

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação de diferentes pressões negativas na aspiração folicular
transvaginal guiada por ultrassom sobre a recuperação oocitária em
éguas**

Marcus André Ferreira Sá

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PRESSÕES NEGATIVAS NA
ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR
ULTRASSOM SOBRE A RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA EM
ÉGUAS**

MARCUS ANDRÉ FERREIRA SÁ

Sob a orientação do professor
Júlio César Ferraz Jacob

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas).

Seropédica
Junho de 2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcia e Nelson

Ao meu irmão, Pedro Gabriel

À minha avó, Expedicta (*in memoriam*)

e aos amigos de verdade, mesmo que distantes.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, saúde, força, família e me mostrar o caminho a trilhar.

Aos meus pais por todos os ensinamentos, carinho, dedicação e apoio que me deram condições de chegar até aqui. Ao meu irmão que sempre foi um grande companheiro e esteve ao lado por toda vida. Sem eles não teria conseguido.

Aos amigos que me acompanham por toda a vida ou àqueles que acompanharam em apenas alguma etapa. De alguma forma também colaboraram para a minha formação e deixaram alguma lembrança. Em especial: Thatiana Saraiva, Paulo Junior, Ana Paula Vasconcelos, Gabriel Oliveira, Marcelly Karoline, Luciana Bezerra, Renato Bergqvist, Vanilla Gomes, Pedro Cupollillo, Vinícius Alves, Débora Tavares e Anna Carolina Vargas.

Aos companheiros do Alojamento da Pós-Graduação, que apesar dos desentendimentos nas reuniões, tornaram esses dois anos de curso mais divertidos e proveitoso pelas trocas de experiências. Boa sorte para todos! Juliano, Fábio Albuquerque, Leandro, Gabriel Alves, Eduardo Aragão e cia.

Ao Mestre e Orientador Dr. Júlio Jacob, veterinário com grande vivência e conhecimento, que admiro demais. Agradeço-o não só pelas oportunidades de estágio, pesquisa e trabalho, mas também pelo incentivo aos estudos sobre reprodução equina e compartilhar seu infundável conhecimento teórico e prático.

Ao professor Dr. Marco Mello pela convivência e disponibilidade em colaborar com nossos projetos nas inúmeras vezes em que foi solicitado e pela agradável companhia nas corridas de final de tarde pela Rural. Aos professores Ms. Três e Dra. Vera pelos anos de convívios e pelos conselhos, que, sem dúvida, em muito colaboraram em minha formação.

Aos funcionários da Área de Reprodução Animal, Zico, Zezinho, Reneu, Peixeiro e aos funcionários do Setor de Equinos Nori e Beto.

À minha cadela Mel, minha companheira inseparável de todas as horas durante longos anos em Seropédica.

RESUMO

SÁ, Marcus André Ferreira. **Avaliação de diferentes pressões negativas na aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom sobre a recuperação oocitária em éguas.** 2012. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O presente experimento visou investigar se diferentes pressões negativas da bomba de vácuo (150, 280 e 400mmHg) podem influenciar a taxa de recuperação oocitária por folículo preovulatório aspirado. Para tanto, foram submetidos a *ovum pick up* 21 ciclos estrais de éguas ciclando regularmente, distribuídos em três grupos (G_{150} = 150 mmHg; G_{280} = 280 mmHg; G_{400} = 400 mmHg), na seguinte ordem: G_{150} = 150 mmHg (n=6); G_{280} = 280 mmHg (n=7); G_{400} = 400 mmHg (n=6), definida por meio de sorteio. Durante o estro, a atividade ovariana das éguas foi monitorada diariamente através da técnica ultrassonográfica transretal até que o maior folículos atingisse pelo menos 35mm de diâmetro e edema endometrial grau 2,5 durante a avaliação ultrassonográfica, quando então administrou-se 1000UI de hCG, por via endovenosa. Aproximadamente 24 horas após a administração de hCG as éguas foram submetidas a exame ultrassonográfico a cada seis horas para avaliação folicular. Caso houvesse indicação iminente de ovulação ou formação de folículo hemorrágico, o mesmo seria imediatamente aspirado. As aspirações ocorreram em $32,45 \pm 1,92$ h após a aplicação do hCG fazendo uso de ultrassom equipado com um transdutor convexo de 5,0mHz com guia de polietileno contendo uma agulha de duplo lúmen de 12G. O fluido folicular coletado de cada folículo foi congelado e o conteúdo aspirado transferido para uma Placa de Petri e examinado minuciosamente ao estereomicroscópio para localização dos oócitos. Para avaliar estatisticamente o efeito das diferentes pressões sobre a recuperação oocitária, foi utilizado o teste Qui-Quadrado (a 5% de significância) e Fisher Exato, quando recomendado. A taxa de recuperação foi de 31,57% (6/19), sendo 16,66 % (1/6) no G_{150} , 42,85 % (3/7) no G_{280} e 33,33 % (2/6) no G_{400} . Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Através dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que a pressão negativa da bomba de vácuo utilizada não é o determinante para elevar a recuperação oocitária, possivelmente havendo outros fatores atuando de modo mais importante.

Palavras-chave: OPU, oócito, pressão negativa

ABSTRACT

SÁ, Marcus André Ferreira. **Evaluation of different negative pressures on transvaginal follicle aspiration by ultrasound-guided on oocyte recovery in mares.** 2012. 46p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The present experiment aimed to verify if different vacuum pump negative pressures (150, 280 e 400 mmHg) can influence the oocyte recovery rate per preovulatory follicle aspirated. Hence, 21 estrous cycles from regularly cycling mares were subject to OPU. The estrous cycles were sorted in three groups ($G_{150}=150$ mmHg; $G_{280}=280$ mmHg; $G_{400}=400$ mmHg) in the following sequence: $G_{150}=150$ mmHg (n=6); $G_{280}=280$ mmHg (n=7); $G_{400}=400$ mmHg (n=6). During the estrus, the ovarian activity of the mares was daily monitored using the transrectal ultrasound technique until the largest follicle reached at least a diameter of 35mm and endometrial edema score 2.5 was identified on ultrasonographic evaluation, when 1000UI of hCG administered intravenous. Approximately 24 hours after the hCG administered, the mares were monitored by rectal palpation and ultrasonography every six hours to follicle evaluation. In the case of imminent indication of ovulation or formation of hemorrhagic follicle, the follicle would be immediately aspirate. The aspirations occurred in $32,45 \pm 1,92$ h after the hCG administration. The transvaginal aspirations were performed with ultrasound apparatus equipped with a convex transducer of 5,0mHz with polyethylene guide containing a double lumen needle of 12G. The follicular fluid collected from each follicle was frozen and the aspirated content was transferred to a Petri Dishes and thoroughly examined on the stereomicroscope to identify the oocytes presence. In order to statistically evaluate the influence of different pressures on the oocyte recovery, were used Chi-Squared test (a 5% significance) and Fisher Exact Test, when recommended. The recovery rate was 31,57% (6/19), being 16,66 % (1/6) in G_{150} , 42,85 % (3/7) in G_{280} and 33,33 % (2/6) in G_{400} . There was no difference among groups ($p>0,05$). From the results of the current study, it is possible to conclude that the negative pressure of the vacuum pump is not a determining factor to increase the oocyte recovery and other aspects would possibly have more significant influence .

Keywords: OPU, oocyte, negative pressure.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Dinâmica folicular	3
2.2. Maturação folicular e oocitária.....	5
2.3. Agentes indutores de maturação folicular e oocitária	6
2.4. Falhas reprodutivas e limitações da TE.....	8
2.5. Reprodução assistida envolvendo o oócito.....	10
2.5.1 Aspiração folicular	10
2.5.2 Fatores que interferem na obtenção do oócito.....	13
2.5.3 Transferência de oócitos e GIFT	15
2.5.4 ICSI - Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Animais e ultra-sonografia	18
3.2. Aspiração folicular e recuperação oocitária	18
3.3. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. Introdução

Atualmente, as técnicas de reprodução assistida em equinos mais utilizadas incluem a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embriões (TE). No entanto, com a utilização destas técnicas é impossível se obter gestações em algumas éguas com alterações reprodutivas, como subfertilidade ou infertilidade adquiridas ou de animais que venham a óbito.

A subfertilidade ou infertilidade em equinos pode ser ocasionada por diversos fatores: enfermidades adquiridas do trato reprodutivo, senilidade e alterações metabólicas talvez sejam as causas mais freqüentes de redução dos índices de fertilidade desses animais.

Visando o incremento genético e o maior aproveitamento de animais com alterações reprodutivas em competições, algumas técnicas de reprodução assistida foram desenvolvidas e estão sendo utilizadas. A técnica de transferência de embriões, ao longo da década de 90, se consolidou como importante ferramenta para obter produtos de éguas incapazes de manter gestação e para aumentar o número de descendentes, viabilizando a reprodução de animais de elevado valor zootécnico (CARNEVALE et al., 2001). Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações, em especial para animais que apresentem alguma patologia de trato reprodutivo, sendo considerados inférteis ou subférteis.

Para superar as limitações da TE e reproduzir animais de alto valor genético, outras biotecnologias foram desenvolvidas utilizando o oócito como estrutura principal dos processos. A biotécnica de aspiração folicular tem sido aplicada com o propósito de obter oócitos viáveis e contornar as deficiências reprodutivas em éguas com dificuldades em gerar a prole ou ser doadora de embriões (BOGH et al., 2003).

Entretanto, particularidades anatômicas dificultam a obtenção do oócito equino tanto *in vivo* quanto *in vitro*, quando comparado ao ovário bovino. Em folículos imaturos, o oócito apresenta forte fixação à parede folicular. O que ocorre é a projeção de processos das células da granulosa para o interior da célula da teca, formando uma região que funciona como uma âncora entre a parede folicular e o oócito (HAWLEY; ENDERS; HINRICHS, 1995).

A partir da obtenção de oócitos é possível desenvolver diversas técnicas para contornar as limitações da TE, como a fertilização *in vitro* (FIV) de embriões, injeção

intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferência de oócitos, transferência de gametas intrafalopiano (GIFT) e transferência nuclear (clonagem). Estas tem sido as principais técnicas utilizadas como alternativa para obtenção de produtos de animais subférteis.

Para a obtenção de oócitos em éguas, a biotécnica mais utilizada atualmente consiste na aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom. O sucesso desta técnica pode ser influenciado de maneira determinante por diversos fatores, tais como níveis de pressão da bomba de vácuo, tipo de agulha a ser utilizada, protocolos anestésicos empregados, fase do ciclo estral em que ocorrerá a punção, experiência do operador, dentre outros.

Diante disto, o presente experimento visou investigar se diferentes pressões negativas (150, 280 e 400mmHg) da bomba de vácuo podem influenciar a taxa de recuperação oocitária por folículo preovulatório aspirado.

2. Revisão de Literatura

2.1. Dinâmica folicular

A égua se caracteriza por ser monovulatória, sofrendo influência da estação do ano, com ciclos estrais regulares, a cada 21 dias em média, no período de dias longos. O período interovulatório tem início no momento de uma ovulação associada ao estro até o final do estro seguinte, quando ocorre a próxima ovulação. Alguns tipos de ondas foliculares se desenvolvem durante a estação de monta. Na onda menor, o maior folículo não chega a se tornar dominante. Na onda maior, dividida em primária e secundária, o maior folículo se torna o dominante (GINTHER et al., 2004).

A maioria das éguas apresenta desenvolvimento de uma onda folicular por ciclo, que inicia na metade da fase luteal. Porém, em torno de um terço das éguas pode ocorrer o desenvolvimento de outra onda folicular iniciada rapidamente após a ovulação (GINTHER et al., 1992). Quando a emergência ocorre durante o estro, denomina-se onda folicular secundária e origina um folículo dominante de diestro, que pode regredir ou ovular. A emergência da onda no meio do diestro é chamada de onda folicular primária e produz um folículo dominante destinado a ovular durante o estro (GINTHER, 1993; EVANS, 2003).

A emergência da onda folicular se caracteriza pelo surgimento de um grupo de folículos com diâmetros variando entre 6 e 10mm, dando início a fase de crescimento comum que ocorre por volta de 6 dias após a ovulação (GINTHER et al., 2002; 2005). Em concomitância a esta fase, ocorre o aumento das concentrações séricas de FSH (Hormônio Folículo Estimulante). No momento em que os maiores folículos da onda atingem diâmetro ≥ 13 mm, a concentração de FSH começa a diminuir devido à produção de inibina por esses folículos (DONADEU; GINTHER, 2001; GINTHER et al., 2005). O declínio da concentração de FSH desde o pico da onda até o início da divergência folicular tem sido descrito à medida que se aumenta a inibina e o número de folículos. A concentração de inibina total começa a aumentar antes do início do declínio da onda de FSH (DONADEU; GINTHER, 2001). Quando o maior folículo alcança o diâmetro aproximadamente de 21 a 23 mm, o que ocorre, em média aos seis dias após a emergência, verifica-se o fim da fase comum de crescimento e o início da divergência (GINTHER, 2000; JACOB, 2009). O início da esperada divergência baseou-se nos diâmetros atingidos pelos folículos, em estudos prévios, em que a divergência folicular

foi utilizada para procedimentos experimentais capazes de interferir na divergência, quando os folículos alcançam 22,5 mm de diâmetro em éguas (GINTHER, 2000). A divergência ocorre quando o maior folículo atinge 20 a 25 mm de diâmetro, havendo alterações na taxa de crescimento entre o folículo dominante e os subordinados, sendo que o dominante continua seu crescimento e os demais cessam seu crescimento e/ou regredem. Essa alteração é o principal evento durante a seleção do folículo dominante, sendo precedido pelo aumento nas concentrações de LH (GINTHER et al., 2004). O mecanismo da divergência deve impedir o crescimento contínuo do futuro folículo subordinado, desde que o mesmo seja capaz de se tornar dominante, como indicado nos estudos envolvendo aspiração do folículo dominante em vacas e éguas (GINTHER, 2000).

Jacob et al. (2009) relataram que em 8/11 ondas ovulatórias com dois folículos dominantes, uma segunda divergência ocorreu entre o maior e o segundo maior folículo com 2,5 dias após a primeira divergência. A incidência de dois folículos dominantes em uma onda ovulatória tem sido em torno de 20% na raça Bretã (GINTHER et al. 2008; JACOB et al., 2009). Esta incidência é maior do que a de dupla ovulação, de forma que um dos folículos pode regredir (GINTHER et al., 2004).

Comparando-se o maior folículo de uma onda com os dois maiores de outra onda, observou-se que o diâmetro atingido neste caso foi menor do que quando se observou somente um folículo em crescimento, quando os dois folículos se encontram no mesmo ovário. Entretanto, esta diferença reduziu para 4mm quando os dois folículos estavam em ovários opostos (GINTHER, 1995).

Próximo ao momento da divergência, um dos folículos tem aumentada a capacidade de produção de estradiol, a sensibilidade ao FSH e a especificidade para responder ao LH (Hormônio Luteinizante) através da indução de receptores nas células da granulosa. Tal característica permite a ocorrência de apenas uma ovulação, eventualmente duas ou mais são observadas (GINTHER, 1992; JACOB, 2009).

A elevação passageira de LH ocorre durante a divergência como parte da onda ovulatória de LH. Em éguas jovens (cinco a seis anos), a onda de LH se inicia em torno do 4º dia antes da ovulação, alcançando o máximo um dia após a ovulação (JACOB, 2009).

Na fase pós-divergência, o folículo dominante passa a depender do LH para o desenvolvimento, maturação e ovulação. Além disso, há ação de fatores de crescimento

intrafolículos, presentes desde a seleção do futuro folículo dominante, e de proteases envolvidas com a esteroidogênese intrafolicular que leva à ovulação (GASTAL et al., 2000; DONADEU; GINTHER, 2003; SPICER et al., 2005).

Os níveis de FSH permanecem baixos até a ovulação, sendo esta diminuição atribuída especialmente ao folículo dominante (DONADEU; GINTHER, 2003). Os folículos subordinados não respondem à baixa concentração sistêmica de FSH além de não possuírem receptores de LH nas células da granulosa em abundância. Entretanto, tal incapacidade dos folículos subordinados em responder ao FSH sistêmico pode ser compensada pela administração exógena da concentração da gonadotrofina antes que a dominância folicular se estabeleça (SAMPER; PYCOCK; MCKINNON, 2007).

2.2. Maturação folicular e oocitária

No folículo ovariano de mamíferos, as mudanças necessárias para que ocorra a liberação de um oócito viável são decorrentes da onda pré-ovulatória de LH. O ovário passa por uma série de eventos até atingir o momento da ovulação, onde o folículo alcança o estágio preovulatório e as células da granulosa, da teca e oócito apresentam características específicas. Essas alterações são a retomada da meiose pelo oócito, diferenciação das células da granulosa mural e que devem ter adquirido a capacidade de produzir estrógenos, responder ao LH e as células da teca começam a sintetizar quantidades maiores de andrógenos, que servirão de substrato para a esteroidogênese e a expansão das células do *cumulus* (PARK, 2004; RICHARDS, 2002; TSAFRIRI, 2005).

A Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) administrada na presença de folículos preovulatórios leva a expansão da Hialurona Sintetase-2 (HAS-2) nas células da granulosa mural enquanto a onda de LH causa a expansão de toda camada de células do *cumulus* (STOCK, 2002). O hCG pode ainda proporcionar mais rapidamente a elevação na concentração de LH (GINTHER et al., 2009), o que pode influenciar no processo de expansão das células do *cumulus* e liberação oocitária, aumentando a taxa de recuperação.

Durante o processo de expansão destas células, ocorre a secreção de ácido hialurônico (HA) pelo próprio *cumulus*, o que leva a formação de uma matriz extracelular viscosa. A deposição de matriz extracelular é prejudicada pelo citoesqueleto das células do *cumulus*. Entretanto, o LH estimula a despolarização e o alongamento destas células, acompanhadas pela redistribuição e extensão dos microfilamentos, permitindo a

deposição de matriz extracelular e o processo de expansão (SUTOVSKY, 1994).

Paralelamente à maturação oocitária, caracterizada pela retomada da meiose com a quebra da vesícula germinativa e extrusão do primeiro corpúsculo polar, ocorre o aumento do volume do complexo *cumulus oophorus* e sua dissociação em pouco tempo, provocados pela deposição e degradação da matriz extracelular (D'ALESSANDRIS, 2001).

A maturação oocitária, por sua vez, se caracteriza pela transição do oócito em estágio de vesícula germinal (VG) até metáfase II (MII), ocorrendo imediatamente anterior à ovulação. Para que ocorra fertilização do oócito e o desenvolvimento embrionário inicial, é necessário uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos (FISSORE et al., 2002). A distribuição e configuração cromossômica caracterizam a maturação nuclear; a maturação citoplasmática, necessária ao desenvolvimento pós-fertilização, ainda carece de mais estudos (HINRICHS; SCHMIDT; SEIGRATH, 1995).

A retomada da meiose oocitária ocorre devido ao pico de LH preovulatório durante os ciclos estrais sucessivos em mamíferos. Na espécie equina, não há pico de LH e, sim, aumento gradativo durante os dias de estro. A concentração máxima ocorre um dia após a ovulação (BERGFELT; GASTAL; GINTHER, 2001; JACOB et al., 2009). O fator que desencadeia a retomada da maturação oocitária, em equinos, ainda não foi esclarecido (DELL'AQUILA et al., 2004), bem como não é conhecido o tempo de duração do processo de maturação *in vivo* (HINRICHS et al., 1993). Entretanto, oócitos recuperados 36 horas após a administração do hCG estão maduros, em MII (HINRICHS et al., 2000). Fissore et al. (2002) supõe que o tempo para maturação *in vivo* é aproximadamente 36 horas, e que ocorra sob a ação de gonadotrofinas, sendo considerado, com exceção dos suínos, um período longo de maturação em relação às demais espécies de mamíferos, nas quais varia entre 12 e 24 horas.

2.3. Agentes indutores de maturação folicular e oocitária

Pode-se utilizar gonadotrofinas como o hCG ou Acetato de Deslorelina (análogo de GnRH), o que está bem documentado na literatura (quadro 1) resultando em alta taxa de recuperação oocitária (CARNEVALE, 2004). Entretanto, não foi observado diferença entre os grupos, tratado ou não com hCG (69% e 71%, respectivamente) puncionando folículos com diâmetro de 39,7 mm (HINRICHS et al., 1990). Segundo

Squires; Cook (1996), geralmente, o hCG é administrado 30 a 36 horas antes do momento da aspiração folicular e repetidas administrações de injeções do fármaco podem levar à formação de anticorpos e redução na resposta à gonadotrofina. Diante disto, pode-se tentar o tratamento com análogo de GnRH para estas éguas previamente à aspiração folicular.

Para a escolha do momento da administração do agente indutor e consequente antecipação da maturação folicular (36 horas após a aplicação do hCG e 40 horas após o GnRH), as éguas devem apresentar uma combinação de características: 1) folículo \geq 35mm de diâmetro; 2) útero relaxado e tônus cervical; 3) edema uterino indicativo com estro e 4) comportamento compatível com estro (CARNEVALE et al., 2003). O momento escolhido para a administração da gonadotrofina para a recuperação oocitária é importante e deve acontecer quando o folículo estiver apto a responder a estimulação exógena, porém antes que a onda ovulatória de LH tenha ocorrido. Em estudo realizado para avaliar a influência do tempo de aspiração após a administração do hCG (2500UI) sobre a taxa de gestação, quatro éguas apresentaram células da granulosa compactas após a aspiração. Provavelmente isto ocorreu devido ao folículo ainda se encontrar imaturo para responder a administração do hCG, apesar de apresentar diâmetro preovulatório (> 33 mm) (HINRICHS et al., 2000). A porcentagem de folículos que responderam ao hCG ficou em torno de 73% (30/41), próximo a porcentagem esperada por Kolling; Allen, (2005) de éguas ovulando entre 24 e 48h (80%).

Na literatura, os trabalhos utilizam de 1500 a 3300UI de hCG como agente indutor de maturação folicular (CARNEVALE et al., 2001; 2003; 2005; COOK et al.; 1992), ou ainda análogos de GnRH, associados ou não. Entretanto, Jacob et al. (2011) avaliaram a resposta embrionária de éguas tratadas com 1000UI de hCG, obtendo 60% de recuperação embrionária. Diante destes resultados, 1000UI de hCG pode ser capaz de induzir a maturação folicular final e oocitária para aspiração folicular.

Quadro 1. Cronologia dos estudos que utilizaram agentes indutores de maturação em folículos com diâmetro pré-ovulatório.

Autor(es)	Fármaco utilizado	Dose	Tx. Recuperação oocitária
<i>McKinnon et al., (1986)</i>	hCG	3300UI	20% (2/10)
<i>Palmer et al., (1987)</i>	hCG	2000UI	64% (17/28)
<i>McKinnon et al., (1988)</i>	hCG	3300UI	65% (24/37)
<i>Vogelsang et al., (1988)</i>	hCG Gonadorelina	2000UI 2,0mg	39% (7/18)
<i>Hinrichs; Kenney; Kenney, (1990)</i>	hCG	2000UI	69% (9/13)
<i>Bruck et al., (1992)</i>	hCG	3000UI	33% (1/3)
<i>Cook et al., (1992)</i>	hCG	3300UI	53% (9/17)
<i>Cook et al., (1993)</i>	hCG Deslorelina	3300UI 2,2mg	69% (27/39) 58% (35/60)
<i>Carnevale; Ginther, (1993)</i>	hCG	1500UI	78% (14/18)
<i>Ray et al., (1994)</i>	hCG	3300UI	84% (26/31)
<i>Carnevale; Ginther, (1995)</i>	hCG	2000UI	89% (66/74)
<i>Meintjes et al. (1995a)</i>	hCG	1500UI-2500UI	43% (29/62)
<i>Hinrichs et al., (2000)</i>	hCG	2500UI	81% (30/37)
<i>Scott et al., (2001)</i>	hCG	2000UI	43%(16/37)
<i>Carnevale et al., (2001)</i>	hCG Deslorelina	2000 –2500UI 2,1mg	73% (90/123)
<i>Coutinho da Silva et al., (2002b)</i>	hCG	2500UI	78% (50/64)
<i>Carnevale et al., (2003)</i>	hCG Deslorelina	1500–2500UI 2,1mg	76% (331/434)
<i>Carnevale et al., (2005)</i>	Acetato de Deslorelina + hCG	1500–2500UI	77% (548/710)
<i>Rodrigues (2006)</i>	hCG	2500UI	14% (2/14)

2.4. Falhas reprodutivas e limitações da TE

Apesar da consolidação da técnica de transferência de embriões em equinos na década de 90, alguns autores sustentam sua limitação nesta espécie. Allen (2005) defende que a resposta ovariana inadequada aos tratamentos à base de hormônios gonadotróficos exógenos tem sido o maior limitante nos programas de TE em equinos.

Devido a deficiências no trato reprodutivo, algumas éguas se mostram incapazes de produzir ou manter embriões (CARNEVALE et al., 2001). Fêmeas apresentando lesões que dificultem o transporte espermático, a reação entre oócito e espermatozóides, o transporte do embrião através do oviduto e o seu desenvolvimento uterino não devem ser utilizadas como doadoras de embrião (HINRICHS et al., 1998). Segundo Carnevale (2004), as fêmeas que não podem ser beneficiadas pela técnica de TE são aquelas que após diversas tentativas de recuperação embrionária não se obteve sucesso por falha na ovulação, infecção uterina, lesões cervicais e outras patologias do trato reprodutivo.

Os efeitos das condições patológicas associadas à ovulação e ao oviduto não são de diagnóstico simples. Entretanto, resultados de estudos sugerem que a redução na fertilidade ocorre antes do embrião entrar no útero, especialmente em éguas velhas (CARNEVALE, 2007). Em estudo realizado por Carnevale et al. (2003b), os ovidutos de éguas velhas (com idade acima de 20 anos) e éguas jovens (entre dois e nove anos) foram lavados entre um e quatro dias pós ovulação. A taxa de recuperação de oócitos recém ovulados ou embriões foi significativamente menor para éguas velhas do que em éguas jovens (17/29, 59%, e 26/27, 96%, respectivamente). O resultado desse estudo sugere que a ovulação não ocorre ou o oócito não entra no oviduto em muitas éguas velhas. A incidência de falhas na ovulação aumenta de acordo com a idade da égua (CARNEVALE; BERGFELT; GINTHER, 1994).

Além da captação e transporte do oócito, o oviduto exerce função sobre seleção e manutenção do espermatozóide. Em éguas subférteis, poucos espermatozóides apresentam motilidade. Já no oviduto de éguas férteis, foi encontrado espermatozóides apresentando elevada motilidade (SCOTT; LIU; OVERSTREET, 1995)

A falha no transporte espermático e a fertilização em éguas subférteis podem estar associadas às condições patológicas do oviduto. Massas globulares, compostas de colágeno tipo 1 foram encontradas com maior frequência no oviduto de éguas velhas do que éguas jovens. O efeito dessas massas sobre a fertilidade é desconhecido (LIU et al., 1990).

As causas uterinas de redução de fertilidade são frequentemente diagnosticadas na égua. Alterações inflamatórias ou infecciosas são facilmente diagnosticadas e são prejudiciais ao espermatozóide e ao embrião. Éguas com endometrite severa ou persistente requerem elevado investimento para tratamento e geralmente não são produtivas em programas de TE. Muitas éguas não têm causa de

infertilidade diagnosticada, mas após diversas tentativas, não se obtém embrião (CARNEVALE, 2007).

Éguas improdutivas em programas de transferência de embriões, que apresentem elevado valor zootécnico, devem ser utilizadas em programas de reprodução assistida visando a obtenção do oócito, através da técnica de aspiração folicular, para posterior fertilização *in vivo* ou *in vitro*. Éguas subférteis incapazes de produzir embriões viáveis geralmente são boas candidatas a doadora de oócitos (CARNEVALE et al., 2005).

2.5. Reprodução assistida envolvendo o oócito

2.5.1. Aspiração folicular

As técnicas utilizadas para recuperação de oócitos são laparotomia (VOLGELSANG et al., 1986), punção transcutânea pelo flanco (PALMER et al., 1987), colpotomia (HINRICHS; KENNEY; KENNEY, 1990) e aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (BRUCK et al., 1992; CARNEVALE e GINTHER, 1995). Atualmente, a técnica mais utilizada é a aspiração transvaginal guiada por ultrassom (CARNEVALE, 2004).

Ovum pick up (OPU), como é conhecido, é um método pouco invasivo que vem apresentando sucesso para obtenção de oócitos. Os oócitos obtidos podem ser fertilizados *in vivo* através da técnica de transferência de oócito (TO), onde o oócito maturado *in vivo* ou *in vitro* é transferido cirurgicamente para o oviduto de uma égua receptora através de acesso pelo flanco (laparotomia). A fecundação ocorre através da inseminação da égua receptora 12 horas antes e duas horas após a TO, utilizando-se dose inseminante de concentração convencional (CARNEVALE et al., 2000; 2001b; 2002). Os oócitos podem ainda ser destinados a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) que segue o mesmo protocolo da TO, porém a inseminação artificial é realizada diretamente no oviduto junto ao oócito, utilizando-se sêmen com baixa concentração espermática (CARNEVALE, 2004).

OPU com a égua em estação foi primeiramente realizada por Palmer et al. (1987), fixando o ovário com a mão via transretal e guiando-o até flanco para punção transcutânea, obtendo 63% de recuperação de oócito. McKinnon et al (1988) obtiveram índices de recuperação oocitária de 71,4% utilizando uma cânula e uma agulha de 9,8mm para aspirar folículos equinos preovulatórios utilizando o mesmo acesso.

Vogelsang et al. (1988) comparou a coleta de oócitos via punção transcutânea pelo flanco com a coleta via laparotomia com exposição do ovário. O primeiro experimento, usando uma agulha de 13G e 15cm de comprimento conectada a um tubo de látex e uma seringa estéril, obteve uma taxa recuperação de 10%. Com a laparotomia, usando a mesma agulha, elevou-se essa taxa para 14% e quando associada a um sistema de irrigação contínua a vácuo subiu para 60%. Este mesmo sistema de irrigação proporcionou uma taxa de 38% quando usado para punção transcutânea, indicando que a coleta de oócitos com o animal em estação era possível, com sucesso moderado, sem danos ao oócito.

Hinrichs; Kenney; Kenney (1990) utilizaram técnica semelhante, alcançando índices de recuperação de 73%. Trata-se da colpotomia, na qual a mão do operador manipula os ovários através de uma incisão na parede cranial da vagina, pressionando-os contra a parede abdominal, por onde uma agulha para a punção folicular é introduzida. Mas os riscos de peritonite e evisceração através da incisão vaginal limitaram a expansão da técnica.

A técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom foi inicialmente desenvolvida para recuperação de oócitos em mulheres associada à fertilização *in vitro* (FIV) (DELLENBACH et al. 1984; FEICHTINGER; KEMETER, 1986; LENZ et al., 1987) e posteriormente, no decorrer dos anos 80, foi adaptada para bovinos (PIETERSE et al., 1988). O primeiro relato de OPU transvaginal em éguas foi o de Bruck et al. (1992). Nesse estudo, foram realizadas somente quatro aspirações em folículos preovulatórios, sendo que em três delas utilizou-se a administração de hCG e obteve-se apenas um oócito. Para tanto, os autores utilizaram um transdutor setorial acoplado a uma guia transvaginal conectado ao aparelho de ultrassonografia, direcionando-se a agulha de lúmen simples por uma linha de punção que o aparelho disponibilizava. Em seguida, Cook et al. (1992) obtiveram 52,9% (9/17) e 18,5% (25/135) ao aspirar folículos preovulatórios e de diestro, respectivamente. Utilizando a técnica transvaginal, Bracher et al. (1993) aspiraram duzentos folículos durante 24 sessões em que pelo menos quatro folículos estavam presentes, em qualquer fase do ciclo estral, obtendo-se 34 oócitos e taxa de recuperação de 12,3% e 24,4% utilizando agulha de lúmen simples e duplo, respectivamente.

Esta técnica também pode ser utilizada em éguas em fase inicial de gestação, com índices de recuperação de oócitos variando de 54% (GOUDET et al., 1997) a 76%

(MEINTJES et al., 1995a). Dez doadoras em torno dos dias 20 a 150 de gestação foram submetidas à aspiração folicular transvaginal durante um período de 130 dias, com as aspirações sendo realizadas quando pelo menos um folículo atingia 25 mm ou pelo menos três folículos atingiam 15mm de diâmetro. Foram obtidos 152 oócitos de 304 folículos aspirados (50%) e o número médio de aspirações realizadas por égua foram 5,7 (MEINTJES et al., 1994). Cochran et al. (1998) aspiraram em média 13 folículos por seção com índices de recuperação de 66% em 20 aspirações realizadas entre os dias 14 e 70 de gestação.

Dentre as reconhecidas vantagens da técnica, estão os fatos de ser pouco invasiva, não depender de estimulação hormonal, poder ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial (VIANA; BOLS, 2005). Experimentalmente, esta técnica vem sendo aplicada como uma ferramenta para a pesquisa com o intuito de estudar a natureza da dinâmica folicular em equinos e bovinos (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2003), administração intrafolicular de fármacos (GASTAL; KOT; GINTHER, 1995), indução da emergência da onda folicular e sincronização da ovulação entre os animais (AMIRIDIS et al., 2006; LIMA et al., 2007), indução de função lútea (MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010) e avaliação do líquido folicular e sua influência (HINRICHS; RAND; PALMER, 1991).

A fertilidade das éguas submetidas ao procedimento de OPU não sofre alteração, o que foi comprovado em experimento realizado por Mari et al. (2005). De 20 éguas que foram submetidas a três ou quatro sessões de aspiração folicular durante estro e diestro, 10 foram inseminadas e sete ficaram gestantes. Em estudos iniciais desenvolvendo a técnica em cinco éguas, Bracher et al. (1993) realizaram 24 sessões (quatro a sete sessões por égua) de aspiração folicular transvaginal e aspiraram 200 folículos, recuperando 34 oócitos. Os autores não relataram nenhum efeito sobre o ciclo das éguas, bem como concluíram que a técnica pode ser empregada repetidamente sem que haja o risco de peritonite ou aderências. Para avaliar funcional e morfológicamente os ovários de éguas após repetidas sessões de OPU, Bogh et al. (2003) realizaram estudo em que observaram que todas as éguas mantiveram normal a função ovariana, definida como a capacidade de ovular e desenvolver corpo lúteo regularmente.

2.5.2. Fatores que interferem na obtenção do oócito

Alguns fatores podem influenciar a eficiência da técnica de aspiração folicular, interferindo no pleno desenvolvimento do procedimento. A própria anatomia folicular tem sido relacionada como um fator de complicação para recuperação de oócitos equinos. Isto parece estar relacionado à processos celulares emitidos pelas células da granulosa e que penetram às células da Teca, atuando como uma âncora. No folículo preovulatório (≥ 35 mm de diâmetro), a maturação final do oócito é acompanhada pela expansão das células do *Cumulus*, promovendo a liberação do oócito da parede folicular, aumentando a recuperação oocitária (HAWLEY; ENDERS; HINRICHS, 1995). Outra característica inerente ao ovário equino é o baixo número de folículos visíveis, quando comparado ao de outras espécies. Em média, visualiza-se 6,6 folículos por ovário em equinos (GALLI et al., 2007) enquanto em bovino é possível visualizar em torno de 12 (LANDIM-ALVARENGA et al., 2008 *apud* SENEDA, 2001).

Um recurso que vem sendo empregado há anos com resultados satisfatórios para a produção *in vitro* de embriões, na espécie bovina, é o uso de oócitos provenientes de matadouro, além da total liberdade para realizar pesquisas com estes materiais (SENEA; GARCIA, 2002). Em equinos, a escassez de ovários oriundos de abatedouros limita o avanço nas pesquisas em que o oócito está envolvido. A utilização deste tipo de material é uma boa alternativa para fins de pesquisa e representa uma importante ferramenta no desenvolvimento de algumas biotecnologias de reprodução assistida equina (LANDIM-ALVARENGA et al., 2008).

Entretanto, a manipulação do ovário isolado também pode sofrer influência devido a forte adesão do oócito à parede folicular (HINRICHS, 1998). Desta maneira, a obtenção desses oócitos por aspiração do folículo utilizando uma agulha e seringa, semelhante ao procedimento realizado em ovários bovinos, apresenta baixa taxa de recuperação oocitária em equinos, com uma grande parte dos oócitos recuperados sendo separados das células do *cumulus* (HINRICHS; DIGIORGIO, 1991; ALM et al., 1997). Por outro lado, taxas de recuperação elevadas e complexos *cumulus* oócito intactos podem ser conseguidos com a ruptura do folículo associada a escarificação da camada de células da granulosa mural. Entretanto, essa técnica aumenta consideravelmente o tempo necessário para coletar oócitos de grande número de ovários isolados (HINRICHS et al., 1993).

A fase do ciclo estral também exerce influência sobre a taxa de recuperação de oócitos, além de influenciar a quantidade e a qualidade das estruturas recuperadas. Cook et al. (1993) descreveram taxa de recuperação de oócitos de 63% oriundo de folículos preovulatórios enquanto que durante o diestro a taxa de recuperação de oócitos foi de 19%. A aspiração de folículos imaturos permite aumentar o número de folículos puncionados, porém a taxa de recuperação oocitária é inferior (LANDIM-ALVARENGA et al., 2008). A razão para baixa taxa de recuperação oocitária de folículos imaturos em equinos parece ser relacionada à anatomia de aderência do oócito na parede folicular. Quando comparado ao bovino, o oócito equino localiza-se mais próximo à parede folicular, apresentando poucas fenestras ao longo das células do *cumulus* com uma base mais ampla. Além disso, as células do *cumulus* em equinos apresentam processos que se projetam para o interior das células da Teca localizadas imediatamente abaixo do *cumulus*, assemelhando-se a uma âncora que fixa o complexo *cumulus* oócito a parede folicular (HAWLEY; ENDERS; HINRICHS, 1995).

No folículo preovulatório, somente o procedimento de aspiração folicular se mostra suficiente para promover a liberação do oócito. Em folículos pequenos é necessário também realizar a lavagem do folículo bem como a escarificação da parede folicular para remover o oócito. Este procedimento se apresenta de grande dificuldade em folículos com diâmetro entre 20 e 35mm (HINRICHS, 1998)

Os equipamentos e os níveis de pressão negativa empregados na recuperação de oócitos variam entre os autores. Kanitz et al. (1995) afirmam que a taxa de recuperação de oócitos é influenciada pela pressão utilizada.

Bruck et al. (1992) e Hinrichs et al. (1998) utilizaram uma seringa de 50 mL para realizar a punção folicular. Entretanto, a bomba de vácuo é empregada pela maioria dos autores. Pressões entre 70mmHg e 400mmHg são relacionados, sendo 70 a 90mmHg (MEINTJES et al., 1995), 100 a 150mmHg (MARI et al., 2005), 150mmHg (CARNEVALE, 2001; 2003; 2005), 230 a 300mmHg (DUCHAMP et al., 1995; MEINTJES et al.; 1995a) e 400mmHg (KANITZ et al., 1995). Para quantificar a pressão negativa de maneira mais precisa, alguns autores sugerem mensurar o vácuo em volume de água por minuto.

Pressões negativas de até 300mmHg apresentam bons índices de recuperação oocitária. Utilizando as pressões acima citadas, vários autores obtiveram diferentes taxas de recuperação por folículo aspirado: Carnevale et al. (2001), 70% (39/56);

Carnevale et al. (2003), 76% (331/434); Mari et al. (2005), 30,8% (16/52); Carnevale et al. (2005), 77% (548/710). Entretanto, utilizando 400mmHg, Kanitz et al. (1995) afirmam que esta pressão provocou perda das células do *cumulus*. Pycock (1996) reitera que pressões muito elevadas podem lesionar os oócitos. Kanitz et al. (1995) utilizaram 14 ovários de abatedouro e obtiveram 37 complexos *cumulus* - oócito (COC) de 134 folículos entre 5 e 46mm de diâmetro utilizando pressão 0,2 ou 0,4 bar (1 mmHg = $1,333 \times 10^{-3}$ bars). Não houve diferença na taxa de recuperação (28,8% x 26,4%) quando comparadas as duas pressões de vácuo.

Alguns autores utilizaram pressão para a lavagem do folículo, além da pressão utilizada na aspiração. Bogh et al (2002) obtiveram entre 45-50% de recuperação de oócitos, a partir de folículos de até 30mm, utilizando 500mmHg para a lavagem. Duchamp et al (1995) observaram 29% de recuperação oocitária aproximadamente, efetuando lavagem com fluxo contínuo de 500mmHg e utilizando agulha de lúmen duplo, índice superior ao obtido com lúmen simples e pressão de 380mmHg na lavagem (23%, $p < 0,05$).

2.5.3. Transferência de oócitos e GIFT

O primeiro potro nascido oriundo de TO ocorreu no final da década de 80 (MCKINNON et al., 1988). Entretanto, a eficiência da técnica não foi comprovada devido à obtenção de apenas duas gestações (13%) e um potro nascido oriundo de 15 oócitos transferidos (1/15, 7%). Posteriormente, resultado expressivo (92%, 11/12) de desenvolvimento embrionário (detectado por ultrassonografia aos 12 dias) foi alcançado por Carnevale; Ginther (1995) a partir de oócitos recuperados de éguas jovens. Neste experimento, os oócitos foram cultivados *in vitro* antes de serem transferidos para receptoras inseminadas no oviduto. Entretanto, esses autores obtiveram apenas 31% (8/26) de desenvolvimento embrionário quando utilizaram doadoras velhas, indicando a idade avançada e a baixa qualidade do oócito e o trato reprodutivo da doadora como as principais causas para a baixa eficiência da técnica.

A primeira vez que a técnica foi realizada com fins comerciais foi na Universidade do Estado do Colorado (CSU), a partir de 1998 (CARNEVALE et al., 2001). Os autores relatam entre 30 e 40% de taxa de gestação em éguas de diferentes graus de subfertilidade, creditando à qualidade do sêmen utilizado e, principalmente, à qualidade dos oócitos recuperados como os principais fatores que afetam o sucesso do

programa. Em 2004 e 2005, os mesmos fatores influenciaram os resultados do programa de TO, da CSU, segundo Carnevale et al. (2005).

Na técnica de GIFT, utiliza-se sêmen com 200.000 a 500.000 espermatozoides para a inseminação, permitindo a utilização de garanhões de baixa fertilidade, sêmen fresco, resfriado, congelado ou sexado (COUTINHO DA SILVA, 2002; 2004). A primeira vez em que se obteve sucesso utilizando a técnica de GIFT foi em 1998 (CARNEVALE et al., 1999). Coutinho da Silva et al. (2002) utilizaram a técnica de GIFT com sêmen fresco de 200.000 espermatozoides, alcançando 82% (9/11) de taxa de gestação. Entretanto, a taxa de desenvolvimento embrionário obtido utilizando sêmen resfriado e congelado foram de 25% (4/16) e 8% (1/12), respectivamente.

2.5.4. ICSI - Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

A produção *in vitro* (PIV) de embriões, técnica largamente utilizada na reprodução assistida em humanos, bovinos, ovinos e suínos, não apresenta o mesmo sucesso para a espécie equina. Alguns estudos vêm sendo realizados visando melhores resultados desta técnica, tais como Wirtu et al. (2004). Entretanto, segundo Landim-Alvarenga et al. (2008), os dados disponíveis são de difícil interpretação devido às variações na técnica utilizada pelos diferentes centros de reprodução assistida. A PIV na espécie equina apresentou pouca evolução, obtendo-se o nascimento de apenas dois potros (PALMER et al., 1991; SQUIRES et al., 1996), ambos provenientes de oócitos maturados *in vivo*.

As razões para resultados insatisfatórios com PIV de oócitos equinos permanecem obscuras. Capacitação espermática (ALM et al., 2001; HINRICHS et al., 2002), maturação oocitária (LI; MORRIS; ALLEN, 2001) e alterações na zona pelúcida (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001) são algumas possíveis razões para o baixo sucesso da técnica. Cochran et al. (1998) afirmam que os baixos índices obtidos podem estar relacionados também a inabilidade de se coletar um grande número de oócitos de boa qualidade. Allen (2005) acrescenta a relativa baixa capacidade de se recuperar oócitos maturados *in vivo* pelo método OPU.

Na tentativa de melhorar os resultados da PIV em equinos devido à baixa eficiência da técnica padrão, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) vem sendo cada vez mais estudada. A ICSI é uma técnica bastante difundida em

reprodução assistida humana em casos de subfertilidade masculina. Clinicamente, a ICSI tem sido utilizada na produção de potros provenientes de garanhões que apresentam números baixos de espermatozóides. Para o seu emprego, é necessário obter oócitos maturados. Isso pode ser obtido por aspiração do folículo preovulatório ou obtido possivelmente por maturação *in vitro* de oócitos coletados de folículos pequenos, imaturos, de ovários de abatedouro ou pela aspiração de pequenos folículos imaturos (SQUIRES, 2005).

Na ICSI, é feita uma injeção de espermatozóide diretamente no citoplasma do oócito maturado que apresenta o primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico utilizando uma fina pipeta. Outros métodos dependem da presença de espermatozóides funcionalmente capacitados.

3. Material e Métodos

3.1. Animais e ultra-sonografia

O trabalho foi realizado na área de Reprodução Animal do DRAA/IZ/UFRRJ, localizado no município de Seropédica (LAT 22°46'17.44" S e LONG. 43°40'25.98" O), estado do Rio de Janeiro, durante a estação de monta (2011/2012). Foram utilizadas oito éguas cíclicas doadoras de oócitos. Todas as doadoras pesavam entre 270 e 440kg, foram mantidas em piquetes com capim e água fresca *ad libitum*, suplementadas com sal mineral e ração concentrada, 1,0% PV diariamente.

As éguas foram submetidas à aspiração folicular utilizando três diferentes pressões negativas por três ciclos estrais consecutivos, da seguinte maneira: G₁₅₀= 150 mmHg (n=6); G₂₈₀= 280 mmHg (n=7); G₄₀₀= 400 mmHg (n=6). A cada ciclo estral, sorteava-se o grupo que a égua participaria, sendo que cada animal integrou um grupo somente uma vez.

Durante o estro, a atividade ovariana das éguas foi monitorada diariamente através da técnica ultrassonográfica transretal até que o maior folículo atingisse pelo menos 35mm de diâmetro e apresentasse edema endometrial grau 2,5 (SAMPER, 1997), quando então era administrado 1000UI de hCG, por via endovenosa (EV). A avaliação ultrassonográfica do trato reprodutivo prosseguiu até em torno do sétimo dia após a punção folicular.

3.2. Aspiração folicular e recuperação oocitária:

Para realização do procedimento, as éguas foram sedadas utilizando 0,5mg/kg, IV, de Cloridrato de Xilazina a 10%, 0,01mg/kg, IV, de Cloridrato de Detomidina. Para obtenção de relaxamento retal foi utilizado 0,2mg/kg de Hyoscina N-butyl bromide (Butilescopolamina). As éguas receberam duas doses de 1mg/kg, de Flunixin Meglumine, IV, sendo a primeira dose administrada antes do procedimento de aspiração e a segunda 24 horas após, visando ação analgésica e antiinflamatória. Foi realizada antibioticoterapia com Enrofloxacina 10% (5mg/kg), por 3 dias, a cada 24 horas, IM. As éguas contidas em brete tiveram a bexiga esvaziada através de sonda uretral, que era mantida durante todo o procedimento, visando evitar possível interferência da bexiga repleta durante a realização da técnica.

O folículo preovulatório das éguas doadoras foi puncionado em torno de 30 a 36 horas após a aplicação do hCG para que os oócitos estivessem no estágio final de

maturação, visando aumentar a chance de recuperação e para que não fosse necessário maturar. O oócito foi coletado por aspiração folicular guiada por um aparelho de ultrassonografia, de acordo com Cook et al. (1993). Aproximadamente 24 horas após a administração de hCG, as éguas eram submetidas a exame ultrassonográfico a cada seis horas para avaliação folicular. Caso houvesse indicação iminente de ovulação (forma irregular, redução do tônus, redução do diâmetro, parede hiperecótica, debris hiperecóticos no antro) ou formação de folículo hemorrágico, o folículo era imediatamente aspirado. Com isto visava-se recuperar o oócito ainda viável, como relatado por Carnevale et al. (2001).

Para a aspiração transvaginal foi utilizado aparelho de ultrassonografia (Mindray DPS 2200 Vet, São Paulo, Brasil) equipado com um transdutor convexo de 6,5mHz com guia de polietileno contendo uma agulha de duplo lúmen 12Gauge. O procedimento para aspiração foi realizado conforme preconizado por Carnevale (2004). O transdutor era posicionado no fórnice da vagina, ipsilateral ao folículo preovulatório. O ovário era manipulado por via transretal e o folículo posicionado sobre a linha de aspiração visualizada no ultrassom. A agulha era posicionada de modo a atravessar a parede vaginal e folicular. O conteúdo folicular foi aspirado com o auxílio de uma bomba de sucção com pressão negativa de acordo com o grupo experimental. O antro folicular era lavado com 180ml de DPBS (Dulbecco's phosphatebuffered saline), suplementado com 10 UI/ml de heparina para evitar aderência e 1% Soro Fetal Bovino. Os procedimentos de infusão e aspiração eram realizados simultaneamente e continuamente visando realizar a lavagem do folículo em fluxo contínuo. O meio e os equipamentos que entraram em contato com o oócito durante a manipulação foram mantidos a 38°C.

Os oócitos foram graduados baseado em sua morfologia, utilizando estereomicroscópio, segundo Gonçalves et al. (2002), a saber: grau 1 (*cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom); grau 2 (*cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida); grau 3 (*cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, degenerado,

vacuolado, ou fragmentado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; grau 4: oócito desnudo sem *cumulus*.

O fluido folicular foi aspirado separadamente em frasco tipo Erlenmeyer para ser examinado minuciosamente ao estereomicroscópio. O restante do conteúdo coletado foi transferido para uma Placa de Petri (146x21mm) e examinado minuciosamente ao estereomicroscópio (aumento 40x) para localização do oócito.

3.3. Análise estatística

Para avaliar o efeito das diferentes pressões sobre a recuperação oocitária, foi utilizado o teste Qui-Quadrado (a 5% de significância) e Fisher Exato, quando recomendado.

4. Resultados e Discussão

Foram aspirados 19 folículos preovulatórios (diâmetro $36,1 \pm 1,80$ mm) e recuperados seis oócitos (31,6%), distribuídos nos três grupos (tabela 1). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p=0,59$). Inicialmente, pretendia-se utilizar 21 folículos, porém dois ciclos foram descartados (um ciclo do grupo G_{150} e outro do G_{400}), pois no momento da aspiração o folículo rompeu e não foi possível realizar o procedimento, totalizando 19 folículos aspirados. As sessões de aspirações ocorreram $32,5 \pm 1,9$ h após a administração do hCG.

Tabela 1. Taxa de recuperação oocitária por grupo experimental.

	G₁₅₀	G₂₈₀	G₄₀₀	Total
Oócitos por grupo	16,7 % (1/6)	42,9 % (3/7)	33,4 % (2/6)	31,6% (6/19)

Não houve diferença estatística ($p>0,05$).

Na literatura, é possível encontrar uma ampla variação nas taxas de recuperação oocitária. É descrito de 8% a 85% de recuperação (PYCOCK, 1996; CARNEVALE et al., 2001). A taxa de recuperação encontrada no presente trabalho foi de 31,6% (oócito/folículo), dentro desta variação de resultados apresentada pela literatura.

Apesar de os equipamentos e materiais utilizados no presente estudo serem semelhantes aos empregados em outros centros de pesquisa nos EUA, os resultados aqui obtidos são inferiores aos observados em alguns deles, como Coutinho da Silva et al. (2004) com 74% e Carnevale et al. (2005) com 77% de taxa de recuperação oocitária. Porém, superiores ao observados no Brasil, como relatado por Rodrigues (2006) que obteve 7,5% de recuperação e Blanco (2008), que obteve 13,7%.

Diversos fatores no desenvolvimento da técnica podem influenciar a taxa de recuperação. Segundo Hafez; Hafez, (2000) a turbulência criada pelo lavado pode facilitar a liberação dos oócitos em folículos preovulatórios, se as células do *cumulus* e da granulosa apresentarem pequena conexão devido ao processo final de maturação. Shabpareh et al. (1993) e Mari et al. (2005) observaram diferença significativa na recuperação de oócitos de folículos lavados e não lavados (44% contra 24% e 47% contra 12,5%, respectivamente). McKinnon et al. (1988) também observaram um aumento na taxa de recuperação de oócitos quando folículos foram lavados durante a

aspiração pelo flanco, com o animal em estação. A técnica de lavagem dos folículos com fluxo contínuo após a aspiração foi empregada neste experimento e pode ter sido um fator que tenha colaborado para a recuperação oocitária no presente estudo. No momento da aspiração, o fluido folicular foi aspirado separadamente, onde não localizou nenhum dos oócitos. Todos os oócitos foram localizados no DPBS utilizado para a lavagem do folículo. A lavagem do folículo também foi recomendada por Hinrichs et al. (1990), que relataram encontrar 50% (12/24) dos oócitos no fluido relativo ao lavado.

A pressão negativa da bomba de vácuo pode ser um dos principais fatores a influenciar a recuperação oocitária. Utilizando pressão negativa de 150mmHg para aspirar folículos de diâmetro preovulatório (≥ 35 mm), Mari et al. (2005) obtiveram 30,8% (16/52) de recuperação oocitária. Entretanto, os autores não utilizaram agentes indutores de maturação folicular e oocitária, ao contrário da metodologia empregada no presente estudo. Utilizando a mesma pressão negativa da bomba de vácuo (150mmHg), a taxa de recuperação oocitária obtida no presente experimento foi 16,66 % (1/6), inferior àquela observada por Mari et al. (2005). Talvez essa inferioridade possa ser explicada pela utilização da técnica de escarificação da parede folicular, que foi utilizada por Mari et al (2005), mas não foi empregada no presente experimento devido a dificuldade causada pelo diâmetro folicular preovulatório (≥ 35 mm). Ou até mesmo influenciada pelo menor número de aspirações foliculares realizadas no presente experimento.

No programa comercial estabelecido na Universidade do Colorado, foram alcançados índices expressivos de recuperação oocitária por folículo aspirado: 70% (39/56) de recuperação durante os anos 1998 e 1999 (CARNEVALE et al., 2001), 76% (331/434) entre os anos 2000 e 2002 (CARNEVALE et al., 2003) e 77% (548/710) quando feito o levantamento dos dados dos anos de 2000 a 2004 (CARNEVALE et al., 2005). Em todos estes anos foi utilizada pressão de 150mmHg e aspirou-se folículos de diâmetro preovulatório (≥ 35 mm). A dose de hCG empregada foi 1500 a 2500UI e, em alguns casos, associado ao Acetato de Deslorelina (2,1mg), diferentemente, do protocolo utilizado no presente estudo. Scott et al. (2001) utilizaram protocolo semelhante ao empregado por Carnevale et al. (2001; 2003; 2005) e obtiveram 43% (16/37) de oócitos recuperados. Apesar do uso de 2000UI de hCG, Scott et al. (2001) relataram que a baixa taxa de recuperação oocitária pode ter sido influenciada pelo fato

de algumas éguas não responderem ao uso da gonadotrofina, visto que 50% dos oócitos recuperados apresentaram camada de células do *cumulus* compacta. Além disso, os autores afirmaram também que a pouca experiência dos técnicos pode ter influenciado os resultados. A pouca experiência no desenvolvimento da técnica também pode ter sido um dos fatores determinantes para que as taxas de recuperação oocitária obtidas no presente experimento fossem inferiores a alguns trabalhos encontrados na literatura.

Apesar do uso de 1000UI de hCG no presente estudo ser menor que todas as doses utilizadas pelos trabalhos encontrados na literatura (quadro 1), a taxa de recuperação oocitária alcançada está dentro da variação descrita na literatura (8 a 85%) e superior a alguns estudos em que se utilizou dose maior, o que pode demonstrar não ser a dose do hCG empregada o principal fator a influenciar a recuperação oocitária. Além disso, apenas 20% (1/5) apresentou células do *cumulus* compacta, o que representa que a maioria das éguas respondeu ao uso do hCG, mesmo utilizando menor dose. Um dos oócitos recuperados apresentou-se desnudo no G₄₀₀ (tabela 2).

A taxa obtida no G₂₈₀ (42,85%, 3/7) foi inferior à recuperação obtida por Bogh et al. (2002), que alcançaram 68% (15/22) de recuperação oocitária utilizaram agulha de lúmen simples e pressão negativa entre 200 e 300mmHg, e visaram avaliar, dentre outros objetivos, a influência do extrato de pituitária equina (25mg, i.v) na maturação *in vitro*. O extrato utilizado continha em sua formulação eFSH e eLH, o que pode ter influenciando a taxa de recuperação oocitária.

Por outro lado, a recuperação do grupo G₂₈₀ foi próxima a obtida por Cook et al (1992), que utilizando a pressão negativa de 300mmHg para aspirar folículos preovulatórios, obtiveram 53% (9/17) de recuperação, e semelhante a obtida por Meintjes et al. (1995a) utilizando pressão de 90mmHg, o que permitiu alcançarem 43% (12/28) em folículos pré-ovulatórios e com emprego de hCG. Foi superior a observada por Duchamp et al. (1995), que obtiveram 18% (14/77) de recuperação aspirando folículos de diâmetros entre 20 e 30mm utilizando pressão de 300mmHg.

A taxa de recuperação do G₄₀₀ também foi superior à obtida por Kanitz et al. (1995), único trabalho encontrado na literatura que utilizou esta pressão para aspiração folicular em éguas, que relataram 8,3% (1/12) para folículos medindo acima de 30mm. Esta pressão foi associada por Kanitz et al. (1995) com a perda das células do *cumulus* pelos oócitos. Entretanto, no presente estudo, não é possível afirmar que a elevada pressão foi responsável pela perda das células do *cumulus* devido ao pequeno número

de oócitos obtidos neste grupo. Em éguas, existe a necessidade de mais estudos utilizando pressões acima de 300mmHg para aspiração folicular transvaginal visando confirmar os mesmos efeitos deletérios ao oócito.

O emprego de pressão negativa de 90mmHg por Meintjes et al. (1995), obtendo resultado semelhante ao G₂₈₀, sugere que a pressão negativa da bomba de vácuo pode não ser o principal fator para obter boa taxa de recuperação em éguas.

A dose a ser administrada de hCG foi escolhida por Meintjes et al. (1995a) de acordo com o diâmetro do folículo preovulatório. Para folículos medindo entre 32 e 35mm de diâmetro, os autores utilizaram 1500UI de hCG e para diâmetros entre 35 e 38mm administraram 2500UI. Entretanto, não foi divulgada a taxa de recuperação obtida para cada dose utilizada, visto que o objetivo do experimento foi comparar a taxa de recuperação oocitária entre éguas pônei com folículos em desenvolvimento (46,8%, 29/62), éguas com folículos preovulatórios (42,9%, 12/28) e éguas gestantes (25/33, 76%), que foi significativamente maior. No presente estudo, a dose de 1000UI de hCG foi escolhida baseada nos resultados prévios de taxa de ovulação (89,52%, 111/124) obtida até 48 horas por Jacob et al. (2011) utilizando 1000UI.

Utilizando 2500UI de hCG foi possível obter 50,7% (33/65) de recuperação oocitária de folículos preovulatórios (FRANZ et al., 2001). Entretanto, a resposta inadequada ao hCG (recuperação de oócitos não expandidos) também foi indicada como possível causa para a baixa taxa de recuperação oocitária, quando comparada aos demais trabalhos reportados pela literatura.

Maior parte dos oócitos (84%, 5/6) recuperados neste experimento foram classificados como grau 1 (66,7%, 4/6) ou grau 2 (16,7%, 1/6), porcentagem próxima à observada por Cook et al. (1992), que relataram 89% (8/9) dos oócitos recuperados graduados como bom, com apenas um dos oócitos graduado como degenerado. No presente experimento, somente um dos oócitos apresentou-se como desnudo (grau 4), no G₄₀₀ (tabela 2), ou seja, 50% (1/2) dos oócitos recuperados neste grupo. Devido ao pequeno número de oócitos recuperados, não foi possível afirmar se o desnudamento foi ocasionado pela elevada pressão (400mmHg).

A distribuição dos oócitos obtidos nos grupos experimentais de acordo com a qualidade apresentada encontra-se na tabela 2.

Tabela 2. Morfologia dos oócitos recuperados de acordo com o grupo experimental.

Classificação	G ₁₅₀	G ₂₈₀	G ₄₀₀
Grau 1	100% (1/1)	66,7% (2/3)	50% (1/2)
Grau 2	-	33,4% (1/3)	-
Grau 3	-	-	-
Grau 4	-	-	50% (1/2)

A pressão de 150mmHg requer maior tempo para realização das lavagens dos folículos preovulatórios, o que pode propiciar falhas como a perda do folículo durante o processo. Já a maior pressão empregada no presente estudo (400mmHg) apresenta certo grau de dificuldade prática para ser utilizada, exercendo forte sucção no êmbolo da seringa de 60mL usada para infundir o DPBS. Em outros casos, no momento em que se infundia o DPBS, este era imediatamente vertido para dentro do Erlenmeyer ou, por vezes, quase sendo aspirado para dentro da própria bomba de vácuo. Isto ocorria devido a elevada pressão que causava um descontrole na direção do líquido infundido.

Em relação à fertilidade das éguas utilizadas no presente estudo, não observou-se qualquer tipo de infecção, aderência, abscesso ou reação inflamatória, demonstrando ser suficiente o protocolo realizado com antibiótico e antiinflamatório. As éguas utilizadas também permaneceram apresentando ciclos estrais regulares sem aparentes alterações na fertilidade, apesar de não terem sido cobertas ou inseminadas, como realizado por Mari et al. (2005), em que se obteve 70% (7/10) de gestação após serem submetidas à OPU. Bruck; Synnestvedt; Greve (1997) aspiraram folículos por cinco ciclos estrais consecutivos em dois diferentes intervalos, a cada seis e a cada 23 dias, o que demonstrou que as aspirações apresentaram uma menor taxa de recuperação de oócitos para as aspirações realizadas a cada seis dias. No presente estudo, o intervalo entre as sessões de aspirações foliculares foi de $17,4 \pm 3,9$ dias devido ao fato de somente

ser puncionado folículos de diâmetro preovulatório e em todos os ciclos observou-se à ultrassonografia estrutura semelhante ao corpo lúteo após as aspirações.

O protocolo anestésico utilizado foi satisfatório em grande parte das aspirações. Em algumas delas foi necessário realizar novas aplicações de Cloridrato de Xilazina 10% para alcançar o nível de sedação considerado adequado. Não houve caso de animais que perdessem a consciência ou caíssem devido ao plano anestésico. Esta técnica requer especial atenção com o nível de sedação do animal, pois qualquer movimento durante a aspiração pode influenciar na execução da técnica, como ocorreu nos dois ciclos que foram descartados devido à perfuração do folículo e consequente extravazamento do conteúdo. Isto foi devido à movimentação excessiva das éguas. Em um dos casos não utilizou-se Butilescopolamina para promover o relaxamento retal e, portanto, facilitar a manipulação ovariana. Segundo Mari et al. (2005), o uso de fármacos com esse objetivo podem facilitar o posicionamento do ovário para a aspiração. Entretanto, no presente estudo, não utilizar o medicamento em um dos ciclos não impediu a realização do procedimento, sendo recuperado um oócito grau 1 (G₁₅₀).

5. Conclusão

Através dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- a pressão negativa da bomba de vácuo utilizada não se mostrou determinante para elevar a recuperação oocitária, mesmo empregando pressão considerada elevada (400mmHg);
- A dose de hCG foi eficiente em promover a maturação oocitária 36 horas após administração;
- o protocolo anestésico empregado também se mostrou eficiente para a realização da aspiração folicular.

6. Referências Bibliográficas

ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S.; NURNBERG, G.; KANITZ, W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 56, p. 817-829, 2001.

ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; BECKER, F.; HINRICHS, K. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. **Equine Veterinary Journal Supplements**, v. 25, p. 47-50, 1997.

ALLEN, W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 40, p. 310-329, 2005.

AMIRIDIS, G. S.; TSILIGIANNI, T.; VAINAS, E. Follicle ablation improves the ovarian response and the number of collected embryos in superovulated cows during the early stages of lactation. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p. 402-7, 2006.

BERGFELT, D.R.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares, **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 426-432, 2001.

BLANCO, I.D.P. Efeito do tratamento com Extrato de Pituitária Equina (EPE) e hCG no índice de recuperação de oócitos e maturação folicular em equinos. Botucatu. 2008. 104p. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

BOGH, I. B.; BÉZARD, J.; DUCHAMP, G.; BALTSSEN, M.; GÉRARD, N.; DAELS, P.; GREVE, T. Pure preovulatory follicular fluid promotes *in vitro* maturation of *in vivo* aspirated equine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1765-1779, 2002.

BOGH, I.B.; BRINK, P.; JENSEN, H.E.; LEHN-JENSEN, H.; GREVE, T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 6, p. 575-579, 2003.

BRACHER, V.; PARLEVLIT, J.; FAZELI, A.R.; PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J.; TAVERNE, M. A. M.; COLENBRANDER, B. Repeated

transvaginal aspiration ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 25(15), p. 75-78, 1993.

BRUCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound – guided technique. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p. 58 -59, 1992.

BRUCK, I., SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. **Theriogenology**, 47, 1157-1167, 1997.

CARNEVALE, E.M., ALVARENGA, M.A., SQUIRES, E.L., CHOI, Y.H. Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In: Annual Conference Society for Theriogenology, 1999... **Proceedings**, Nashville, TN, p. 44, 1999.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 231 – 246, 1994.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, p.331-333, 1993.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology Reproduction Monograph Series I**. v.1, p. 209–214, 1995.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SCOTT, T.J.; SQUIRES, E.L. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 981-987, 2000.

CARNEVALE E.M.; COUTINHO DA SILVA M.A.; MACLELLAN, L.J.; NEVES NETO, J. R.; SQUIRES, E. L. Effects of culture media and time of insemination on oocyte transfer **Theriogenology**, v.58, p.759-762, 2002.

CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; MACLELLAN, L.J.; ALVARENGA, M.A.; THOMAS, J.S. Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 1,p.87-91, 2001.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L.J.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; CHECURA, C. M.; SCOGGIN, C. F.; SQUIRES, E. L. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 305–314, 2001b.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SQUIRES, E.L.; How to collect and transfer oocytes. In: 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners ... **Proceedings**, New Orleans, LA, p. 293–294, 2003.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SQUIRES, E.L. Pregnancies obtained after collection and transfer of oocytes from ovaries of live euthanatized mares. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 222, p. 60-62, 2003b.

CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gameta intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 617-624, 2004.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKESA; J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 519-527, 2005.

CARNEVALE, E. M. Collection and Transfer of Oocyte in Mares. In: Samper, J.C.; Pycock, J.F.; McKinnon, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier, seção VI, 292 p., 2007.

COCHRAN, R.; MEINTJES, M.; REGGIO, B.; HYLAN, D.; CARTER, J.; PINTO, C.; PACCAMONTI D; GRAFF, K.J.; GODKE, R.A. Live foals from sperm-injected oocytes harvested from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 503-512, 1998.

COOK, N.L.; SQUIRES, E.L.; RAY, B.S.; JASKO, D.J. Repeated transvaginal follicular aspiration in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 39, p. 204, 1993. Abstract.

COOK, N.L.; SQUIRES, E.L.; RAY, B.S.; COOK, V.M.; JASKO, D.J.. Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: preliminary results. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 12, p. 104–107, 1992.

COUTINHO DA SILVA, M.A.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; PREIS, K.A.; LEAO, K.M.; SQUIRES, E.L. Use of fresh, cooled and frozen semen during gameta intrafallopian transfer in mares. **Theriogenology**, v.58, p.763-766, 2002. Abstract.

COUTINHO DA SILVA, M.A.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L. J.; SEIDEL, JR. G.E., SQUIRES E. L. Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1275-1279, 2002b.

COUTINHO DA SILVA, M.A.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; PREIS, K.A.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L. Oocytes transfer in mare with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. **Theriogenology**, Stoneham, Mass., v. 61, p. 705-713, 2004.

D'ALESSANDRIS, C.; CANIPARI, R.; DI GIACOMO, M.; EPIFANO, O.; CAMAIONI, A.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. **Endocrinology**, v.142, p. 3033–3040, 2001.

DELLENBACH, P.; NISAND, I.; MOREAU, L.; FEGER, B.; PLUMERE, C.; GERLINGER, P.; BRUN, B.; RUMPLER, Y. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. **Lancet**, v.30, p. 1467. 1984.

DELL'AQUILA, M.E.; CAILLAUD, M.; MARITATO, F.; MARTORIATI, A.; GÉRARD, N.; AIUDI, G.; MINOIA, P.; GOUDET, G. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 44, p. 1-13, 2004.

DONADEU, F.X.; GINTHER, O. J. Effect of number and diameter of follicles on secretion of inhibit and suppression of FSH in mares. **Reproduction**, v. 121, p. 897–903, 2001.

DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Suppression of circulating concentrations of FSH and LH by inhibin and estradiol during the initiation of follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1423 – 1434, 2003.

DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; PALMER, E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biology Reproduction Monograph**, v.1, p. 233-241, 1995.

EVANS, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 240 - 246, 2003.

FEICHTINGER, W.; KEMETER, P. Transvaginal sector scan ultrasonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. **Fertility and Sterility**, v. 45, p. 722-725, 1986.

FISSORE, R. A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v.124, p.745-754, 2002.

FRANZ, L.C.; SQUIRES, E.L.; O'DONOVAN, M.K.; SCOTT, T.J.; CARNEVALE, E.C. Collection and *in vitro* maturation of equine oocytes from estrus, diestrus and pregnant mares. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 21, p. 26-32, 2001.

GALLI, C.; OLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 39-55, 2007.

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

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

GASTAL, E. L.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Ultrasound-guided intrafollicular treatment in mares. **Theriogenology**, v. 44, p. 1027-1037, 1995.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare. Ed. Equiservices, 2^a edição, Wisconsin, EUA, 178 p., 1992.

GINTHER, O.J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.18-25, 1993.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses, Book 2. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, Madison, EUA, 394p., 1995.

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

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. **Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2004.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17- β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311–317, 2009.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL M. O.; BEG M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 315-323, 2005.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL M. O.; BEG M. A. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 454-460. 2008.

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

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Ed. Roca, 2ª edição, 408 p., 2008.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**. v. 57, p.232–245, 1997.

HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 243–252, 1995.

HAFEZ; E.S.E.; HAFEZ, B. Reproduction in farm animals. Ed. Manole, 7ª edição, Baltimore, EUA, 74 p. 2000.

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

HINRICHS, K.; BETSCHAT, R.W.; MCCUE, P.M.; SQUIRES, E.L. Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 56, p. 493-498, 2000.

HINRICHS, K.; DIGIORGIO, L.M. Embryonic development after intrafollicular transfer of horse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 369-374, 1991.

HINRICHS, K.; KENNEY, D.F; KENNEY, R.M. Aspiration of oocyte mature and immature preovulatory follicles in the mare. **Theriogenology**, v. 34, p. 107 – 112, 1990.

HINRICHS, K.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; CHOI, Y.H.; VARNER, D.D. *In vitro* fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 256-262, 2002.

HINRICHS, K.; MATTHEWS, G.L.; FREEMAN, D.A.; TORELLO, E.M. Oocyte transfer in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, p. 982-986, 1998.

HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function and peripheral plasma gonadotropin concentration in the mare. **Biology of Reproduction**, v.44, p.292-298, 1991.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A.L.; FRIEDMAN, P.P.; SELGRATH, J.P.; MARTIN, M.G. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 363-370, 1993.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A.L.; SEIGRATH, J.P. Activation of horse oocytes. **Biology Reproduction Monograph Series 1**, p. 319-324, 1995.

JACOB, J.C.F.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 248–254, 2009.

JACOB, J.C.F. Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades. Viçosa, 2009. 62 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

JACOB, J.C.F.; SANTOS, G.O.; SÁ, M.A.F.; OLIVEIRA, J.P. Uso clínico de hCG em um programa de transferência embriões equino: mitos e verdades. **A hora veterinária**, v. 30, p. 9-13, 2011.

KANITZ, W.; BECKER, F.; ALM, H.; TORNER, H. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biology Reproduction Monographs**, v. 1, p. 225-231, 1995.

KANITZ, W.; BECKER, F.; SPITSCHAK, M.; TORNER, H. Methods and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. In: 9th Scientific Meeting AETE... **Proceedings**, Lyon, p.10-11, 1993.

KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Ovulation for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v. 18, p. 54-55, 2005.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BOYAZOGLU, S.E.A.; SEIDEL JR, G.E.; SQUIRES, E.L. 2001. Effect of fetuin on the zona hardening and cortical granules distribution in equine oocytes matured *in vitro*. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland. Newmarket, UK: R&W Publications. p. 26-27. (Havemeyer Foundation Monograph Series, 3). 2001.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; FERNANDES, C.B.; DEVITO, L.G.; DERUSSI, A.A.P.; BLANCO, I.D.P.; ALVARENGA, M.A. New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.5, p.67-82, 2008.

LENZ, S.; LEETON, J.; RENOU, P. Transvaginal recovery of oocytes for *in vitro* fertilization using vaginal ultrasound. **Journal of *in vitro* fertilization and embryo transfer**, v. 4, p. 51-55, 1987.

LI, X.; MORRIS, L.H.; ALLEN, W.R. Influence of coculture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reproduction**, v. 121, p. 925-932, 2001.

LIMA, W.M.; VIEIRA, A.D.; THALLER NETO, A.; MEZZALIRA, A.; MATOS, R.C.; GREGORY, R.M. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 100, p. 364-70, 2007.

LIU, I.K.M.; LANTZ, K.C.; SCHLAFKE, S.; BOWERS, J.M.; ENDERS, A.C. Clinical observations of oviductal masses in the mare. In: 30th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 1989, Boston. **Proceedings...** Boston, A.A.E.P., 1990, p. 41-45.

MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, L.; STEFANO, B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, vol. 88, p. 299- 308, 2005.

MCKINNON, A.O.; WHEELER, M.B.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 6, p. 306-309, 1986.

MCKINNON, A. O.; CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; VOSS, J. L.; SEIDEL JR., G. E. Heterogenous and xenogenous fertilization of *in vivo* matured equine oocytes. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, p. 143–147, 1988.

MEINTJES, M.; BELLOW, M. S.; BROUSSARD, J. R.; PACCAMONTI, D.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A. Repeated transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from pregnant mares. **Theriogenology**, v.41, p. 255, 1994.

MEINTJES, M.; BELLOW, M. S.; BROUSSARD, J. R.; PAUL, J. B.; GODKE, R. A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for *in vitro* fertilization. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 967-974, 1995.

MEINTJES, M.; BELLOW, M. S.; PAUL, J. B.; BROUSSARD, J. R.; LI, L.Y.; PACCAMONTI, D.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in cyclic and pregnant horse and pony mares for a *in vitro* fertilization. **Biology Reproduction Monograph Series**, v. 1, p. 281, 1995a.

MONTECHIESI, D.F. Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas cíclicas. Botucatu. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

MOZZAQUATRO, F.D.; VERSTEGEN, J.P.; DOUGLAS, R.H.; TROEDSSON, M.H.T.; DELACORTE, F.D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p.56-62, 2010.

PALMER, E.; DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; KING, W.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K. J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes mares. **Journal of reproduction and fertility: Abstract Series**, v. 35, p. 689-690, 1987.

PALMER E, BÉZARD J, MAGISTRINI M, DUCHAMP G. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 375-384, 1991. Supplement.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.C.; CONTI, M. EGF-Like Growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, p. 682-684, 2004.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, TH.A.M.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Characteristic of bovine estrous cycle during repeated transvaginal ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum-pick up. **Theriogenology**, v.35, p. 401-413, 1988.

PURCELL, S.H.; SEIDEL, G.E.; MCCUE, P.M.; SQUIRES, E.L. Aspiration of oocytes from transitional, cycling and pregnant mares. **Animal Reproduction Science**, v.100, p. 291-300, 2007.

PYCOCK, J.F. Recovery of oocytes using transvaginal ultrasound in the mare: current equipment, technique and applications. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 24, p. 148-167, 1996.

RAY, B.S.; SQUIRES, E.L.; COOK, N.L.; TARR, S.F.; JASKO, D.J.; HOSSNE, K.L. Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. **Journal of equine veterinary science**, v. 14, p.27-30, 1994.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**. v. 64, p. 69–92, 2002.

RODRIGUES, R. Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom em equinos. Porto Alegre. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Campus de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SAMPER, J.C. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. In: 43th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 1997, Phoenix, **Proceedings...** Arizona, American Association Equine Practitioner., 1997, p. 189-191.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. Current therapy in equine reproduction. Ed. Saunders Elsevier, 2^a edição, St. Louis, Missouri, 492 p., 2007.

SCOTT, M.A.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; SCOGGIN, C.F.; SQUIRES, E.L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology**, v. 55, p. 705- 715, 2001.

SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M.; OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviduct: abnormalities and their clinical implications. In: 41th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 1995, Lexington, **Proceedings...** Lexington, American Association Equine Practitioner., 1995, p. 1-2.

SENEDA, M.M.; GARCIA, J.M. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p. 101-110, 2002.

SHABPAREH, V.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, JR. G.E.; JASKO, D.J. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.40, p.1161-1175, 1993.

SPICER, L. J.; SANTIAGO, C. A.; DAVIDSON, T. R.; BRIDGES, T. S.; CHAMBERLAIN, C. S. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p. 573 – 581, 2005.

SQUIRES, E.L. Perspectivas para o uso de biotecnologias na reprodução equina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, p.69-82, 2005. Suplemento.

SQUIRES, E.L.; COOK, N. Transvaginal aspiration. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, 1996.

SQUIRES, E.L.; WILSON, J.M.; KATO, H.; BLASZCZYK, A. A pregnancy after Intracytoplasmic Sperm Injection into equine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 45, p. 306, 1996.

STOCK A.E.; BOUCHARD N.; BROWN K.; SPICER A.P.; UNDERHILL C.B.; DORÉ M.; SIROIS J. Induction of hialuran synthase 2 by human Chorionic Gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v.143, p. 4375-4384, 2002.

SUTOVSKY, P.; FLECHON, J.E.; PAVLOK, A. Microfilaments, microtubulus and

intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus-oophorus. **Reproduction and Nutrition Development**, v. 34; p. 415-425, 1994.

TSAFRIFRI, A., CONTI, M., POPLIKER, M., MOTOLA, S., CAO, X., ASHKENAZI, H. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p.77–84, 2005.

VIANA, J.H.M.; BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, p. s1-s4, 2005.

VOGELSANG, M.M.; KRAEMER, D.C.; BOEWN, M.J. Recovery of equine follicular oocytes by surgical and non-surgical techniques. **Theriogenology**, v. 25, p. 208, 1986.

VOGELSANG, M.M.; KREIDER, J.L.; BOWEN, M.J.; POTTER, G.D., FORREST, D.W.; KRAEMER, O.C. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v.29, p. 1007-1019,1988.

WIRTU, G.; BAILEY, T.L.; CHAUHAN, M.S.; PARKER, N.A.; DASCANIO, J.J.; GWAZDAUSKAS, F.C.; LEY, W.B. Xenogenous fertilization equine oocytes following recovery from slaughterhouse ovaries and *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 61, p. 381-391, 2004.