em milímetros quadrados.

Nos mesmos dias dos exames retais, uma amostra de sangue de cada animal era coletada e centrifugada. O plasma era colhido e armazenado em tubos criogênicos estéreis a -18°C , para posterior mensuração dos níveis de progesterona. Foram utilizados tubos evacuados para coleta de sangue com EDTA (Becton, Dickinson Vacutainer – Minas Gerais, Brasil) e tubos criogênicos estéreis com capacidade para 2ml (Techno Plastic Products AG, Suíça) para armazenamento de plasma. A dosagem de progesterona foi realizada em laboratório através de quimioluminescência (Siemens™ Progesterone kit, UK). A dose mínima detectável é 0,2 ng/ml. Para análise laboratorial da concentração de progesterona, foram selecionadas quatro amostras, com intervalo semanal, de cada animal considerado em anestro estacional. O início do anestro estacional foi determinado pelo primeiro dia de exame de palpação e ultrassonografia transretal no qual os ovários apresentaram-se pequenos, lisos e endurecidos, com poucos folículos de diâmetro inferior a vinte milímetros, e confirmado por níveis plasmáticos de progesterona abaixo de 1 ng/ml por mais de vinte e um dias. A duração normal do corpo lúteo foi admitida como luteólise ocorrendo quinze dias após a ovulação; lise do corpo lúteo após quinze dias caracterizou corpo lúteo de duração prolongada. A divergência folicular foi definida como o momento em que iniciou a diferença na razão de crescimento entre os futuros folículos dominante e subordinado.

3.4 Análise Estatística

Utilizou-se o teste do qui-quadrado para comparar os dois grupos em relação ao tratamento. Para comparação entre os grupos quanto ao número de ovulações, duração média dos ciclos (em dias) e média de dias decorridos entre o início do tratamento e a

última ovulação do período experimental, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes.

4 RESULTADOS

No grupo Controle 80% das éguas ingressaram na fase anovulatória entre maio e junho. No grupo Tratamento, 85,71% continuou ciclando até o final do período experimental, demonstrando que a aplicação do tratamento foi eficiente ($P<0,05$). Houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de ovulações do período experimental ($P<0,05$) e tempo decorrido do início do tratamento até a última ovulação do período experimental ($P<0,05$). Ovulações de diestro não foram incluídas nos resultados.

Embora o tratamento tenha sido eficiente para evitar a entrada no anestro, um alongamento no ciclo de todos os animais tratados demonstrou que outros fatores influíram no efeito do fotoperíodo estimulante. Os alongamentos nos ciclos ocorreram nos meses de abril (final), maio e junho, tanto nos animais tratados quanto nas duas éguas controles que não interromperam a atividade cíclica. Não houve diferença significativa entre os dois grupos ($P>0,05$) quanto à duração dos ciclos. O menor escore médio (2,5) de condição corporal das integrantes do grupo Tratamento ocorreu durante os mesmos meses de alongamento dos ciclos.

O alongamento dos ciclos nos animais tratados foi causado por atraso na divergência folicular (66,67% dos ciclos alongados) ou persistência lútea (33,33% dos ciclos alongados). A divergência folicular foi identificada quando o futuro folículo dominante atingiu um diâmetro médio de 23mm. Um animal do grupo Tratamento desenvolveu um ciclo anovulatório entre abril e junho. Nas éguas cíclicas do grupo Controle, 100% dos ciclos alongados foram devidos a atraso na divergência folicular.

Dos animais que entraram em anestro no grupo Controle, 37,5% o fizeram após uma fase de crescimento folicular seguido de atresia; 37,5%, após a lise de corpo lúteo de duração normal; e em 25% o anestro seguiu-se à lise de corpo lúteo de duração prolongada. No final de abril, um animal do grupo Tratamento (14,29%) entrou em anestro, após um período de atividade folicular seguido de atresia. Concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 1 ng/ml durante mais de vinte e um dias, confirmaram o anestro estacional. Os resultados das dosagens de progesterona são mostrados no Apêndice B.

O número médio de ovulações, duração média dos ciclos, número de dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação do período experimental,

número de dias entre o início do tratamento e a constatação do anestro, e respectivas medianas estão expressos na Tabela 1:

Tabela 1. Número médio de ovulações, duração média do ciclo, média de dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação; entre o início do tratamento e o anestro e respectivas medianas

	Tratamento	Controle	P
Número médio	9,29 ± 1,98	4,9 ± 2,85	0,002
ovulações			
Mediana	10	4	-
Duração média ciclo (dias)	24,4 ± 1,51	34,04 ± 24,77	0,278
Mediana	24,33	25	-
Início tratamento até última ovulação (média em dias)	210 ± 50,6	118 ± 62,6	0,005
Mediana	228	105	-
Início tratamento até anestro (média em dias)	166*	123,63 ± 23,19	-
Mediana	166*	125,50	-

* Único animal do grupo Tratamento a entrar em anestro
Ovulações de diestro não foram incluídas nos resultados

Detalhamento dos resultados encontrados para os animais de ambos os grupos encontra-se nos Apêndices C e D (grupo Controle) e E (grupo Tratamento).

5 DISCUSSÃO

No presente experimento, o número de animais tratados que não cessaram a atividade cíclica reprodutiva foi maior que o número de animais que continuaram ciclando no grupo Controle. Este resultado diverge daquele obtido por Kooistra e Ginther em 1975, no qual as éguas mantidas sob fotoperíodo estimulante durante um ano a partir do solstício de verão, apresentaram uma fase anovulatória, e daquele obtido por Bisol (2007), onde o tratamento com luz iniciou dois meses após o solstício de verão; aparentemente, a aplicação de fotoperíodo estimulante iniciada sessenta dias após o solstício de verão foi inefetiva devido à época de início do tratamento, quando o processo de entrada no anestro sazonal já havia sido iniciado. Apesar de ter sido iniciado no solstício de verão, o experimento de Kooistra e Ginther (1975) não obteve sucesso em impedir a fase anovulatória de inverno, mesmo em éguas que receberam suplementação alimentar. Aparentemente, as temperaturas ambientais negativas no sul do Wisconsin durante o inverno influenciaram negativamente o efeito do fotoperíodo estimulante, enquanto no presente estudo, temperaturas de inverno positivas apenas próximas a 0°C podem ter contribuído para um alongamento nos ciclos.

É sabido que vários fatores interagem, em algum grau, com o efeito do fotoperíodo, ainda que este seja um fator crucial na sazonalidade reprodutiva da égua (SHARP, 1980). Entre os mais importantes estão o status nutricional do animal e as temperaturas regionais (GINTHER, 1974). No experimento desenvolvido por Bisol (2007), índices pluviométricos e qualidade/quantidade de forragem disponível estiveram significativamente diminuídos durante o período do experimento.

Apesar do tratamento com fotoperíodo ter sido eficiente, foram verificadas irregularidades nos ciclos de todos os animais tratados, principalmente entre o final do mês de abril, maio e junho; nesta mesma época, os dois animais que permaneceram cíclicos no grupo Controle também apresentaram alongamento dos ciclos. O atraso na divergência foi o principal fator do alongamento dos ciclos das éguas que não entraram em anestro, em ambos os grupos. Deficiências nutricionais já foram implicadas na regulação de fatores endócrinos reprodutivos (KUBIAK et al 1987; STICKER et al., 1995a; STICKER et al., 1995b; CARNEVALE et al., 1996; GENTRY et al., 2002). Em éguas alimentadas com uma dieta deficiente em energia ou proteína durante o inverno,

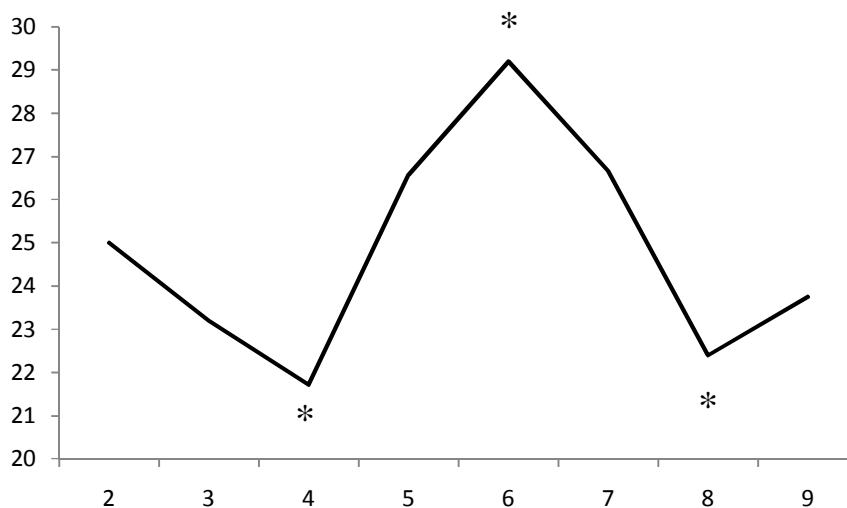
Sticker et al (1995) observaram secreção diminuída de IGF-1, um importante fator para o desenvolvimento folicular. Em éguas, IGF-1 e seus receptores aumentam especificamente no folículo dominante antes do início da divergência (DOYLE et al., 2008), sendo possível atribuir um papel essencial ao IGF-1 na seleção e subsequente desenvolvimento de folículos ovulatórios (GINTHER et al., 2004b).

Nenhum animal do presente experimento recebeu suplementação concentrada ou volumosa; desta maneira, a pastagem de inverno pode ter sido deficiente em nutrientes requeridos para uma adequada função reprodutiva, e níveis críticos de fatores intrafoliculares possivelmente atrasaram a sequência de eventos que disparam o desenvolvimento destacado do futuro folículo ovulatório.

A perda de gordura corporal, embora não excessiva, pode ter alterado níveis circulantes de leptina, que desempenha um papel indireto na atividade reprodutiva (FITZGERALD; MCMANNUS, 2000). Gentry et al. (2002) demonstraram menores níveis de IGF-1, leptina, progesterona e prolactina nas éguas mantidas com escore 3,0 – 3,5 (escala 1 a 9) do que naquelas com escore 7,5 – 8,5 (escala 1 a 9); porém, os mesmos autores sugeriram que em éguas com boa condição corporal, aparentemente níveis altos de leptina não constituem um sinalizador para a não interrupção dos ciclos.

Na figura 1, é possível observar a duração média dos ciclos (nos animais que não entraram em anestro), sendo que a diferença foi significativa entre abril e junho e entre junho e agosto.

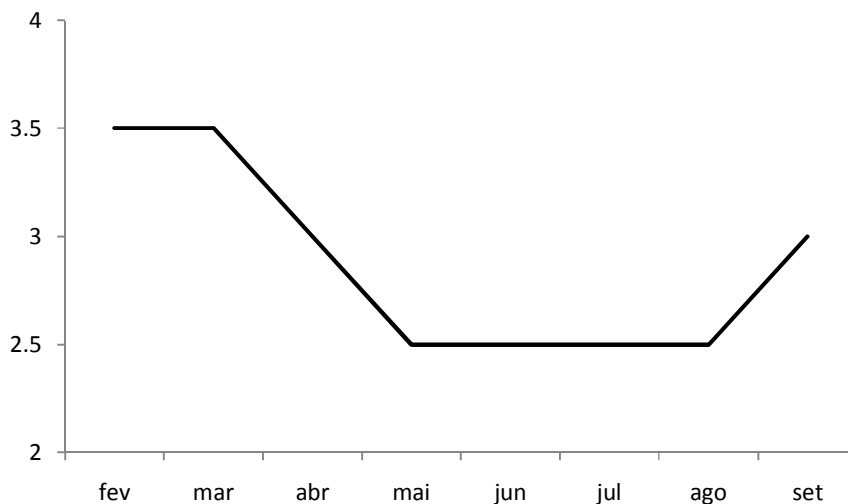
Figura 1. Duração média dos ciclos



*pontos de diferença significativa

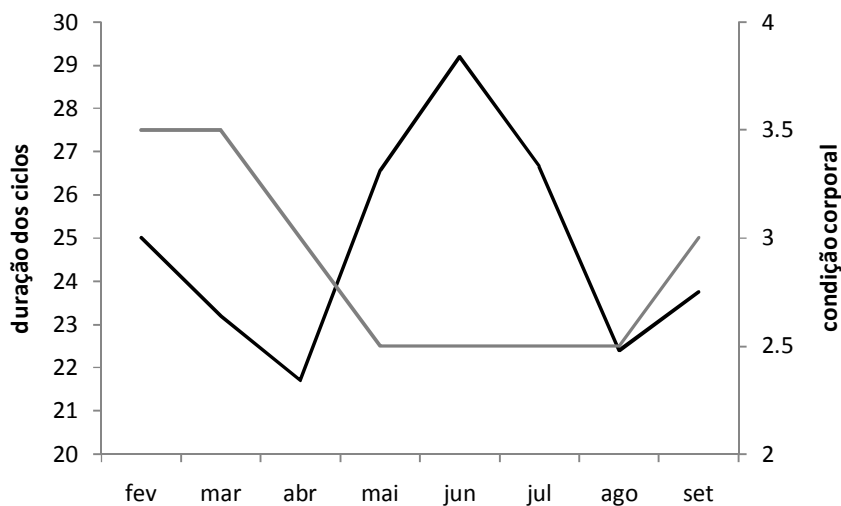
A representação gráfica da condição corporal média (escala 1 a 5) dos animais que não entraram em anestro está expressa na figura 2:

Figura 2. Condição corporal média



A figura 3 ilustra a correlação média ($r = -0,44$) encontrada entre a queda na condição corporal e o aumento na duração dos ciclos:

Figura 3. Condição corporal média e duração média dos ciclos



Observa-se que, quando a duração dos ciclos começa a aumentar, a condição corporal já está em queda.

O fato de o alongamento nos ciclos dos animais tratados ter começado aproximadamente à mesma época em que os animais controle entraram na fase anovulatória, pode ter sinalizado o momento em que fatores como qualidade nutricional e temperatura ambiental atingiram um nível crítico, culminando com a cessação da atividade reprodutiva estacional na maioria das éguas do grupo Controle, mas não nas éguas tratadas com fotoperíodo estimulante. Houve diferença significativa no número de ovulações e número de dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação do período experimental, mas não sobre a duração de ciclos, quando são considerados ambos os grupos. A ausência de diferença na duração de ciclos entre os dois grupos, levando-se em conta interferentes como nutrição e temperatura ambiental, sugere que todos os animais sofreram influência destes fatores em seus ciclos reprodutivos.

No grupo Tratamento, houve um ciclo anovulatório (um animal) e um ciclo onde a divergência folicular foi atrasada em cerca de duas semanas (um animal); isto pode ter representado o início de uma primeira fase da estação anovulatória que não evoluiu para um anestro de inverno, mas retornou às ovulações cíclicas possivelmente por ação do fotoperíodo estimulante. Considerando-se que o tratamento começou vinte e cinco dias após o solstício de verão, é possível que um ritmo circanual endógeno inerente à atividade reprodutiva da égua, já em andamento, tenha sido interrompido e revertido pela continuidade do tratamento com extensão artificial do fotoperíodo. Embora o tempo de resposta do hipotálamo ao estímulo fótico não seja conhecido (SILVIA et al., 1986), estudos que quantificaram valores diretamente a partir dos tecidos hipotalâmicos e hipofisários determinaram que níveis de GnRH presentes no hipotálamo estão muito mais altos no início da estação reprodutiva, enquanto concentrações pituitárias de LH, nesta mesma época, não estavam significativamente maiores do que os níveis encontrados no anestro; isto levou à conclusão de que o hipotálamo responderia à informação fotoperiódica mais rapidamente que a hipófise (SILVIA et al., 1986), o que poderia explicar a reversão deste ritmo reprodutivo endógeno.

Em um estudo que avaliou características ovulatórias e de intervalo inter-ovulatório na estação reprodutiva de éguas, Ginther e Pierson (1989) também

observaram ciclos alongados, que foram associados a folículos hemorrágicos; prolongamento das fases luteal e folicular sem, contudo, presença de quaisquer anormalidades ovarianas ou uterinas; e ovulação de diestro. Em nosso estudo, dentre estes achados apenas a ocorrência de folículos hemorrágicos não foi observada. Neste trabalho, 33,33% das éguas tratadas que continuaram ciclando ao longo do ano apresentaram em algum momento corpo lúteo de duração prolongada, confirmando o estudo de Boeta et al. (2006), onde o mesmo ocorreu em 30,7% das éguas que apresentaram atividade ovulatória contínua ao longo do ano.

Considerando-se os animais do grupo Controle, observa-se que a proporção de éguas que entrou em anestro após um diestro prolongado (25%) foi próxima dos achados de King et al. (1993), que observou o mesmo em 18,75% dos animais; entretanto, a proporção encontrada no presente estudo diverge dos achados de Hughes et al. (1975), que observaram prolongamento lúteo em seis de nove éguas que entraram em anestro, e do resultado obtido por Bisol (2007), onde 40% dos animais controle e 75% dos animais tratados apresentaram diestro prolongado.

O prolongamento da fase lútea pode ter como causa a deficiência de produção e/ou liberação endometrial de prostaglandina. É possível que níveis diminuídos de estradiol no outono (NEQUIN et al., 2000; GINTHER et al., 2001) produzam um alongamento da fase lútea, uma vez que a produção de prostaglandina é ativada pelo estradiol (Vernon et al., 1981).

No grupo Tratamento, uma égua (14,29%) apresentou ovulação de diestro. Ovulações no diestro são eventos paradoxais na égua, uma vez que ocorre ovulação quando há predominância de progesterona. Podem ocorrer por ocasião da existência de dois folículos dominantes que ovulam de maneira assíncrona, provavelmente provenientes de ondas foliculares diferentes (GINTHER, 1992). Após ovulação não seguida de concepção, quando a prostaglandina F2- α (PGF2 α) secretada pelo endométrio lisa agudamente o corpo lúteo originado da primeira ovulação, aquele formado a partir do segundo folículo ovulado (no diestro) não encontra-se maduro o suficiente para lise, desta maneira alongando o ciclo do animal. Deficiências endometriais na secreção de PGF2 α também podem ser responsáveis pela ocorrência de prolongamento do corpo lúteo, assim como inflamações no endométrio podem levar à produção de PGF2 α , lisando prematuramente um corpo lúteo já maduro e ocasionando o encurtamento do ciclo.

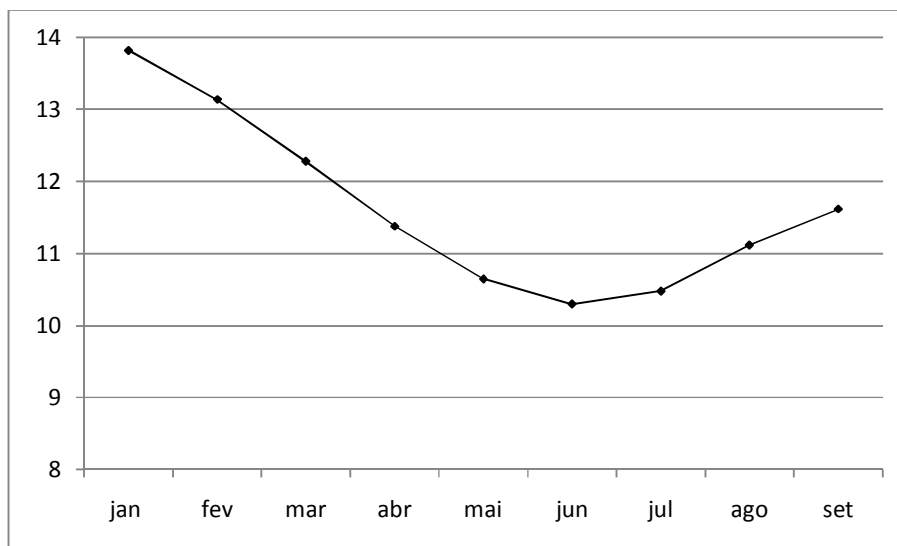
Finalmente, este estudo demonstra que os índices de sucesso em programas de transferência de embriões podem ser aumentados, uma vez que há oportunidade de emprego reprodutivo otimizado de doadoras e receptoras. Em centros e haras onde é utilizada a transferência de embriões, situações controladas de alimentação seriam certamente melhores para manutenção da regularidade dos ciclos. A prática da manipulação da ciclicidade torna irrelevante a interferência de alongamentos nos ciclos no manejo dos animais.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com fotoperíodo estimulante a partir da primeira metade do verão foi efetivo para manter ciclicidade de éguas durante outono e inverno.

A duração dos ciclos de outono e inverno pode ser influenciada pela qualidade da alimentação e temperatura ambiental.

APÊNDICE A - Média de horas de luz/dia para as coordenadas da propriedade, durante o período experimental



APÊNDICE B – Concentrações plasmáticas médias de progesterona para os animais que entraram em anestro

Égua	Grupo	Concentração média progesterona (ng/ml)
C1	Controle	0,23
C2	Controle	0,24
C5	Controle	0,33
C6	Controle	0,33
C7	Controle	0,25
C8	Controle	0,22
C9	Controle	0,30
C10	Controle	0,32
L6	Tratamento	0,26

APÊNDICE C – Número de ovulações, média da duração do ciclo, dias decorridos entre o início do tratamento e a última ovulação, e dias decorridos entre o início do tratamento e o anestro no grupo Controle.

Égua	No. Ovulações	Média ciclo (dias)	Início do tratamento até última ovulação (dias)	Início do tratamento até anestro (dias)
C1	4	23,67	105	143
C2	3	35,5	66	95
C3	9	23,875	200	-
C4	9	24,75	228	-
C5	1	-	10	95
C6	5	28,75	136	150
C7	8	18,857	138	150
C8	4	25	91	105
C9	4	27	105	127
C10	2	99	101	124
Médias	4,9	34,04	118	123,63
Mediana	4	25	105	125,50

APÊNDICE D – Número de ovulações, média da duração do ciclo e duração do maior ciclo nas éguas cíclicas do grupo Controle

Égua	No.ovulações	Duração média ciclo (dias)	Duração do maior ciclo (dias)
C3	9	23,875	27 dias
C4	9	24,75	36 dias
Médias	9	24,31	-

APÊNDICE E - Resultados obtidos para o grupo Tratamento durante o período experimental.

Égua	No.ovulações	Duração média ciclo (dias)	Início do tratamento até última ovulação (dias)	Maior ciclo (dias)
L1	10	25,45	226	57*
L3	10	25,33	235	30
L4	11	23,8	236	37
L5	10	24,33	229	31
L6	5	21,75	96	25
L7	9	26,38	220	42
L9	10	23,778	228	33
Médias	9,286	24,403	210	-
Mediana	10	24,33	228	-

*Apresentação de um ciclo anovulatório

REFERÊNCIAS

- AURICH, J.E., HOPPEN, H.O., HOPPE, H., AURICH, C., 1996: Endogenous opioids and reproductive functions in the horse. **Animal Reproduction Science**, **42**:119-129.
- BESOGNET, B., HANSEN, B.S., DAELS, P.F., 1996: Induction of reproductive function in anestrus mares using a dopamine antagonist. **Theriogenology**, **47**:467-480.
- BISOL, J.F.W., RODRIGUES, 2007: Fotoperíodo artificial sobre a atividade reprodutiva de éguas durante a transição outonal. Dissertação de Mestrado.
- BOETA, M., PORRAS, A, ZARCO, L.A, AGUIRRE-HERNÁNDEZ, R., 2006: Ovarian activity of the mare during winter and spring at a latitude of 19°21'N. **Journal of Equine Veterinary Science**, **26**:55-58.
- BRADSHAW, W.E., HOLZAPFEL, C.M., 2007: Evolution of animal photoperiodism. **Annual review of ecology, evolution and systematics**, **38**:1-25.
- BURKHARDT, J., 1947: Transition from anestrus in the mare and the effects of artificial lighting. **Journal Agric. Sci.**, **37**:64-68.
- CARNEVALE, E.M., HERMENET, M.J., GINTHER, O.J., 1996: Age and pasture effects on vernal transition in mares. **Theriogenology**, **47**:1009-1018.
- DIEKMAN, M.A, BRAUN, W., PETER, D., COOK, D., 2002: Seasonal serum concentrations of melatonin in cycling and noncycling mares. **Journal of Animal Science**, **80**:2949-2952.
- DONADEU, F.X., 2006: Early indicators of follicular growth during the anovulatory season in mares. **Animal Reproduction Science**, **94**:179-181.
- DONADEU, F.X., GINTHER, O J., 2002: Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. **Biology of Reproduction**, **1111-1118**.
- DONADEU, F.X., GINTHER, O J., 2003: Interactions of follicular factors and season in the regulation of circulating concentrations of gonadotrophins in mares. **Reproduction**, **125**:743-750.
- DONADEU, F.X., WATSON, E.D., 2007: Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**, **100**:225-242.
- DOYLE, I.K., HOGG, C.O., WATSON, W.D., DONADEU, F.X., 2008: Seasonal effects on the response of ovarian follicles to IGF1 in mares. **Reproduction**, **136**:589-598.

- FITZGERALD, B.P., MCMANUS, C.J., 2000: Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology of Reproduction**, **63**:335-340.
- FREEDMAN, L.J., GARCIA, M.C., GINTHER, O.J., 1979: Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. **Biology of Reproduction**, **20**:567-574.
- GENTRY, L.R., THOMPSON JR., D.L., GENTRY JR., G.T., DAVIS, K.A., GODKE, R.A., CARTMILL, J.A., 2002: The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **Journal of Animal Science**, **80**:2695-2703.
- GINTHER, O.J., 1974: Occurrence of anestrus, estrus, diestrus, and ovulation over a twelve-month period in mares. **American Journal of Veterinary Research**, **35**:1173-1179.
- GINTHER, O.J., 1990: Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, **90**:311-320.
- GINTHER, O.J.; **Reproductive biology of the mare** – 2nd ed. – Michigan, USA: McNaughton and Gunn Inc. Ann Arbor, 1992.
- GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELDT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K., 2001: Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, **65**:638-647.
- GINTHER, O.J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BEG, M.A., 2004a: Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. **Animal Reproduction**, **3(1)**:29-40.
- GINTHER, O.J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BEG, M.A., 2004b: Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. **Biology of Reproduction**, **70**:1374-1379.
- GINTHER, O.J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BEG, M.A., 2004c: Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, **1**:31-44.
- GINTHER, O.J., PIERSON, R.A., 1989: Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares (abstract). **Journal of Equine Veterinary Science**, **9**:4-12.
- GUILLAUME, D., 1996: Action de la photopériode sur la reproduction des équidés. **INRA Productions Animales**, **9(1)**:61-69.
- HAZLERIGG, D.G., WAGNER, G.C., 2006: Seasonal photoperiodism in vertebrates: From coincidence to amplitude. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, **17(3)**:83-91.

- HOFMAN, M.A., 2004: The brains's calendar: neural mechanisms of seasonal timing. **Biol. Rev.**, 79:61-77.
- JOHNSON, A.L., 1986: Serum concentrations of prolactin, thyroxine and triiodothyronine relative to season and the estrous cycle in the mare. **Journal of Animal Science**, 62:1012-1020
- KING, S.S., NEQUIN, L.G., DRAKE, S., HEBNER, T.S., ROSER, J.F., EVANS, J.W., 1988: Progesterone levels correlate with impending anestrus in the mare (abstract). **Journal of Equine Veterinary Science**, 8:109-111.
- KING, S.S., NEUMANN, K.R., NEQUIN, L.G., WEEDMAN, B.J., 1993: Time of onset and ovarian state prior to entry into winter anestrus. **Journal of Equine Veterinary Science**, 13:512-515.
- KOOISTRA, L.H., GINTHER, O.J., 1975: Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. **American Journal of Veterinary Research**, 36:1413-1419.
- KUBIAK, J.R., CRAWFORD, B.H., SQUIRES, E.L., WRIGLEY, R.H., WARD, G.M., 1987: The influence of energy intake and percentage of body fat on the reproductive performance of nonpregnant mares. *Theriogenology*, 28(5):587-598.
- MALINOWSKY, K., JOHNSON, A.L., SCANES, C.G., 1985: Effects of interrupted photoperiods on the induction of ovulation in anestrus mares. **Journal of Animal Science**, 61:951-955.
- MALSCHITZKY, E., SCHILELA, A., MEIRELLES, L.S., MATTOS, A.L.G., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C., 2001: Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. **Pferdeheilkunde**, 17(6):565-569.
- MARI, G., MORGANTI, M., MERLO, B., CASTAGNETTI, C., PARMEGGIANI, F., GOVONI, N., GALEATI, G., TAMANINI, C., 2009: Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrus mares. **Theriogenology**, 71:959-965.
- MARONDE, E. e STEHLE, J.H., 2007: The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 18(4):142-149.
- NAGY, P., GUILLAUME, D., DAELS, P., 2000: Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, 60-61:245-262
- NEQUIN, L.G., KING, S.S., ROSER, J.F., SODERSTROM, B.L., CARNEVALE, E.M., NEUMANN, K.R., 2000: Uncoupling of the equine reproductive axis during transition into anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.** 56:153-161.
- NUNES, M.M., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O, ROCHA, A N., 2002: Influence of the autumn transitional phase on follicular development in mares. **Theriogenology**, 58:603-606.

PALMER, E., DRIANCOURT, M.A., ORTAVANT, R., 1982: Photoperiodic stimulation of the mare during the winter anoestrus (abstract). *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl.32:275-282.

PALMER, E., GUILLAUME, D., 1992: Photoperiodism in the equine species – what's a long night? (abstract). *Animal Reproduction Science*, **28**:21-30

SCRABA, S.T., GINTHER, O.J., 1985: Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. *Theriogenology*, **24**:667-679.

SHARP, D.C., 1980: Environmental influences on reproduction in horses. *Veterinary Clin.N.A.*, **v.2** p.207-233.

SHARP, D.C., GINTHER, O.J., 1975: Stimulation of follicular activity and estrous behavior in anestrous mares with light and temperature. *Journal of Animal Science*, **41**:1368-1372.

SILVIA, P.J., SQUIRES, E.L., NETT, T.M., 1986: Changes in the hypothalamic-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence. *Biology of Reproduction*, **35**:897-905.

STICKER, L.S., THOMPSON, D.L.Jr., FERNANDEZ, J.M., BUNTING, L.D., DE PEW, C.L., 1995: Dietary protein and (or) energy restriction in mares: plasma growth hormone, IGF-1, prolactin, cortisol, and thyroid hormone responses to feeding, glucose, and epinephrine. *Journal of Animal Science*, **73**:1424-1432.

STICKER, L.S., THOMPSON, D.L.JR., , BUNTING, L.D., FERNANDEZ, J.M., DE PEW, C.L., NADAL, M.R. Feed deprivation of mares: plasma metabolite and hormonal concentrations and responses to exercise. *Journal of Animal Science*, **v.73**,p.3696-3704, 1995b.

THOMPSON, D.L.Jr., HOFFMAN, R., DE PEW, C.L., 1997: Prolactin administration to seasonally anestrous mares: reproductive, metabolic, and hair-shedding responses. *Journal of Animal Science*, **75**:1092-1099.

VERNON, M.W., 1981: ProstaglandinF2 α in the equine endometrium: Steroid modulation and production capacities during the estrous cycles and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, **25**:581-589.