

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

ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIA TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRA-
SOM EM EQÜINOS

Autor: Rafael Rodrigues

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

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2006

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos (UFRGS)

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel (UFPel)

Prof. Dra. Adriana Pires Neves (URCamp)

**“Não existe pesquisa aplicada,
o que existe é a aplicação da pesquisa básica”
(Louis Pasteur)**

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos iniciais são ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Rodrigues e ao meu comandante, Coronel Ângelo Miguel Vieira, Diretor da Coudelaria de Rincão, pelo apoio, confiança, incentivo, ensinamentos e pela oportunidade dada para a realização deste projeto.

Aos colegas de Pós-Graduação, bolsistas e estagiários do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução: Fabiana Forell, Arnaldo Diniz Vieira, Lucila Carboneiro dos Santos, Luiz Felipe Steigleder, Claudia Briani Antonioli, Alexandre Vaz, Mateus da Costa Lange, Cristiano Feltrin, Natália Arruda, Leandro Franke Gonçalves, Eduardo Allix, Felipe Ongarato, Luis Fernando Sesti, ao médico veterinário Frederico Lança Schmitt, aos servidores João Roberto Lopes Moraes e Leda Gomes Mendes agradeço pelo apoio nos experimentos e pelos bons momentos nestes últimos anos .

Aos colegas do REPROLAB pelo convívio amigável e pelo auxílio com artigos e idéias.

Aos companheiros de farda: Tenentes Bogarim, Terra, Ferreira e Bastos pelo auxílio nos experimentos, por manterem a fisionomia da frente e recobrirem a retaguarda enquanto estive ausente.

Aos meus amigos de sempre que, de longe ou de perto, torcem por mim e eu por eles.

Aos meus familiares, especialmente a Rosi e Neimar pelo apoio logístico durante esses anos. Agradeço à minha mãe, Maria Augusta, minhas irmãs Regina, Rejane e Raquel, que tornaram minhas viagens mais agradáveis, ao meu irmão Ricardo que mesmo distante torceu por mim. Aos meus sobrinhos e cunhados, pelo incentivo.

Agradeço a minha esposa, Alessandra Comenale Rodrigues pelo amor incondicional, pela dedicação e apoio durante a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	microlitro
BH	Brasileiro de Hipismo
COC	<i>cumulus</i> -oocyte complex (complexo <i>cumulus</i> -oócito)
IVC	<i>in vitro</i> culture (cultivo <i>in vitro</i>)
EPE	extrato de pituitária eqüina
IVF	<i>in vitro</i> fertilization (fecundação <i>in vitro</i>)
FSH	hormônio folículo-estimulante
G	gauge
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GIFT	gamete intrafallopian transfer (transferência de gametas intrafalopiana)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IA	inseminação artificial
ICSI	intracytoplasmatic sperm injection (injeção intracytoplasmática de espermatozóide)
IM	intramuscular
IV	intravenoso
kg	quilograma
mg	miligramas
MHz	mega hertz
IVM	<i>in vitro</i> maturation (maturação <i>in vitro</i>)
MII	metáfase II
mL	mililitro
mm	milímetro
mm Hg	milímetros de mercúrio
OPU	ovum pick up (punção ovariana)
IVP	<i>in vitro</i> production (produção <i>in vitro</i>)
PSC	Puro Sangue de Corrida
RS	Rio Grande do Sul
SRD	sem raça definida
SUZI	subzonal sperm injection (injeção espermática perivitelínica)
TE	transferência de embrião
TO	transferência de oócito

TN	transferência nuclear-clonagem
TUGA	transvaginal ultrasounguided aspiration (aspiração transvaginal guiada por ultra-som)
TVA	transvaginal aspiration (aspiração transvaginal)
UI	unidade internacional
VA	vagina artificial

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos grupos experimentais de acordo com a pressão (mmHg), tamanho e espessura da agulha (G).....	31
TABELA 2: Percentual de oócitos recuperados por grupo experimental, morfologia das estruturas recuperadas, diâmetro (mm) dos folículos aspirados	35
TABELA 3: Percentual de oócitos recuperados por grupo experimental tratado e não tratado com hCG.....	35

RESUMO

ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIA TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRA-SOM EM EQUINOS

Dissertação de Mestrado

Autor: Rafael Rodrigues

Orientador: José Luiz Rodrigues

A técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (TUGA) foi utilizada pela primeira vez em reprodução assistida de equinos em 1992 e desde então vem sendo aperfeiçoada. Com o crescente interesse nos procedimentos de transferência de oócitos (TO), transferência de gametas intrafallopiana (GIFT) e mais recentemente na transferência nuclear (TN), a recuperação de oócitos de boa qualidade tornou-se um passo fundamental do processo. Diversas técnicas e equipamentos podem ser empregados com esta finalidade. Os experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a taxa de recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios de cinco protocolos de punções. Dois níveis de pressão negativa: Baixa (B) (150 – 200 mmHg) e Alta (A) (250 – 300 mmHg) e três modelos de agulha: curta 14 G (C14); curta 18 G (C18) e longa 18 G (L18) foram testados. Cinquenta e quatro folículos de 48 éguas foram aspirados. Estes animais foram distribuídos completamente ao acaso em cinco grupos experimentais (G) GI: (B-C14) (n=22); GII: (B-L18) (n=3); GIII: (B-L18) (n=18); GIV: (A-C18) (n=5); GV: (A-L18) (n=6). Vinte e duas éguas receberam 2500 UI de hCG, 14 tiveram seus folículos aspirados e 2 oócitos foram recuperados (14,3%) Dos 54 folículos aspirados, 4 oócitos foram recuperados (7,41%): GI (n=1), GIII (n=1) e GIV (n=2). Três destes oócitos foram transferidos para o oviduto de éguas receptoras através das técnicas de GIFT (n=2) e TO (n=1). Não foi observado desenvolvimento embrionário nas receptoras nos 14, 15 e 16 dias pós-transferência.

Palavras-chave: oócito, aspiração folicular, hCG, transferência de gametas.

ABSTRACT

EQUINE TRANSVAGINAL ULTRASOUND-GUIDED FOLLICULAR ASPIRATION

Master's Dissertation

Author: Rafael Rodrigues

Adviser: José Luiz Rodrigues

Follicular transvaginal ultrasound guided aspiration (TUGA) procedure was first used in equine assisted reproduction in 1992 and has been improved since then. With the increased interest in the techniques of oocyte transfer (OT) and gamete intrafallopian transfer (GIFT) and most recently in nuclear transfer (NT), the recovery of a good quality oocyte became an important step in the process. Different methods and equipments can be used with this purpose. The experiment was conducted with the objective to evaluate oocyte recovery rates from preovulatory follicles of five different puncture protocols. Two levels of negative pressure: Low (L) (150-200 mmHg) and High (H) (250-300mmHg) and three needle types: short 14G (S14); short 18G (S18) and long 18G (L18) were tested. Fifty four follicles of 48 mares were aspirated. This animals was randomicaly distribued in five experimental groups (G) GI: (L-S14) (n=22); GII: (L-L18) (n=3); GIII: (L-L18) (n=18); GIV: (H-S18) (n=5); GV: (H-L18) (n=6). Twenty two mares recived 2500UI of hCG, 14 mares had follicules aspired and 2 oocytes were recovered (14,3%). Four oocytes were recovered from 54 follicular aspirations (7, 41%): GI (n=1), GIII (n=1) and GIV (n=2). Three oocytes were transfered into theoviduct of recipient mares through GIFT (n=2) and OT (n=1). It was not observed embryonic development in recipient mares on days 14, 15 and 16 after transfers.

Key words: oocyte, follicular aspiration, hCG, gametes transfer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3 ARTIGO	
ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIA TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRA-SOM EM EQUINOS.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
Animais Experimentais.....	30
Sincronização do Ciclo Estral, Controle e Maturação Folicular, Sedação e Analgesia.....	31
Aspiração Folicular e Avaliação do Conteúdo Folicular	32
Coleta e Preparação do Sêmen.....	33
Transferência de Gameta Intrafallopiana e Transferência de Oócito.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	40
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O processo de seleção genética na espécie eqüina, diferentemente de outras, geralmente está baseado no desempenho esportivo dos animais. Assim, não raro, ao término de sua vida esportiva e, portanto mais velhos, éguas e garanhões são destinados à reprodução.

De forma geral, a senilidade interfere na fertilidade desses indivíduos; nas fêmeas reduzindo drasticamente a qualidade dos oócitos e a capacidade de conceber e gestar do trato reprodutivo e nos machos, afetando o comportamento sexual, a qualidade e a quantidade de espermatozóides do ejaculado.

Na busca de ferramentas capazes de melhorar índices reprodutivos de animais com problemas de fertilidade, uma série de técnicas vêm sendo testadas e aperfeiçoadas.

A Inseminação Artificial (IA), desde a década de 1940 e posteriormente a Transferência de Embriões (TE), tiveram e têm um papel fundamental nos programas de seleção animal. O Brasil é hoje, juntamente com EUA e Argentina, um dos líderes mundiais em número de procedimentos de TE. Dados da Associação Brasileira de criadores do Cavalo Brasileiro de Hipismo (ABCBH) revelam que no ano de 2005 foram realizadas mais de 1000 transferências de embriões na raça. Recentemente foi aceito o registro de produtos oriundos de TE na raça Crioulo. Além disso, as Associações de Criadores do Cavalo Quarto de Milha e do Cavalo Appaloosa têm permitido o procedimento, com o registro de mais de um potro por ano da mesma mãe.

Utilizada com sucesso desde a década de 1980, a TE veio contribuir de forma importante para a resolução de alguns problemas de fertilidade e viabilizar a utilização reprodutiva de indivíduos com valor zootécnico. Entretanto, Carnevale *et al.* (2001b) consideraram como limitante para o emprego desta técnica a incapacidade de algumas éguas em produzir ou manter embriões devido a danos no trato reprodutivo. De forma semelhante, Hinrichs *et al.* (1998) advertem que fêmeas com lesões que dificultem o transporte espermático, a interação oócito/espermatozóide, o transporte do embrião através da tuba uterina e o seu desenvolvimento no útero, não devem ser utilizadas como doadoras de embrião.

Na atualidade, o uso de tecnologias que empregam tanto o gameta feminino quanto o masculino, tornam-se instrumentos importantes nos programas de reprodução assistida.

Assim, produção *in vitro* (IVP), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferência de oócitos (TO), transferência de gametas intrafalopiano (GIFT) e mais recentemente a transferência nuclear (Clonagem), apresentam-se como alternativas viáveis para obtenção de potros oriundos de animais com algum grau de subfertilidade.

Biotécnicas como a TO e a GIFT vêm sendo utilizadas, inclusive comercialmente, em algumas partes do mundo, produzindo descendentes de éguas velhas e de garanhões de elevado padrão zootécnico com sêmen de baixa qualidade.

Neste sentido, a padronização da técnica de aspiração folicular e a recuperação de oócitos é de fundamental importância, uma vez que o oócito é a “matéria-prima” para o emprego das tecnologias anteriormente mencionadas.

Além disto, o procedimento tem a grande vantagem de possibilitar a punção de folículos, um a um, e a coleta de todos os seus componentes, viabilizando a realização de estudos morfológicos, bioquímicos e de fisiologia.

Os mecanismos de maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vivo* não estão completamente elucidados na espécie equina e a utilização de oócitos oriundos da aspiração de folículos pré-ovulatórios, poderá trazer respostas importantes para um maior conhecimento destes fenômenos.

A técnica de aspiração folicular por via transvaginal (TUGA) vem sendo utilizada em éguas desde o início dos anos 1990, (BRÜCK *et al.* 1992), entretanto no Brasil, seu uso permanece experimental. Alguns fatores parecem concorrer para este quadro: O elevado custo de equipamentos, a carência de mão-de-obra especializada e resultados ainda não satisfatórios estão entre as principais causas para a escassez de trabalhos publicados no país.

A diversidade de equipamentos e técnicas empregados na recuperação de oócitos bem como a variedade de resultados alcançados tem sido causa de pesquisa (PYCOCK 1996).

Níveis de pressão, tamanho e espessura de agulha, protocolos anestésicos e tratamentos hormonais parecem influenciar de forma importante a eficiência na taxa de recuperação de oócitos. Além disto, fatores como o tamanho do folículo, o momento da punção a fase do ciclo estral, a via de coleta e a experiência do operador também assumem papel fundamental no sucesso da aspiração.

Os objetivos do presente experimento foram desenvolver e testar mecanismos para melhorar os índices de fertilidade de animais com problemas reprodutivos

Além disto, buscou-se viabilizar a formação de especialistas em reprodução assistida na espécie eqüina, através da criação de rotinas na técnica de aspiração folicular em éguas, avaliação de protocolos de sedação e analgesia desses animais e realização de procedimentos de Transferência de Oócitos e Transferência de Gameta Intrafallopiana.

De forma específica, os experimentos foram conduzidos a fim de avaliar a influência da pressão negativa aplicada ao folículo, a espessura e tamanho da agulha e o efeito da aplicação de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) na taxa de recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento no interesse em melhorar a capacidade reprodutiva nos casos de infertilidade, tanto de machos quanto de fêmeas, tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias na reprodução de eqüinos (BÉZARD 1997).

Allen (2005) cita que apesar do cavalo provavelmente ter sido o primeiro animal a experimentar e se beneficiar da inseminação artificial, um retardo no uso de transferência de embrião (TE) e outras modernas tecnologias reprodutivas foi observado na prática de campo.

Os trabalhos pioneiros em TE de eqüinos datam da década de 1970 (IMEL *et al.*, 1981). Porém, apenas a partir dos anos 1980, resultados satisfatórios foram alcançados através do método não-cirúrgico (TISCHNER, BIELAŃSKI, 1980; SALAZAR *et al.* 1980).

No Brasil, a TE vem sendo utilizada desde a segunda metade dos anos 1980 (PERES *et al.* 2002; CARMO, ALVARENGA, 2003) e hoje ocupa lugar de destaque em número de procedimentos realizados anualmente (SQUIRES *et al.* 1999; CARNEIRO, 2003; SQUIRES, 2005).

Com o objetivo de otimizar os benefícios e suplantar as limitações da TE, outras tecnologias associadas ao embrião vêm sendo desenvolvidas e aplicadas.

Allen (2005) afirma que a falha da égua e outros eqüídeos em promover uma resposta superovulatória genuína com tratamento à base de hormônios gonadotróficos exógenos, tem sido o maior limitante para o desenvolvimento de programas de TE na espécie.

Apesar de Alvarenga *et al.* (2001), utilizando extrato de pituitária eqüina (EPE), terem recuperado em média 1,8 embriões por coleta, a eficiência é bastante baixa quando comparada com outras espécies.

Recentemente Silveira *et al.* (2005) descrevem a técnica de bipartição embrionária como uma alternativa para melhorar os índices reprodutivos na égua. Estes autores alcançaram taxas de 100% de prenhez nas receptoras que receberam hemi-embriões, considerando-se o número inicial de estruturas recuperadas.

Há, entretanto, casos de fêmeas que não podem se utilizar dos benefícios da TE, devido a uma série de problemas reprodutivos. Estes incluem a falha na ovulação,

infecções uterinas, lesões cervicais e outras anomalias não diagnosticadas (CARNEVALE, 2004).

Hinrichs *et al.* (1998b) citam que éguas com danos no trato reprodutivo que limitem o transporte espermático, a interação oócito/espermatozóide, que impeçam o crescimento e o transporte do embrião através do oviduto e seu desenvolvimento no útero, apresentam limitações quando são utilizadas como doadoras em programas de transferência de embrião. Carnevale *et al.* (2001a) advertem, ainda, como fundamental para o sucesso da TE que éguas sejam capazes de produzir e ovular oócitos viáveis.

Falhas na ovulação parecem ocorrer com maior incidência em animais de idade mais avançada, além disso, a qualidade dos oócitos reduz drasticamente em éguas mais velhas (CARNEVALE, GINTHER, 1992; CARNEVALE, GINTHER, 1995; CARNEVALE *et al.* 1999).

Assim, a senilidade das fêmeas apresenta-se como mais um obstáculo aos programas de TE. Alternativas vêm sendo desenvolvidas e testadas, muitas delas empregando o oócito como elemento essencial do processo.

A fecundação *in vitro* (IVF), rotineiramente utilizada na reprodução assistida de humanos, bovinos, ovinos e suínos apresenta pobres resultados na espécie eqüina.

Apesar do esforço que diversos autores vêm realizando na tentativa de melhorar a eficiência da técnica (DEL CAMPO *et al.* 1992; ALM & TORNER, 1994; BRINSKO *et al.* 1995; GRØNDAHL *et al.* 1995; BRÜCK *et al.* 1996; DELL'AQUILA *et al.* 1997; WIRTU *et al.* 2004), os resultados permanecem pouco expressivos. Relata-se o nascimento de apenas dois produtos provenientes de IVP (Produção *in vitro*) (PALMER *et al.* 1991; SQUIRES, *et al.* 1996), ambos oriundos de oócitos maturados *in vivo*.

Segundo Squires *et al.* (2003) as duas maiores barreiras para o sucesso da IVP em eqüinos são: a maturação de oócitos e a capacitação espermática. Cochran *et al.* (1998) também afirmam que os baixos índices obtidos com a IVP estão relacionados com três fatores: (i) a inabilidade de se coletar um grande número de oócitos de boa qualidade; (ii) alterações sofridas pela zona pelúcida durante o processo de maturação *in vitro* de oócitos; (iii) inadequada capacitação *in vitro* dos espermatozoides. Allen, (2005) concorda com os autores supra citados e acrescenta a relativamente baixa capacidade de recuperação de oócitos maturados *in vivo* pelo método de Ovum Pick Up (OPU).

Devido ao baixo sucesso obtido com a IVF na reprodução assistida, a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) vem sendo cada vez mais estudada

(SQUIRES, 2005). A ICSI é uma técnica comumente usada em medicina humana em casos de subfertilidade no homem. Para o seu emprego, os oócitos são coletados, maturados, e desnudados. Apenas aquelas estruturas com extrusão do primeiro corpúsculo polar devem ser utilizadas nos procedimentos de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (SCHIMIDT *et al.* 1998; McKINNON *et al.* 1998).

Após a maturação oocitária, um único espermatozóide lhe é introduzido, com o auxílio de uma micropipeta acoplada ao braço de um micromanipulador. Uma grande vantagem que esta biotécnica proporciona é a utilização de um baixo número de espermatozoides, viabilizando o emprego de sêmen de garanhões com baixa fertilidade (COUTINHO DA SILVA, 2004a).

Os primeiros pesquisadores a descrever o nascimento de um potro concebido através de ICSI foram Squires *et al.* (1996).

Dell'Áquila *et al.* (1997) compararam a eficiência de ICSI *versus* IVF com a fecundação de oócitos oriundos de abatedouro e observaram uma taxa de clivagem de 29,8% e de 8,7% respectivamente. Um estudo conduzido por Cochran *et al.* (1998) registrou o nascimento de dois potros oriundos da coleta de oócitos de éguas prenhes, maturados *in vitro* e de éguas que receberam embrião produzidos por ICSI com sêmen de garanhões férteis e subférteis.

Lazzari *et al.* (2002) da mesma forma, afirmam que semelhantes taxas de mórula e blastocisto podem ser alcançadas com sêmen congelado de garanhões de diferentes graus de fertilidade. Isso demonstra que esta técnica é uma alternativa para utilização de machos com sêmen de má qualidade, sêmen congelado ou sexado.

Galli *et al.* (2002) avaliaram a eficiência do cultivo *in vitro* e *in vivo* (no oviduto de ovelha), de embriões eqüinos produzidos a partir de punção ovariana e submetidos à ICSI. Estes autores obtiveram taxa de mórula e blastocisto de 20% para os cultivados *in vitro* e 56,1% para os cultivados *in vivo*.

Resultados de até 30% de prenhez (LAZZARI *et al.*, 2002; GALLI *et al.*, 2002) vêm sendo alcançados, demonstrando que a ICSI pode ser aplicada em programas de reprodução assistida na espécie eqüina.

Alguns fatores limitantes, porém, dificultam sua plena utilização. Squires *et al.* (1999) e Coutinho da Silva (2004a) citam como desvantagem para o emprego da técnica a necessidade de equipamentos sofisticados e de pessoal com experiência na utilização de micromanipuladores.

McKinnon *et al.* (1998) também compararam taxa de fecundação através de ICSI entre operador experiente (73%) e operador inexperiente (0%).

A transferência de oócitos (TO) tem sido uma alternativa para éguas que não conseguem produzir embriões para TE (HINRICHS *et al.* 1999) ou animais que apresentam problemas de ovulação, infecções uterinas persistentes e piômetra (HINRICHS *et al.* 1998a; CARNEVALE *et al.* 2000; SQUIRES *et al.* 2003).

O processo consiste na coleta de oócitos de éguas doadoras e transferência dos mesmos para a tuba uterina de receptoras. A maturação deste oócito pode ocorrer *in vivo*, no caso de coleta de folículos pré-ovulatório; ou *in vitro* (BRINSKO *et al.*, 1995; HINRICHS *et al.* 2000).

A fecundação ocorre através da inseminação da égua receptora. Este procedimento se dá entre 12 horas antes e 2 horas após a transferência do oócito e normalmente com alta concentração de espermatozoides (CARNEVALE 2000 CARNEVALE *et al.* 2000; CARNEVALE *et al.* 2002).

A primeira TO realizada com sucesso foi reportada por McKinnon *et al.* (1988). Porém, apenas recentemente esta técnica tem sido estudada extensivamente (HINRICHS *et al.* 1998b; SCOTT *et al.* 2001; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2001; SQUIRES *et al.*, 2003;).

Carnevale e Ginther (1995) obtiveram 92% (11/12) de prenhez, transferindo oócitos de doadoras jovens para receptoras jovens, porém apenas 31% quando éguas velhas eram utilizadas como doadoras. Estes autores sugerem que a idade avançada e a baixa qualidade dos oócitos e do trato reprodutivo de doadoras são as principais causas para a baixa eficiência da técnica (CARNEVALE, GINTHER, 1992).

Em um programa comercial de TO realizado entre 1998 e 1999, Carnevale *et al.* (2001b) citam taxas de prenhez de 30% a 40% em éguas de diferentes graus de subfertilidade e concluíram que os principais fatores que afetaram o sucesso do programa foram a qualidade do sêmen empregado e, fundamentalmente, a qualidade dos oócitos recuperados. Utilizando metodologia semelhante, esses autores avaliaram que os mesmos fatores afetaram os resultados do programa de TO entre os anos de 2000 e 2004 (CARNEVALE *et al.* 2005).

Carnevale *et al.* (2003a) e Carnevale *et al.* (2003b) reportam o estabelecimento de prenhez e o nascimento de um potro oriundo de TO de oócito recuperado dos ovários de 5 éguas que foram eutanasiadas. O intervalo entre a remoção dos ovários e a

recuperação dos oócitos foi de 8 a 10 horas e a taxa de prenhez por oócito transferido foi de 17%.

Numa revisão sobre o tema, Carnevale (2004), concluiu que métodos envolvendo transferência e fecundação *in vivo* de oócitos são capazes de produzir potros oriundos de fêmeas de elevado valor econômico, com problemas reprodutivos; e usando a técnica de TO, a interação entre oócito, espermatozóide e oviduto poderá ser estudada; e que fatores que afetam a viabilidade de oócitos poderão ser determinados.

A transferência de gameta intrafallopiana (GIFT) também é um procedimento empregado na reprodução assistida de equinos.

De forma semelhante a TO, os oócitos são transferidos da égua doadora para a tuba uterina da receptora. Porém, o que as diferencia é que na transferência de oócito o sêmen é depositado, com alta concentração espermática, no corpo do útero, enquanto que na GIFT o sêmen é depositado juntamente com o oócito no oviduto e em doses substancialmente mais reduzidas (CARNEVALE, 2000; CARNEVALE *et al.* 2000; COUTINHO DA SILVA, 2004). Esta técnica tem a vantagem de requerer um baixo número de espermatozóides, cerca de 200.000 a 500.000, para a fecundação. Por este fato viabiliza a utilização de garanhões de baixa fertilidade, sêmen congelado ou sêmen sexado (COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2004).

Taxa de prenhez de 82% (9/11) foi observada com o uso de 200.000 espermatozóides oriundos de sêmen fresco e utilizado por GIFT. Porém, taxas de desenvolvimento embrionário de 25% (4/16) e 8% (1/12) foram observadas com sêmen resfriado e congelado, respectivamente (COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a).

O nascimento do primeiro potro proveniente de transferência Nuclear (TN) foi descrito por Galli *et al.* (2003). Esta técnica, mais do que as tecnologias anteriormente mencionadas apresenta baixa eficiência e repetibilidade. Neste experimento, dos 841 oócitos recombinados que foram cultivados, apenas 22 estruturas desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (3%). Dezesete destes blastocistos foram transferidos, resultando em 4 prenhez (24%) e uma única gestação foi levada a termo.

Para uma plena utilização destas tecnologias hoje disponíveis, é condição essencial que haja oócitos, em número e qualidade, adequados e compatíveis com uma fecundação, seja *in vivo* ou *in vitro*.

Com a finalidade de viabilizar o material básico para este fim, nos últimos 20 anos diversos pesquisadores vêm descrevendo e testando protocolos de recuperação de oócitos.

Uma série de fatores influencia e concorre para a eficiência desta técnica. Alguns dos mais importantes são os equipamentos utilizados, a experiência do operador e a via de coleta.

O efeito do momento da aspiração sobre a taxa de recuperação e o tamanho do folículo a ser puncionado estão diretamente relacionados à eficiência do procedimento. Por fim, o tratamento a base de hormônio para promover a maturação folicular e a fase do ciclo estral da égua devem ser considerados no momento da realização da aspiração.

Alguns trabalhos associam a taxa de recuperação de oócitos ao tamanho do folículo aspirado (HINRICHS 1991; KANITZ *et al.* 1995; MEINTJES *et al.* 1995; DUCHAMPS *et al.* 1995). Existe uma forte indicação de que em folículos com diâmetro superior a 35 mm, a taxa de recuperação de oócitos é maior.

A maturação folicular pode ser obtida através da administração de alguns hormônios. Brück *et al.* (1997), apregoaram a utilização de 100mg IM de FSH de suíno, Brück *et al.* (2000) avaliaram o efeito da administração de um preparado de gonadotrofina eqüina sobre o desenvolvimento folicular, a taxa de recuperação de oócitos e a maturação *in vivo* em éguas. Anteriormente, já havia sido avaliado o efeito do intervalo de indução da ovulação, com extrato de pituitária eqüina, sobre a maturação oocitária, (BÉZARD *et al.* 1997).

Palmer *et al.* (1987), relacionaram o uso de extrato de pituitária eqüina ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), com o aumento do número de estruturas recuperadas após a aspiração folicular por método não cirúrgico. Mckinnon *et al.* (1998), recomendaram a utilização de 2,2 mg de um análogo de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em éguas com sinais de estro e folículos com 30-35 mm de diâmetro para induzir a ovulação

A aplicação intravenosa (IV) de hCG com doses que variam de 1.000 a 3.300 UI é citada por diferentes autores (COOK *et al.* 1993; HINRICHS *et al.* 1998a; SCHIMIDT *et al.* 1998; MacLELLAN *et al.* 2002). Este protocolo deve ser empregado quando éguas doadoras demonstrarem sinais de estro, relaxamento do tônus uterino e cervical, edema da mucosa uterina e folículos com diâmetros maiores ou iguais a 35 mm (SCHIMIDT *et al.*, 1998; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a).

Hinrichs *et al.* (1990), puncionando folículos com tamanho médio de 39,7 mm, obtiveram taxas de recuperação de oócitos de 69% e 71% em éguas que receberam ou não gonadotrofina coriônica humana (hCG). Mckinnon *et al.* (1998) verificaram que

taxas de recuperação de oócitos foram significativamente diferentes entre folículos maduros (79%) e imaturos (18%).

A fase do ciclo estral exerce grande influência tanto na taxa de recuperação de oócitos quanto na quantidade e qualidade das estruturas recuperadas.

Cook *et al.* (1993) descrevem uma taxa de recuperação de oócitos de 63% em folículos pré-ovulatórios, enquanto que apenas 19% dos oócitos foram recuperados durante o diestro. Kanitz *et al.* (1995), reportaram uma diferença nas taxas de recuperação entre folículos aspirados nos dias cinco e 12 do ciclo estral (26,3% *versus* 12,4%, respectivamente). Brück *et al.* (1996), avaliaram o efeito do tamanho de folículos e o estágio do ciclo estral na taxa de maturação *in vitro* de oócitos coletados de ovários provenientes de abatedouros e não observaram diferenças na taxa de maturação destas estruturas.

Nascimento de potros provenientes de oócitos recuperados de éguas prenhes têm sido descritos (LI *et al.* 1995; MEINTJES *et al.* 1995; COCHRAN *et al.* 1998).

Scott *et al.* (2001), utilizando aspiração transvaginal guiada por ultra-som (TUGA), obtiveram taxa de recuperação de 43% de oócitos oriundos de folículos pré-ovulatórios e de 25% de folículos coletados no diestro.

Existe, porém, uma grande divergência em relação ao momento mais apropriado para a punção folicular. Squires *et al.* (2003), recomendam a punção em até 12 horas pós-hCG, alertando que uma consequência de se aguardar a maturação oocitária até imediatamente antes da ovulação é a possibilidade de sua ocorrência antes da aspiração do oócito.

No trabalho de Carnevale e Ginther (1995) os folículos foram aspirados 24 horas após aplicação do hCG e os oócitos maturados por 16 a 20 horas antes da transferência. Os autores observaram uma taxa de desenvolvimento embrionário de 83% nesse experimento.

Hinrichs *et al.* (1998a) também realizaram aspiração folicular 24 horas após a aplicação de hCG e maturação *in vitro* dos oócitos por 12 ou 18 horas, obtendo uma taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto de 80% (4/5) e 67% (2/3), respectivamente.

Em um estudo posterior, Hirinchs *et al.* (1998b), não encontraram diferença quando compararam a taxa de desenvolvimento embrionário de oócitos coletados 24 horas após a aplicação de hCG e submetidos a maturação *in vitro* por 12 horas com a de oócitos coletados 35 horas após o hCG e imediatamente transferidos.

Coutinho da Silva *et al.* (2002b) coletaram oócitos 24 ou 36 horas após o hCG, cultivaram os mesmos por 15 a 18 horas ou 1,5 h, respectivamente. Após transferi-los para receptoras, obtiveram taxas de 58% e 62% de desenvolvimento embrionário.

Scott *et al.* (2001) obtiveram taxa de desenvolvimento embrionário de 82% (9/11) com oócitos coletados 36 a 38 horas após aplicação de hCG e transferidos em 1 hora para o oviduto das receptoras. Estes autores concluíram que oócitos podem completar o estágio final de sua maturação no oviduto.

A via de coleta utilizada é de fundamental importância para avaliação das taxas de recuperação e qualidade do oócito. Os experimentos pioneiros de aspiração de conteúdo folicular com método não-cirúrgico foram conduzidos por Palmer *et al.* (1987), o índice de recuperação relatado foi de 63%. Nesta técnica, um cateter era introduzido na cavidade abdominal através do flanco e o ovário com o folículo a ser puncionado era manipulado por palpação retal. Uma agulha era introduzida no antro folicular e o conteúdo esvaziado com auxílio de uma seringa de 60mL.

Vogelsang *et al.* (1988) avaliaram os métodos cirúrgico (por laparotomia) e não-cirúrgico (conforme descrição de anterior). Seus resultados foram de 14% e 10% de taxa de recuperação, respectivamente. Pycocock (1996) adverte que a recuperação de oócitos por laparotomia apresenta desvantagens em termos de facilidade e repetibilidade.

Shabpareh *et al.* (1993), compararam a eficiência da recuperação de oócitos de ovários excisados por colpotomia e outros oriundos de abatedouros com e sem tratamento com hialuronidase, taxas de 43,4% e 37,5% foram alcançadas, respectivamente.

Hinrichs e Kenney, (1987) e Hinrichs *et al.* (1990) descrevem uma técnica de incisão no fundo de saco vaginal (colpotomia) e aspiração folicular. Os autores observaram que o procedimento facilita a manipulação dos ovários, sem o obstáculo da parede retal e do peristaltismo. Hinrichs *et al.* (1998a) em um programa de TO para pôneis realizou punção com o auxílio de uma cânula-trocáter passada através da parede abdominal. Carnevale *et al.* (2001b), utilizaram-se também da técnica de punção através da trocaterização do flanco em uma égua com melanoma e conteúdo líquido vaginal.

A aspiração por via transvaginal guiada por ultra-som (TUGA), em animais domésticos, foi primeiramente utilizada em bovinos (PIETERSE *et al.* 1988).

Brück *et al.* (1992), foram os pioneiros na descrição da técnica em eqüinos. Neste trabalho quatro folículos pré-ovulatórios foram puncionados. Apesar de apenas 1

oócito ter sido recuperado, os autores afirmaram que o método empregado mostrou-se rápido, preciso e atraumático.

Bézard (1997) afirma que esta técnica de ovum pick up (OPU) em éguas é um excelente método não invasivo e que possibilita a punção do mesmo animal diversas vezes.

Na atualidade, rotineiramente utiliza-se a punção folicular por via transvaginal guiada por ultra-som para a obtenção de oócitos maduros e imaturos (COOK *et al.* 1993; MEINTJES *et al.* 1994; BRÜCK, GREVE 1994; HINRICHS *et al.* 1998a).

Os resultados de taxa de recuperação destes autores, entretanto, são diversos assim como os equipamentos de ultra-som, os níveis de pressão e os modelos de agulhas utilizados. Cabe ressaltar a importância que alguns autores dão ao procedimento de lavagem do folículo.

Pycock (1996) adverte que a comparação entre as taxas de recuperação de oócitos do diferentes grupos torna-se impossível devido justamente, a diversidade de protocolos utilizados. Entretanto, os artigos reportam valores entre 8% e 84%.

De forma semelhante, Landim-Alvarenga (1999), cita que índices de recuperação entre os diferentes pesquisadores são de 14 a 79% e que alguns dos fatores que influenciam estes resultados extremamente diferentes são o sistema de punção, incluindo agulhas de lume simples ou duplo, a lavagem do folículo, a curetagem ou não da parede folicular. Além disto, outro fator importante é a experiência do técnico.

Os equipamentos de ultra-som empregados são inúmeros, incluindo modelo e frequência dos transdutores: 5MHz (BRÜCK, GREVE, 1994; CARNEVALE, GINTHER 1995; BØGH *et al.* 2000; CARNEVALE *et al.* 2001a; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2004); 6MHz (BRÜCK *et al.* 1992); 6,5MHz (KANITZ *et al.* 1995); 7,5MHz (DUCHAMPS *et al.* 1995).

Uma variedade de modelos de agulha tem sido descritos. As espessuras de agulha normalmente usadas são de 12G (SCOTT *et al.* 2001, GALLI *et al.* 2002, COUTINHO DA SILVA *et al.* 2004; MARI *et al.* 2005), 14G (HINRICHS *et al.* 1990, HINRICHS, 1991 e HINRICHS *et al.* 1998a), 16G (MARI *et al.* 2005) ou 18G (BRÜCK *et al.* 1997).

Os comprimentos utilizados variam de 50 cm (BRÜCK *et al.* 1992; MEINTJES *et al.* 1995; HINRICHS, 1991), 60cm (DUCHAMPS *et al.* 1995; BØGH *et al.* 2000; McKINNON *et al.* 1998), 80cm (KANITZ *et al.* 1995) e 115cm (BRÜCK *et al.* 1997).

Os diferentes grupos de pesquisadores divergem, ainda, quanto ao uso de agulha com lume simples ou duplo.

Cook *et al.* (1993) e Duchamps *et al.* (1995) citam que o uso de agulha de duplo lume melhora as taxas de recuperação de oócitos. Meintjes *et al.* (1995), entretanto, utilizando agulhas com lume simples, alcançaram 75,8% de taxa de recuperação, valor superior aos que foram observadas por Duchamps *et al.* (1995) e Kanitz *et al.* (1995), os quais empregaram agulha de duplo lume.

Os equipamentos e os níveis de pressão negativa empregados na recuperação de fluido folicular e oócitos são também pontos de divergência entre os autores. Kanitz *et al.* (1995), advertem que a taxa de recuperação de COC é influenciada pela pressão utilizada.

Brück *et al.* (1992) e Hinrichs *et al.* (1998a), utilizaram-se de uma seringa de 50 mL para promover a pressão após a punção do foliculo. O emprego da bomba de vácuo é descrito por diversos autores. Pressões entre 80mmHg e 400mmHg são citadas: 90mmHg (MEINTJES *et al.* 1995), 100-150mmHg (MARI *et al.* 2005), 150mmHg (SCOTT *et al.* 2001, COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002b; CARNEVALE 2005), 230-300mmHg (DUCHAMPS *et al.* 1995) e 400mmHg (KANITZ *et al.* 1995).

Pycokoc (1996) adverte que níveis de pressão muito elevados podem causar lesões ao oócito, fato também observado por Kanitz *et al.* (1995), que provocou perda das células do *cumulus* ao empregar pressões de 400mmHg.

Além dos fatores anteriormente mencionados, a origem dos oócitos e algumas particularidades fisiológicas e histológicas da égua parecem dificultar a recuperação de COCs quando comparado a outras espécies.

Squires *et al.* (2003), cita que algumas das limitações para a realização de estudos com oócitos eqüinos maturados *in vivo* são o reduzido número de estruturas que podem ser recuperadas e o elevado custo do procedimento. Devido a estas dificuldades, diversos autores têm trabalhado com material oriundo de abatedouros.

Hinrichs (1991), afirma que oócitos recuperados de ovários de abatedouros são comumente usados para estudos de IVP em bovinos, dada a facilidade de obtenção de material e os processos de maturação (IVM), fecundação (IVF) e cultivo (IVC) *in vitro* estarem bem estabelecidos na espécie.

Com a finalidade de aperfeiçoar as técnicas de IVP, Alm & Torner, (1994), Li *et al.* (1995), Grøndahl *et al.* (1995) e Brück *et al.* (1996) lançaram mão de material

proveniente de abatedouros. Preis *et al.* (2004), avaliaram o efeito da temperatura e Guignot *et al.* (1999), a influência da duração do transporte de ovários na qualidade de oócitos usados na produção *in vitro* em cavalos.

Bézard (1997) adverte que ovários provenientes de abatedouros podem ser utilizados para a obtenção de um grande número de oócitos, entretanto, estes são oriundos de uma população heterogênea de folículos. Da mesma forma, MacLellam *et al.* (2002), citam que este material é originado de animais com idade e histórico reprodutivo desconhecidos, o que acaba contribuindo para a diversidade dos resultados encontrados.

Uma peculiaridade histológica de oócitos de éguas e que dificulta sua recuperação tanto *in vivo* quanto *in vitro* quando comparado com os de bovinos é a maior fixação desta estrutura à parede folicular. A emissão de processos celulares das células da granulosa para o interior da camada de células tecais forma um sítio de fixação que funcionam como uma âncora entre a parede folicular e o oócito (HAWLEY *et al.* 1995; BRÜCK *et al.* 1999).

Apesar de todas as variáveis e dificuldades mencionadas, McKinnon *et al.* (1998) citam que a coleta de oócitos pré-ovulatórios parece ser a melhor estratégia para a concepção assistida em eqüinos.

3 ARTIGO

ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIA TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRA-SOM EM EQUINOS

Rafael Rodrigues¹, Frederico Schmidt², Natália Schmidt³, José Luiz Rodrigues⁴

RESUMO

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (TUGA) é uma ferramenta que vem sendo utilizada desde a década de 1990 em reprodução assistida na espécie equina. Com o crescente interesse nas técnicas de transferência de oócitos (TO), transferência de gametas intrafallopiano (GIFT) e mais recentemente na transferência nuclear (TN), a recuperação de oócitos de boa qualidade tornaram-se um passo fundamental do processo. Diversas técnicas e equipamentos podem ser empregados com esta finalidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa de recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios de cinco protocolos de punções. Dois níveis de pressão negativa: Baixa (B) (150 – 200 mmHg) e Alta (A) (250 – 300 mmHg) e três modelos de agulha: curta 14 G (C14); curta 18 G (C18) e longa 18 G (L18) foram testados. Cinquenta e quatro folículos de 48 éguas foram aspirados. Estes animais foram distribuídos completamente ao acaso em cinco grupos experimentais (G). GI: (B-C14) (n=22); GII: (B-L18) (n=3); GIII: (B-L18) (n=18); GIV: (A-C18) (n=5); GV: (A-L18) (n=6). Vinte e duas éguas receberam 2500 UI de hCG, 14 tiveram seus folículos aspirados e 2 oócitos foram recuperados (14,3%). Dos 54 folículos aspirados, 4 oócitos foram recuperados (7,41%): GI (n=1), GIII (n=1) e GIV (n=2). Três deste oócitos foram transferidos para o oviduto de éguas receptoras através das técnicas de GIFT (n=2) e TO (n=1). Não foi observado desenvolvimento embrionário nas receptoras nos 14, 15 e 16 dias pós-transferência.

Palavras-chave: oócito, aspiração folicular, hCG, transferência de gametas.

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-UFRGS

² Médico Veterinário, MSc

³ Graduação em Medicina Veterinária -UFRGS

⁴ PhD Professor Titular Departamento de Patologia Veterinária –FAVET-UFRGS

ABSTRACT

The follicular transvaginal ultrasound-guided aspiration (TUGA) is a technique becoming in use since 1990 in assisted reproduction in the horse. With the increased interest in the techniques of oocyte transfer (OT) and gamete intrafallopian transfer (GIFT) and most recently in nuclear transfer (NT) the recovery of a good quality oocyte becomes an important step for the process. Different methods and equipments can be used with this purpose. The aim of the present work was evaluate oocyte recovery rates from preovulatory follicles of five different punction protocols. Two levels of negative pressure: Low (L) (150-200 mmHg) and High (H) (250-300mmHg) and three needle types: short 14G (S14); short 18G (S 18) and long 18G (L18) was tested. Fifty four follicles of 48 mares were aspired. These animals were randomicaly distribuedin five experimental groups (G). GI: (L-S14) (n=22); GII: (L-L18) (n=3); GIII: (L-L18) (n=18); GIV: (H-S18) (n=5); GV: (H-L18) (n=6). Twenty two mares recived 2500UI of hCG, 14 mares had yours follicules aspired and 2 oocytes was recovered (14,3%). Four oocytes (7, 41%) were recovered of 54 follicles: GI (n=1), GIII (n=1) and GIV (n=2). Three oocytes were transfered into the oviduct of recipient mares through GIFT (n=2) and OT (n=1). It was not observed embryonic development in recipient mares on days 14, 15 and 16 after transfers.

Key words: oocyte, follicular aspiration, hCG, gametes transfer.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) e a transferência de embrião (TE) são as biotécnicas da reprodução mais comumente utilizadas na espécie equina e empregadas com sucesso desde o século passado (IMEL *et al.* 1981; SQUIRES *et al* 2003, ALLEN 2005). Contudo, a ineficiência das éguas em promover superovulação e a dificuldade encontrada na criopreservação de embriões equinos têm sido limitantes para um efetivo emprego de programas de TE (McKINNON *et al.* 1998; MARI *et al* 2005).

Além disto, Hinrichs *et al.* (1998a), Carnevale (2000) e Squires (2005), advertem ainda, que éguas com problemas no trato reprodutivo que dificultem a

interação entre oócito e espermatozóide, interfiram no desenvolvimento embrionário na tuba uterina ou no útero, apresentam limitações no pleno benefício que estas técnicas proporcionam.

O crescente interesse em aumentar a capacidade reprodutiva nos casos de infertilidade tanto de garanhões como em éguas tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias em reprodução eqüina (BÉZARD 1997).

Coutinho da Silva (2004) afirma que avanços na área de reprodução assistida têm possibilitado o aumento de taxas de prenhez em éguas consideradas subférteis

Apesar de estabelecida e com bons resultados em diversas espécies, a produção *in vitro* (IVP) não tem apresentado sucesso no cavalo (DELL'AQUILA *et al.* 1996; LANDIN-ALVARENGA 1999; CARNEIRO 2003; PREIS *et al.* 2004).

Cochran *et al.* (1998) afirmam que os baixos índices obtidos com a IVP em eqüinos estão relacionados com a inabilidade de se coletar um grande número de oócitos de boa qualidade; alterações sofridas pela zona pelúcida durante o processo de maturação *in vitro* de oócitos e principalmente a inadequada capacitação *in vitro* dos espermatozóides.

Palmer *et al.* (1991) relatam o nascimento do único potro oriundo de Fecundação *in vitro* (IVF).

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) tem sido uma alternativa para suplantiar as dificuldades observadas na IVP. Squires *et al.* (1996) publicaram o nascimento do primeiro potro produzido a partir desta técnica. Posteriormente, outros autores (COCHRAN *et al.* 1998; McKINNON *et al.* 1998) obtiveram êxito na aplicação da ICSI.

A transferência de oócito (TO) consiste em realizar a recuperação de oócitos de uma égua doadora e sua deposição na tuba uterina de uma receptora, previamente inseminada (CARNEVALE *et al.* 2001a; CARNEVALE *et al.* 2001b). A primeira de prenhez foi descrita em 1988 (McKINNON *et al.* 1988), porém, resultados tão expressivos quanto 92% (11/12) só foram alcançados anos depois (CARNEVALE, GINTHER 1995).

Programas comerciais de transferência de oócitos vêm sendo conduzidos desde 1998, viabilizando a produção de potros de éguas com anomalias reprodutivas (HINRICHS *et al.* 1998a; CARNEVALE *et al.* 2001b; COUTINHO DA SILVA 2004; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2004; CARNEVALE *et al.* 2005).

A transferência de gametas intrafallopiana (GIFT), diferentemente da TO, envolve a transferência de oócito e de pequeno número de espermatozóides (2 a 5×10^6) para o oviduto da receptora. Devido a isto, a técnica tem o potencial de ser utilizada em garantões com baixo número de espermatozóides viáveis, sêmen congelado e sêmen sexado (COUTINHO DA SILVA *et al.* 2001; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002b; COUTINHO DA SILVA 2004; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2004).

Recentemente a clonagem foi realizada com sucesso na espécie eqüina (GALLI *et al.* 2003). Os autores reportam a utilização de 841 oócitos recombinados, o desenvolvimento de 22 estruturas ao estágio de blastocisto e o nascimento de um potro.

Allen (2005) observa que o cavalo, mais do que as demais espécies domésticas é um óbvio candidato à clonagem, não com a finalidade de recriar um vencedor, já que uma miríade de influências ambientais impossibilitariam este feito, senão pelo fato de viabilizar a cópia com testículo funcional, de um campeão precocemente castrado.

Para uma real e eficiente utilização destas tecnologias é condição fundamental que os gametas sejam de boa qualidade e em número apropriado. Neste sentido, umas séries de técnicas para a obtenção de oócitos vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos.

Vogelsang *et al.* (1988) e Shabpareh *et al.* (1993) avaliaram métodos cirúrgicos de coleta do oócitos de folículos pré-ovulatórios em éguas. Palmer *et al.* (1987), foram os primeiros a descrever a técnica não-cirúrgica de aspiração folicular através de trocaterização do flanco de animais em estação.

Hinrichs e Kenney, (1987) e Hinrichs *et al.* (1990) sugerem a colpotomia como alternativa para melhorar as taxas de recuperação de oócitos e evitar a contaminação dos ovários com material fecal, nesse caso o operador introduzia a mão na cavidade peritoneal e segurava o ovário diretamente contra a agulha e trocáter que eram colocados através da parede abdominal.

Após Pieterse *et al.* (1988) descrever a utilização da aspiração folicular guiada por ultra-som (TUGA) para recuperar oócitos em bovinos, Brück *et al.* (1992) foram os pioneiros na descrição de TUGA em eqüinos. Os autores relatam que a técnica mostrou-se rápida, precisa, descomplicada e atraumática, neste experimento foram aspirados 4 folículos e 1 estrutura foi recuperada. Posteriormente a isto, diversos trabalhos foram conduzidos a fim de avaliar diferentes técnicas e sua eficiência na recuperação de

oócitos (COOK *et al.*1993; MEINTJES *et al.*1995; KANITZ *et al.*1995; BRÜCK *et al.*1997).

A taxa de recuperação de oócitos sofre grande influência de fatores como o nível de pressão negativa empregada no sistema de punção, o modelo de agulha utilizada e a utilização de hormônios. Os equipamentos e os níveis de pressão negativa empregados na recuperação de fluido folicular e oócitos são pontos de divergência entre os autores. Kanitz *et al.* (1995), advertem que a taxa de recuperação de COC é influenciada pela pressão utilizada.

Brück *et al.* (1992) e Hinrichs *et al.* (1998a), utilizaram-se de uma seringa de 50 mL para promover a pressão após a punção do folículo. O emprego da bomba de vácuo é descrito por diversos autores. Pressões entre 80mmHg e 400mmHg são citadas: 90mmHg (MEINTJES *et al.* 1995), 100-150mmHg (MARI *et al.* 2005), 150mmHg (SCOTT *et al.* 2001, COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002b; CARNEVALE 2005), 230-300mmHg (DUCHAMPS *et al.* 1995) e 400mmHg (KANITZ *et al.* 1995).

Pycokoc (1996), entretanto, adverte que níveis de pressão muito elevados podem causar lesões ao oócito, fato observado também por Kanitz *et al.* (1995), que provocou perda das células do *cumulus* ao empregar pressões de 400mmHg.

Uma variedade de modelos de agulha tem sido descritos. As espessuras de agulha normalmente usadas são de 12G (GALLI *et al.* 2002, COUTINHO DA SILVA *et al.* 2004; MARI *et al.*2005), 14G (HINRICHS *et al.*1990, HINRICHS, 1991 e HINRICHS *et al.* 1998a), 16G (MARI *et al.* 2005) ou 18G (BRÜCK *et al.* 1997).

Os comprimentos utilizados variam de 50 cm (BRÜCK *et al.* 1992; MEINTJES *et al.*1995; HINRICHS, 1991), 60cm (DUCHAMPS *et al.*1995; McKINNON *et al.*1998), 80cm (KANITZ *et al.* 1995) e 115cm (BRÜCK *et al.* 1997). Os diferentes grupos de pesquisadores variam, ainda, quanto ao uso de agulha com lume simples ou duplo.

Cook *et al.* (1993) e Duchamps *et al.* (1995) citam que a utilização de agulha de duplo lume melhora as taxas de recuperação de oócitos. Meintjes *et al.* (1995), entretanto, obtiveram taxa recuperação de 75,8%, utilizando agulha de lume simples, valor maior do que o observado por Duchamps *et al.*(1995) e Kanitz *et al.*(1995).

O emprego de hormônios com a finalidade de promover a maturação folicular vem sendo testado por inúmeros autores. Brück *et al.* (1997), apregoaram a utilização de 100mg IM de FSH de suíno, Brück *et al.* (2000) avaliaram o efeito da administração de

um preparado de gonadotrofina eqüina sobre o desenvolvimento folicular, a taxa de recuperação de oócitos e a maturação *in vivo* em éguas. Palmer *et al.* (1987), relacionaram o uso de extrato de pituitária eqüina ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), com o aumento do número de estruturas recuperadas após a aspiração folicular por método não cirúrgico

A aplicação intravenosa (IV) de hCG com doses que variam de 1.000 a 3.300 UI é citada por diversos pesquisadores (COOK *et al.* 1993; HINRICHS *et al.* 1998a; SCHIMIDT *et al.* 1998; MacLELLAN *et al.* 2002).

No trabalho de Carnevale e Ginther (1995) folículos foram aspirados 24 horas após aplicação do hCG e os oócitos maturados por 16 a 20 horas antes da transferência. Os autores observaram uma taxa de desenvolvimento embrionário de 83% nesse experimento.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de cinco protocolos de aspiração folicular, variando níveis de pressão, o modelo de agulha e a influência do uso de hCG na taxa de recuperação de oócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais

O experimento foi realizado na Coudelaria de Rincão-Exército Brasileiro, situada no município de São Borja-RS, durante os meses de março e dezembro de 2005 e fevereiro de 2006.

A aspiração folicular foi realizada em 48 éguas das raças Brasileiro de Hipismo (BH), Puro Sangue de Corrida (PSC), Hanoveriano, Bretão e Sem Raça definida (SRD), com idade entre 30 meses e 14 anos, com massa corporal entre 438 e 569 kg, alimentadas diariamente com ração balanceada e campo nativo e em boas condições de saúde.

Três garanhões de reconhecida fertilidade e com padrões espermáticos dentro da normalidade da espécie, foram doadores de sêmen para os procedimentos de GIFT e TO e 3 éguas do lote foram utilizadas como receptoras dos oócitos. Os animais foram

alojados em 5 grupos experimentais, com distribuição completamente ao acaso, conforme expresso na Tabela 1. Os dois intervalos de pressão negativa a que os folículos foram submetidos foram de 150-200 mmHg, considerado Baixa Pressão (B) e de 250-300 mmHg, considerado Alta Pressão (A). Três modelos de agulha foram testados: Agulha curta 18G 40X12⁵ com 5 cm de comprimento, agulha curta 14G⁶ com 9 cm e agulha longa 18G com 55cm (V OPAA 1855⁷).

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais de acordo com a pressão (mmHg), tamanho e espessura da agulha (G).

Grupo	N*	N** (%)	Pressão (mmHg)	Agulha	Agulha (G)
I	20	22 (40,74)	150-200	Curta	14
II	3	3 (5,56)	150-200	Curta	18
III	14	18 (33,33)	150-200	Longa	18
IV	5	5 (9,26)	250-300	Curta	18
V	6	6 (11,11)	250-300	Longa	18

N *: número de éguas por grupo experimental

N **: número de folículos aspirados por grupo experimental

Sincronização de Ciclo Estral, Controle e Maturação Folicular, Sedação e Analgesia.

A sincronização do ciclo estral dos animais foi obtida através da aplicação de 0,25 mg, IM, de cloprostenol sódico (Ciosin^{®8}). A atividade ovariana era avaliada a cada 2 dias, por meio de palpação e ultra-sonografia transretal, com auxílio de ultrassom (SSD 500^{®9}) com transdutor linear de 5MHz. Éguas que apresentavam folículos com diâmetro ≥ 35 mm eram palpadas a cada 12 horas para acompanhamento do crescimento folicular. A fim de promover e acelerar a maturação oocitária, 2500 UI de hCG (Vetecor 5000^{®10}) foram aplicadas por via intravenosa (IV) naqueles animais (n=22) que apresentassem manifestações de estro, edema uterino verificado através de

⁵ B-D Inc

⁶ B-D Inc

⁷ Cook Veterinary Products Inc

⁸ Cooper S/A

⁹ Aloka Inc

¹⁰ Serono Produtos Farmacêuticos LTDA

ultra-sonografia, relaxamento da cervice e folículos de pequena a moderada flutuação com diâmetro entre 35 e 45mm, 12 a 30 horas (h) antes da punção ovariana.

Previamente à aspiração folicular, os animais eram contidos em brete ajustável e promovido o esvaziamento retal e higienização da região perineal. Analgesia e sedação foram obtidas com a aplicação, por via intravenosa (IV) de uma associação de 200 mg de cloridrato de xilazina (Sedomim[®] 10%¹¹) e 10 mg de tartarato de butorfanol (Turbogestic[®] 10%¹²) cerca de 5 minutos antes do procedimento de punção. Com o objetivo de alcançar maior relaxamento da musculatura retal, foram aplicados 50 mg, IV, de N-butil brometo de hioscina + dipirona sódica (Buscopam Composto[®]¹³) 10 minutos antes da manipulação ovariana em 10 animais. Oito éguas foram submetidas à anestesia epidural com a aplicação de 5mL de cloridrato de lidocaina a 2% (Anestésico Pearson[®]¹⁴) no espaço intervertebral da última vértebra sacral e a primeira coccígea. cerca de 10 minutos previamente a realização dos procedimentos

Aspiração Folicular e Avaliação do Conteúdo Folicular

O procedimento de aspiração folicular foi realizado por via transvaginal guiada por ultra-som (Scanner240¹⁵) com transdutor setorial de 5MHz, acoplado a uma sonda metálica de duas vias. Por esta sonda, além do cabo e transdutor, passava parte do sistema de punção que era composto da agulha de punção, equipo, copo coletor e bomba de vácuo. Realizada a fixação do ovário, através de palpação retal, a sonda metálica era introduzida pela vulva e vestibulo até o fórnix vaginal ipsilateral ao ovário a ser puncionado. A bomba de vácuo utilizada (V-MAR 5100¹⁶) era ligada ao sistema de punção e promovia a pressão negativa necessária à recuperação do conteúdo folicular.

A imagem do folículo a ser aspirado era ajustada à linha de punção e a agulha introduzida no antro folicular no momento em que o sistema era submetido à pressão negativa. O líquido folicular era recuperado no copo coletor para posterior procura e avaliação do Complexo *Cumulus-oocito* (COC)

¹¹ Köning S/A

¹² Fort Dodge S/A

¹³ Boeringer Ingelheim

¹⁴ Pearson Saúde Animal LTDA

¹⁵ Pie Medical[®]

¹⁶ Cook Veterinary Products Inc.

Após a aspiração folicular e recuperação de seu conteúdo no copo coletor, procedia-se a procura e avaliação dos COCs em placa de Petri, com auxílio de um estereomicroscópio binocular¹⁷ com magnificação entre 15 e 60 vezes. Nos casos de identificação de estruturas compatíveis com COCs, as mesmas eram transferidas para uma placa de Petri menor, contendo meio de manutenção de embriões¹⁸ e avaliado quanto a presença e grau de expansão do *cumulus*.

Coleta e Preparação do Sêmen

O sêmen utilizado nos procedimentos de GIFT e de IA previamente à TO foi obtido de 3 garanhões de comprovada fertilidade e com padrão espermático dentro da normalidade. A coleta foi realizada com auxílio de vagina artificial (VA) modelo Botucatu. Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a volume, aspecto, motilidade, vigor e concentração. Nas GIFT, realizou-se uma diluição com meio de manutenção para embriões na concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL, com a finalidade de fornecer 1×10^6 espermatozoides em 50 μ L de meio de manutenção de embriões. Na TO, o sêmen foi diluído em leite desnatado na proporção de 3 partes de leite para 1 de sêmen, proporcionando uma concentração de cerca de 50×10^6 espermatozoides/mL, fornecendo 1×10^9 espermatozoides em 20mL de sêmen.

Transferência de Gameta Intrafalopiano (GIFT) e Transferência de Oócito (TO)

Três éguas do lote, após terem seus folículos aspirados, foram utilizadas como receptoras dos oócitos. Em 2 animais foi realizada a técnica de GIFT e em outro a de TO. Os gametas foram transferidos para o oviduto das receptoras por meio de laparotomia de flanco conforme descrito por McCue *et al.* (1998). O protocolo de sedação e analgesia foi semelhante ao previamente descrito para a punção ovariana acrescido de anestesia local com cerca de 40 a 60 mL de cloridrato de lidocaína à 2% aplicado em linha no local da incisão. Quando julgado necessário, realizava-se a

¹⁷ Euromex[®]

¹⁸ Holding AB Tech[®]

suplementação com o analgésico e o relaxante. Após a diérese da parede abdominal, o ovário era cuidadosamente tracionado e exposto e o óstio infundibular localizado. Os oócitos a serem transferidos eram recuperados juntamente com cerca de 50 µL de meio de manutenção de embriões da placa de Petri com o auxílio de uma micropipeta de vidro com a ponta polida a fogo acoplada a uma seringa de 1 mL. No caso de GIFT, o sêmen diluído na proporção anteriormente citada, era incorporado ao meio contendo o COC e aspirado com a micropipeta, fornecendo cerca de 5×10^5 espermatozóides viáveis. Estas receptoras tiveram o procedimento realizado no ovário contra-lateral ao da punção. Na TO, a égua foi inseminada com 20 mL de sêmen e pelo menos 1×10^9 espermatozóides por via transcervical cerca de 1 h antes da cirurgia. Este animal recebeu seu próprio oócito na tuba uterina contra-lateral a do ovário puncionado.

Durante a transferência dos gametas, a pipeta era introduzida 2 a 3 cm através do infundíbulo e ampola da receptora e o seu conteúdo depositado no oviduto.

A síntese era realizada conforme o procedimento padrão para eqüinos e os animais recebiam 10.000.000 UI de penicilina G procaína + dihidroestreptomicina + piroxicam IM (Agrovet Plus^{®19}) por 5 dias e 10 mL IV de flumexim meglumine (Flumedim[®] 5%²⁰) nos 3 dias posteriores à cirurgia. Exames ultra-sonográficos foram realizados por 3 dias após o procedimento com a finalidade de verificar a presença de líquido uterino.

RESULTADOS

Quatro oócitos foram recuperados de 54 folículos aspirados (7,41%), distribuídos nos grupos conforme exposto na Tabela 2.

Das 4 estruturas recuperadas, 3 apresentaram-se com o *cumulus* expandido e 1 dos oócitos desnudado. No momento da aspiração os folículos possuíam diâmetro entre 38 e 58 mm ($x = 46,22$).

Dentre os 22 animais que receberam 2500 UI de hCG, 14 foram submetidos à aspiração folicular e dois (14,3%) tiveram seus oócitos recuperados. Oito animais tiveram ovulação prévia a punção folicular (Tabela 3).

¹⁹Novartis Saúde Animal

²⁰Jofadel Indústria Farmacêutica S/A

Tabela 2: Percentual de oócitos recuperados por grupo experimental, morfologia das estruturas recuperadas, diâmetro (mm) dos folículos aspirados.

Grupo	N*	N**(%)	Morfologia	Diâmetro(mm)
I	22	1 (4,6)	Expandido	41
II	3	0 (0,0)	-	-
III	18	1 (5,6)	Expandido	50
IV	5	0 (0,0)	-	-
V	6	2 (33,3)	Expandido/Desnudado	41/41

*: número de folículos aspirados

** : número de oócitos recuperados

Nenhuma das 3 éguas que receberam as estruturas classificadas como *Cumulus* expandido através dos procedimentos de Transferência de Oócito e GIFT, apresentaram vesícula embrionária ao exame ultrasonográfico nos dias 14, 15 e 16 pós-cirúrgico. A receptora da TO foi diagnosticada com moderada presença de líquido intra-uterino no segundo dia pós-cirúrgico e tratada com 30 UI de ocitocina IV (Placentex®²¹)

Tabela 3: Percentual de oócitos recuperados por grupo experimental tratado e não tratado com hCG.

Grupo	N*	N**(%)	Estruturas Recuperadas (%)
Tratado com hCG	22	14(63,64)	2/14 (14,3)
Não Tratado	26	26 (100)	2/26 (7,7)

* número de éguas por grupo

** : número de folículos aspirados

As duas éguas que sofreram o procedimento de GIFT foram cobertas na temporada reprodutiva seguinte e gestaram. O animal da TO não foi utilizado na reprodução. Não foi observada qualquer alteração na fertilidade das éguas que foram submetidas à punção folicular. Diversos destes animais foram utilizados na estação reprodutiva sem apresentar qualquer problema relacionado às punções.

Outro aspecto a salientar foi a suficiente contenção química dos animais, tanto nos procedimentos de aspiração folicular quanto nas laparotomias

O protocolo anestésico foi adequado ao nível de manipulação a que as éguas foram submetidas. Não houve movimentação excessiva que impedisse a coleta do fluido

²¹ União Química Farmacêutica Nacional

folicular ou no momento da cirurgia. Entretanto, alguns animais tiveram que receber doses superiores de cloridrato de xilazina e tartarato de butorfanol. Apenas 1 égua apresentou perda de consciência, caindo no brete. Este animal permaneceu em decúbito por cerca de 5 minutos, após isto, retornou a posição de estação e teve seu folículo aspirado normalmente.

A tentativa de promover diminuição do tônus retal, através da administração de hioscina sódica ou anestesia epidural com cloridrato de lidocaína, não mostrou ser necessária na maioria dos casos.

DISCUSSÃO

Os resultados de taxa de recuperação de oócitos observados nos trabalhos variam seus valores entre 8% e 85% de eficiência (PYCOCK 1996; LANDIM-ALVARENGA 1999). No presente trabalho quatro oócitos foram recuperados dos 54 folículos aspirados (7,41).

Os equipamentos e os níveis de pressão utilizados no presente experimento foram semelhantes aos rotineiramente adotados pelos pesquisadores que têm trabalhado com aspiração folicular em éguas. Contudo, a taxa alcançada não está em acordo com aquelas recentemente descritas por Coutinho da Silva *et al.* (2004) com 76% e Carnevale *et al.* (2005) com 77% de eficiência na coleta de oócitos.

Kanitz *et al.* (1995) citam que o aumento da pressão utilizada afetava a qualidade do oócito. O fato também foi observado no presente experimento, já que um dos oócitos coletados apresentava-se desnudado, justamente aquele oriundo de um folículo submetido à alta pressão e agulha fina (18G).

Dados de literatura indicam que pressões de 150 mmHg são suficientes para promover uma boa taxa de recuperação de oócitos. Mari *et al.* (2005) obteve 46,4% de sucesso, Coutinho da Silva *et al.* (2002b), 78% e Carnevale *et al.* (2000) 65% de eficiência na recuperação de oócitos.

Pressões de 230 a 300 mmHg são descritas por Duchamps *et al.* (1995) e suas taxas de recuperação variaram de 17 a 60%. Meintjes *et al.* (1994) alcançaram taxas de recuperação de 85% com pressões de 90 mmHg, indicando que a pressão utilizada não é o fator limitante na eficiência da recuperação.

O tamanho das agulhas utilizadas pelos diversos autores variaram de 50 a 115 cm e tiveram taxas de recuperação semelhantes: Brück *et al.* (1992) 25% e Brück *et al.* (1997) 35,8%.

O uso de agulhas com diâmetro de 18G são citadas por Brück *et al.* (1997) que obtiveram taxas de até 35,8% de recuperação; agulhas 14G foram utilizadas por Hinrichs *et al.* (1990), Hinrichs. (1991) e Hinrichs *et al.* (1998a) com eficiências entre 47,8% e 70,5%.

A análise destes dados sugere que outros fatores que não apenas equipamentos e pressão estão envolvidos no sucesso da técnica.

A maturação oocitária, com auxílio de gonadotrofinas está bem documentada e parece exercer influência na recuperação de estruturas (COOK *et al.* 1993; HINRICHS *et al.* 1998a). Hinrichs *et al.* (1990), entretanto não observaram diferenças entre os grupos tratados ou não com hCG (69% *versus* 71%, respectivamente).

No presente experimento 2 oócitos (7,7%) foram obtidos de folículos de 26 éguas que não receberam tratamento à base de hCG e duas estruturas (14,3%) foram obtidas das 14 éguas que receberam 2500 UI de hCG previamente à punção, conforme pode ser observado na Tabela 3. Vinte e dois animais receberam hCG na tentativa de promover a maturação folicular, entretanto 8 éguas tiveram suas ovulações anteriores ao procedimento de aspiração folicular. Squires *et al.* (2003), ressalta a possibilidade da ocorrência de ovulação previamente à aspiração como uma das desvantagens de se aguardar mais de 24 horas após a aplicação de hCG para proceder a aspiração de folículos.

O diâmetro médio dos folículos aspirados (46,22mm) foi superior aos observados por Hinrichs *et al.* (1990) que variaram entre 32 ± 2 mm até 42 ± 2 mm, apesar de os animais terem pesos semelhantes à dimensão dos folículos sugere que os mesmos estavam em estágio avançado de maturação.

Um aspecto que segundo diversos autores está relacionado com aumento da eficiência da recuperação de oócitos é a lavagem do folículo. Shabpareh *et al.* (1993) e Mari *et al.* (2005) observaram diferença significativa na recuperação de oócitos de folículos lavados e não lavados (38%) *versus* (24) e (46,4%) *versus* (12,5%), respectivamente. Para facilitar o processo de lavagem dos folículos, pode-se lançar mão de agulhas de duplo lúmen.

A contenção mecânica e química das éguas é um aspecto importante para a realização dos procedimentos de punção ovariana e transferências de gametas.

A utilização de sedativos e analgésicos é descrito por diferentes autores e os protocolos anestésicos variam conforme o grupo de pesquisadores.

Acepromazina, cloridrato de xilazina e detomidina, são as drogas mais comumente empregadas como tranqüilizantes e relaxantes musculares. Seu uso foi descrito por Brück *et al.* (1992), Carnevale *et al.* (2005), Mari *et al.* (2005). O efeito da detomidina não foi testado devido à inexistência da comercialização do produto no Brasil. O tartarato de butorfanol é um potente analgésico e da mesma forma seu uso é citado em diversos trabalhos (ver revisão de Pycock, 1996).

A associação de cloridrato de xilazina e tartarato de butorfanol empregado no presente experimento mostrou-se suficiente para promover o conforto e a segurança necessários tanto para o animal quanto para o operador. Apesar de uma égua ter demonstrado sinais de sobredosagem, o animal recuperou-se e permitiu a finalização do procedimento com a punção do folículo.

Drogas como a hioscina, sulfato de atropina e propantelina bromida, usadas com a finalidade de promover o relaxamento da musculatura retal e a diminuição do peristaltismo, são descritas e normalmente empregadas pelos pesquisadores (BRÜCK *et al.*,1992; MEINTJES *et al.*,1995; COUTINHO DA SILVA *et al.* 2002a). Com esta finalidade, 20mL de hioscina sódica foram aplicados por via intravenosa em 10 animais, seu efeito, entretanto não pareceu distinto daqueles animais que não receberam o tratamento. Hinrichs *et al.* (1998a) ainda citam que o uso de 20 mL de solução de lidocaína à 2%, instilada no reto com auxílio de pipeta de inseminação e seringa promove um maior relaxamento da musculatura da parede retal. O procedimento de anestesia epidural, da mesma forma reduz a dor e o desconforto do animal e facilitam a manipulação dos ovários, porém não foi observado um conforto adicional que justifique a inclusão do protocolo anestésico aos próximos procedimentos.

Este fato pode ser explicado pela possível suplantação do efeito da lidocaína pelo uso do tartarato de butorfanol associado ao cloridrato de xilazina. Além disso, o tempo de 10 minutos previamente ao início dos procedimentos de aspiração folicular podem ter sido insuficientes para o pleno efeito do anestésico local.

Das 48 éguas utilizadas no experimento, seis animais tiveram dois folículos aspirados no mesmo procedimento. O fenômeno de crescimento folicular e dupla ovulação em éguas é descrito por Squires *et al.* (1987) e parece ser influenciado por fatores genéticos e nutricionais .

Os quatro oócitos recuperados foram avaliados quanto à morfologia e grau de expansão das células do *cumulus*. Três estruturas apresentavam o *cumulus* expandido, indicando maturação dos oócitos, estes achados são compatíveis com os de Hinrichs *et al.* (1998a).

Os três procedimentos cirúrgicos realizados não apresentaram complicações pós-operatórias quanto à contaminação da ferida ou do peritônio. Nenhuma das éguas que receberam oócito, tanto por GIFT quanto por TO apresentaram crescimento embrionário, isto contraria as observações de Carnevale e Ginther (1995), que alcançaram índices de até 92% de prenhez com a técnica de TO e as de Coutinho da Silva *et al.* (2002b) com 82% de sucesso nos procedimentos de GIFT.

As duas éguas que receberam os gametas através de GIFT em março de 2005 foram cobertas e tiveram prenhez confirmada na temporada seguinte, indicando que o processo a que foram submetidas não afetou sua fertilidade.

Presença de líquido intra-uterino foi diagnosticada, através de ultra-sonografia, dois dias após a cirurgia da égua que recebeu oócito através de TO, este animal foi tratado conforme anteriormente descrito, porém, não foi novamente coberto o que impossibilitou a avaliação da interferência do procedimento sobre sua fertilidade. Igualmente, Coutinho da Silva *et al.* (2002b), observaram acúmulo de líquido uterino em 7/9 (78%) das éguas que receberam sêmen por via cervical após TO e em nenhuma das 8 que sofreram processo de GIFT. Hinrichs *et al.* (2000), também observaram a presença de líquido intra-uterino em 2 de 5 éguas que foram submetidas a TO.

Não obstante, e citado por três autores (BÉZARD 1997; LANDIM-ALVARENGA 1999 e MARI *et al.* 2005); um fator essencial para o sucesso na recuperação de oócitos é a experiência do operador. Cabe salientar que resultados superiores a 70% de eficiência foram obtidos por grupos de pesquisadores com mais de 10 anos de experiência no emprego da técnica.

Assim, pode-se concluir que a aspiração de folículos pré-ovulatórios é um passo fundamental para o uso de modernas técnicas de reprodução assistida e que mais estudos e principalmente rotinas devem ser executados para melhorar a eficiência das coletas. As técnicas de punção ovariana, GIFT e TO foram realizadas sem causar prejuízo à saúde geral e à fertilidade dos animais.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. The Development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin v. 40, p. 310-329, 2005.
- BÉZARD, J. Apects of in vivo and in vitro fertilization of the equine oocyte, **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre v. 25, p. 36-61, 1997. Suplemento.
- BRÜCK, I. *et al.* Effect of administering a crude equine gonadorophin preparation to mares on follicular development, oocytes recovery rate and oocyte maturation *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 118, p. 351-360, 2000.
- BRÜCK, I. *et al.* Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasoun-guided technique. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk v. 24, p. 58-59, 1992.
- BRÜCK, I., SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSh-treated mares. **Theriogenology**, Los Altos. v. 47, p. 1157-1167, 1997.
- CARNEIRO, G.F. Biotechnology of reproduction – assisted reproductive techniques the horse. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 163-171, 2003. Suplement.
- CARNEVALE, E. M. Aplication of intraoviductal transfer of gametas in the horses. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**, Porto Alegre (), v. 28, p. 89-97, 2000. Suplemento
- CARNEVALE, E. M. Factors affecting the success of oocytes transfer in a clinical program for subfertile mare. **Theriogenology**, Los Altos v. 64 p. 519-527, 2005.
- CARNEVALE, E. M. *et al.* Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 54, p. 981-987, 2000.
- CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology Reproduction Monographs**, Wiscosin v. 1, p. 209-214, 1995.
- CARNAVALE, E. M *et al.* Equine sperm-oocytes interaction: Results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã v. 68, p. 305-314, 2001a.
- CARNEVALE, E. M. *et al.* Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 218, n. 1, p. 87-91, 2001b.
- COCHRAN, R. *et al.* Production of live foals from sperm-injected oocytes harvested from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 503-512, 1998. Suplement.

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

COUTINHO DA SILVA, M. A. Oocytes Transfer and Intracytoplasmic Sperm Injection in Horses. **Acta Scientia Veterinariae**, Porto alegre, v.32, p.55-64, 2004. Supplement

COUTINHO DA SILVA, M. A. *et al.* Oocytes transfer in mare with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, p. 705-713, 2004.

COUTINHO DA SILVA, M. A. *et al.* Embryo development rates after oocyte transfer comparing intrauterine or intraoviductal insemination and fresh or frozen semen in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p. 359, 2001. Abstract.

COUTINHO DA SILVA M. A. *et al.* Use of fresh, cooled and frozen semen during gamete intrafallopian transfer in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p, 763-766, 2002a. Abstract.

COUTINHO DA SILVA, M. A. *et al.* Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocytes transfer in mare. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1275-1279, 2002b.

DELL`AQUILA, M. E. *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during breeding season. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, p. 547-560, 1996.

DUCHAMPS, G.; BÉZARD, J.; PALMER, E. Oocytes yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v.1, p. 233-241, 1995.

GALLI, C. *et al.* Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p. 705-708, 2002.

GALLI, G. *et al.* Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v 424, p. 635-636, 2003.

HINRICHS K.; KENNEY R. M.; A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. **Theriogenology**, Los Altos, v. 27, p. 237, 1987.

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

HINRICHS K.;The relationship of follicle atresia to follicle size oocyte recovery aspiration, and oocyte morphology in the mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 36, p. 157-168, 1991.

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

HINRICHS K. *et al.* Oocyte transfer in mares. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 212, n. 7, p. 982-986, 1998a.

HINRICHS K. *et al.* Effect of time of follicular aspiration on pregnancy rates after oocyte transfer in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge v. 56, p. 493-498, 1998b. Supplement.

HINRICHS, K., PROVOST, P. J., TORELLO, E. M. Treatments resulting in pregnancy in nonovulating hormone-treated oocyte recipient mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 54, p. 1285-1293, 2000.

IMEL, K. J. *et al.* Collection and transfer of equine embryos. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 179, p. 987-991, 1981.

KANITZ, W. *et al.* Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v. 1, p. 225-231, 1995.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; Produção *in vitro* de embriões eqüinos: avanços e limitações. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre), v. 27, p. 54-89, 1999. Suplemento

MacLELLAN L. J. *et al.* Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p. 911-919, 2002.

MARI, G. *et al.* Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 88, p. 299-308, 2005.

McCUE P. M. *et al.* Oviductal insemination of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 499-502, 1998. Supplement.

McKINNON A. O. *et al.* Heterogenous and xenogenous fertilization of *in vitro* matured equine oocytes. **Journal of Equine Veterinary Science**, San Dimas, v. 8, p. 143-147, 1988.

McKINNON A. O.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUSON A. O.; Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into *in vivo* matured mare oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 513-517, 1998. Supplement.

MEINTJES, M. *et al.* Repeated transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from pregnant mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41, p. 255, 1994. Abstract.

MEINJES, M. *et al.* Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v. 1, p. 281-292, 1995

PALMER, E. *et al.* *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 375-384, 1991. Supplement.

PALMER, E. *et al.* Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 689-690, 1987.

PIETERSE, M. C. *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, Los Altos, v. 30, p.751-762, 1988.

PREIS, K. A. *et al.* *In vitro* maturation and transfer of ovaries at 12 or 22 °C. **Theriogenology** Los Altos v. 61 p. 1215-1223, 2004.

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

SCOTT T. J. *et al.* Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, p. 705-715, 2001.

SHABPAREH, V. *et al.* Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 40, p. 1161-1175, 1993

SCHMIDT R. L. *et al.* Effects of follicular fluid or progesterone on *in vitro* maturation of equine oocytes before Intracytoplasmic Sperm Injection with non-sorted and sex-sorted spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 519-525, 1998. Supplement.

SQUIRES E. L.,. Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction. **Acta Scientia Veterinariae**, Porto alegre, v.33, p.69-81, 2005. Supplement.

SQUIRES E. L. *et al.* Spontaneous multiple. ovulation in the mare and its effects on the incidence of twin embryo collectinos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 28,p. 609-614, 1987.

SQUIRES E. L. *et al.* Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, Los altos, v. 59, p. 151-170, 2003.

SQUIRES E. L. *et al.* A pregnancy after Intracytoplasmic Sperm Injection into equine oocytes mated *in vitro*. **Theriogenology** ,Los altos, v. 45, p. 306, 1996.

VOGELSANG, M.M. *et al.* Methods for collecting follicular oocytes from mares **Theriogenology**, Los Altos, v. 29, p. 1007-1018, 1988.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Ao término da execução do presente trabalho, pode-se afirmar que uma série de objetivos previamente estabelecidos foram alcançados. Algumas questões, entretanto não foram completamente elucidadas, necessitando de um maior esforço para que cheguemos a respostas precisas.

Oócitos provenientes de OPU poderão ser empregados em experimentos de PIV. A avaliação de capacitação espermática e a maturação e cultivo *in vitro*, processos ainda pouco entendidos na espécie, serão melhor testados e estudados.

A TN, recentemente realizada com sucesso em equídeos, tem como insumo básico o oócito maduro e de boa qualidade. Neste aspecto, os conhecimentos de maturação *in vivo*, aspiração folicular e recuperação de oócitos, parece um caminho interessante para melhorar a eficiência da técnica, hoje ainda, bastante limitada. Assim, uma série de possibilidades surge associada a eficiência da aspiração folicular

De maneira satisfatória o treinamento nas técnicas da aspiração folicular e transferência de gameta foram executados de forma que permitiram aprofundar conhecimentos e facilitar o domínio das tecnologias de reprodução assistida na espécie equina.

A baixa eficiência na recuperação de oócitos observada no presente experimento evidencia a necessidade de maior treinamento na tentativa de melhorar estes resultados.

Para novos experimentos sugere-se o emprego de níveis de pressão intermediários aos testados. Agulhas com espessura de 12G e 16G, lúmen duplo ou simples e diferentes comprimentos podem ser testadas. Cabe ainda, comparar a eficiência do transdutor linear com o utilizado no experimento. A influência de hormônio como hCG e GnRH, como promotores de maturação folicular precisa ser melhor entendida. O momento mais adequado à realização da punção é outro ponto crucial e necessita ser mais bem estudado. Por fim, a lavagem sucessiva do antro folicular parece ter grande importância na taxa de recuperação e deve ser objeto de futuras investigações.

Tem-se a convicção de que os resultados de recuperação de oócitos podem ser melhorados com treinamento e formação de rotina no processo de aspiração folicular. Este aperfeiçoamento do processo melhorará as taxas de recuperação oocitária e disponibilizará o material fundamental para a aplicação das modernas tecnologias.

Os procedimentos de GIFT e TO, além de viabilizar a produção de filhos de animais considerados inférteis por causas adquiridas, certamente proporcionarão um melhor entendimento da complexa interação entre oócito, espermatozóide e ambiente tubárico, trazendo avanços ao conhecimento da fisiologia da fecundação e desenvolvimento embrionário precoce.

REFERÊNCIAS

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

ALM, H.; TORNER, H. *In vitro* maturation of horse oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 42, p. 345-349, 1994.

ALVARENGA, M. A. *et al.* Ovarian response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily **Theriogenology**, Los Altos, v. 56, p. 879-887, 2001.

BÉZARD, J. Aspects of *in vivo* and *in vitro* fertilization of the equine oocyte, **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre v. 25, p. 36-61, 1997. Suplemento.

BÉZARD, J. *et al.* Meiotic stage the preovulatory equine oocyte at collection and competence of immature oocytes for *in vitro* Maturation: effect of interval from induction of ovulation to follicle puncture. **Theriogenology**, Los Altos v. 47, p. 386, 1997.

BØGH, I. B., *et al.* Steroid concentrations in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. **Theriogenology**, Los Altos v. 54, p. 877-888, 2000.

BRINSKO, S. P., BALL', B. A., ELLINGTON, J. E. *In vitro* maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 44, p. 461-469, 1995.

BRÜCK, I. *et al.* Effect of administering a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocytes recovery rate and oocyte maturation *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 118, p. 351-360, 2000.

BRÜCK, I., GREVE, T. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. **Theriogenology**, Los Altos v. 41, p. 170, 1994. Abstract.

BRÜCK, I. GREVE, T., HYTTEL, P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. **Anatomy and Embryology**, v. 199, p. 21-28, 1999.

BRÜCK, I. *et al.* *In vitro* maturation of equine oocytes: Effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, Los Altos. v. 46, p. 75-84, 1996.

BRÜCK, I. *et al.* Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Veterinary Journal**, Suffolk v. 24, p. 58-59, 1992.

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

CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. Evolução da transferência de embriões no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 280, 2003. Abstract.

CARNEIRO, G.F. Biotechnology of reproduction – assisted reproductive techniques the horse. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 163-171, 2003. Supplement.

CARNEVALE, E. M. Oocyte transfer and gameta intafallopian transfer in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã v. 82-83, p. 617-624, 2004.

CARNEVALE, E. M. Aplicação de intraoviductal transfer of gametas in the horses. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**, Porto Alegre (), v. 28, p. 89-97, 2000. Suplemento

CARNEVALE, E. M. *et al* Effects of culture media and time of insemination on oocyte transfer. **Theriogenology**, Los Altos v. 58, p. 759-762, 2002.

CARNEVALE, E. M. *et al* Factors affecting the success of oocytes transfer in a clinical program for subfertile mare. **Theriogenology**, Los Altos v. 64 p. 519-527, 2005.

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

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, Los Altos v. 37, p. 1101-1115, 1992.

CARNAVALE, E. M *et al*. Equine sperm-oocytes interaction: Results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã v. 68, p. 305-314, 2001a.

CARNEVALE, E. M. *et al*. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 54, p. 981-987, 2000.

CARNEVALE, E. M. *et al*. Pregnancies obtained after collection and transfer of oocytes from ovaries of euthanized mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, p. 362, 2003a. Abstract.

CARNAVALE, E. M.. *et al*. Pregnancies attained 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. *et al*. Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 218, n. 1, p. 87-91, 2001b.

CARNEVALE, E. M *et al*. Comparison of oocytes from young and old mares. **Theriogenology**, Los Altos v. 51, p. 299, 1999. Abstract.

COCHRAN, R. *et al.* Production of live foals from sperm-injected oocytes harvested from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 503-512, 1998. Supplement.

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

COUTINHO DA SILVA, M. A. Oocytes Transfer and Intracytoplasmic Sperm Injection in Horses. **Acta Scientia Veterinariae**, Porto alegre, v.32, p.55-64, 2004. Supplement

COUTINHO DA SILVA, M. A. *et al.* Oocytes transfer in mare with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, p. 705-713, 2004.

COUTINHO DA SILVA, M. A. *et al.* Embryo development rates after oocyte transfer comparing intrauterine or intraoviductal insemination and fresh or frozen semen in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p. 359, 2001. Abstract.

COUTINHO DA SILVA M. A. *et al.* Use of fresh, cooled and frozen semen during gameta intrafallopian transfer in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p, 763-766, 2002a. Abstract.

COUTINHO DA SILVA, M. A. *et al.* Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocytes transfer in mare. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1275-1279, 2002b.

DEL CAMPO M. R.; DONOSO, M. X.; PARRISH, J. J., *In vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v.37, p 200. 1992. Abstract.

DELL'AQUILA M. E. *et al.* Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) *versus* conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matured equine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, p. 1139-1156, 1997.

DELL'AQUILA, M. E. *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during breeding season. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, p. 547-560, 1996.

DUCHAMPS, G.; BÉZARD, J.; PALMER, E. Oocytes yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v.1, p. 233-241, 1995.

GALLI, C. *et al.* Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p. 705-708, 2002.

GALLI, G. *et al.* Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v 424, p. 635-636, 2003.

GUIGNOT, F. BÉZARD, J. PALMER, E.; Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after *in vitro* maturation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 52, p. 757-766, 1999.

GRØNDAHL, C. *et al.* *In vitro* production of equine embryos. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin v. 1, p. 299-307, 1995.

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

HINRICHS K.; The relationship of follicle atresia to follicle size oocyte recovery aspiration, and oocyte morphology in the mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 36, p. 157-168, 1991.

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

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

HINRICHS K.; KENNEY R. M.; A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. **Theriogenology**, Los Altos, v. 27, p. 237, 1987.

HINRICHS K. *et al.* Oocyte transfer in mares. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 212, n. 7, p. 982-986, 1998a.

HINRICHS K. *et al.* Effect of time of follicular aspiration on pregnancy rates after oocyte transfer in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge v. 56, p. 493-498, 1998b. Supplement.

HINRICHS, K.; PROVOST, P. J.; TORELLO, E. M. Birth of foal after oocyte transfer to a nonovulating hormone-treated recipient mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 1251-1258, 1999.

HINRICHS, K., PROVOST, P. J., TORELLO, E. M. Treatments resulting in pregnancy in nonovulating hormone-treated oocyte recipient mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 54, p. 1285-1293, 2000.

IMEL, K. J. *et al.* Collection and transfer of equine embryos. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 179, p. 987-991, 1981.

KANITZ, W. *et al.* Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v. 1, p. 225-231, 1995.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; Produção *in vitro* de embriões eqüinos: avanços e limitações. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre), v. 27, p. 54-89, 1999. Suplemento

LAZZARI G. *et al.* Equine embryos at the compacted morulae and blastocyst stage can be obtained by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of *in vitro* matured oocyte with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p. 709-712, 2002.

LI, L. Y. *et al.* *In vitro* fertilization and development of *in vitro*-matured oocytes aspirated from pregnant mares. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v. 1, p. 309-317, 1995.

MacLELLAN L. J. *et al.* Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, p. 911-919, 2002.

MARI, G. *et al.* Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 88, p. 299-308, 2005.

McCUE P. M. *et al.* Oviductal insemination of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 499-502, 1998. Supplement.

McKINNON A. O. *et al.* Heterogenous and xenogenous fertilization of *in vitro* matured equine oocytes. **Journal of Equine Veterinary Science**, San Dimas, v. 8, p. 143-147, 1988.

McKINNON A. O.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUSON A. O.; Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into *in vivo* matured mare oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 513-517, 1998. Supplement.

MEINTJES, M. *et al.* Repeated transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from pregnant mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41, p. 255, 1994. Abstract.

MEINTJES, M. *et al.* Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization. **Biology Reproduction Monographs**, Wisconsin, v. 1, p. 281-292, 1995

PALMER, E. *et al.* *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 375-384, 1991. Supplement.

PALMER, E. *et al.* Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 689-690, 1987.

PERES, K.R. *et al.* Non-surgical equine embryo transfer: A retrospective study. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, p.558, 2002. Abstract.

PIETERSE, M. C. *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, Los Altos, v. 30, p.751-762, 1988.

PREIS, K. A. *et al.* *In vitro* maturation and transfer of ovaries at 12 or 22 °C. **Theriogenology** Los Altos v. 61 p. 1215-1223, 2004.

- PYCOCK, J.F.; Recovery of oocytes using transvaginal ultrasound in the mare: current equipment, techniques and applications. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, p. 148-167, 1996.
- SALAZAR, F. *et al.* Sequential non-surgical embryo recovery. **Theriogenology**, Los Altos, v. 13, p. 110, 1980.
- SHABPAREH, V. *et al.* Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 40, p. 1161-1175, 1993
- SCHMIDT R. L. *et al.* Effects of follicular fluid or progesterone on *in vitro* maturation of equine oocytes before Intracytoplasmic Sperm Injection with non-sorted and sex-sorted spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 519-525, 1998. Supplement.
- SCOTT T. J. *et al.* Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, p. 705-715, 2001.
- SILVEIRA, L. *et al.* A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 412-416, 2005.
- SQUIRES E. L.,. Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction. **Acta Scientia Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, p.69-81, 2005. Supplement.
- SQUIRES E. L. *et al.* Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, p. 151-170, 2003.
- SQUIRES E. L. *et al.* Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effects on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, Los Altos, v. 28, p. 609-614, 1987.
- SQUIRES E. L., McCUE P. M., VANDERWALL D.; The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 91-104, 1999.
- SQUIRES E. L. *et al.* A pregnancy after Intracytoplasmic Sperm Injection into equine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 45, p. 306, 1996.
- TISCHNER, M., BIELAŃSKI, A.; Non-surgical embryo collection in the mare and subsequent fertility of donor animals. **Journal of Reproduction and Fertility** Cambridge, v. 58, p. 357-361, 1980.
- VOGELSANG, M.M. *et al.* Methods for collecting follicular oocytes from mares **Theriogenology**, Los Altos, v. 29, p. 1007-1018, 1988
- WIRTU, G. *et al.* Xenogenous fertilization of equine oocytes following recovery from slaughterhouse ovaries and *in vitro* maturation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, p. 381-391, 2004.