

Reprodução assistida em éguas: revisão de literatura

Marcus André Ferreira Sá

Mestre em Medicina Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (PPGMV/IV/UFRRJ), Doutorando em Medicina Veterinária (PPGMV/IV/UFRRJ). marcus.ferreira85@hotmail.com

Anna Carolina Fontoura Custódio

Discente do curso de Medicina Veterinária do UBM (Barra Mansa, RJ, Brasil)
carolfontoura@me.com

Paula Cardoso de Almeida Silva

Doutora em Medicina Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (PPGMV/IV/UFRRJ).
paulinha_calmeida@hotmail.com

Júlio César Ferraz Jacob

Prof. Doutor do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal - UFRRJ.
juliorep@ufrj.com

Resumo

Ao longo da década de 90 e início dos anos 2000, a técnica de transferência de embriões se consolidou como importante ferramenta para obter produtos de éguas de elevado valor zootécnico. Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações, em especial para animais que apresentem patologia de trato reprodutivo, considerados inférteis ou subférteis. Com a obtenção de oócitos é possível desenvolver algumas biotécnicas reprodutivas para contornar essas limitações. Sendo assim, a presente revisão de literatura objetivou abordar os pontos críticos que podem interferir nas biotécnicas reprodutivas em equinos. Foi possível observar que: apesar dos avanços ocorridos nos resultados de gestações obtidos nas biotécnicas, ainda há necessidades de mais estudos sobre o tema; a produção *in vitro* de embriões através da injeção intracitoplasmática de espermatozoides pode se tornar futuramente importante ferramenta para reprodução de animais de alto valor zootécnico.

Palavras-chave: Transferência de embriões. Transferência de oócitos. GIFT. ICSI.

Abstract

During the 90s and early 2000s, the embryo transfer technique was established as an important tool for obtain products from high zootechnical value mares. However, this technique has some limitations, mainly for animals that have reproductive pathology, considered infertile or subfertile. Using equine oocytes, we can develop some reproductive biotechnologies to improve these limitations. Therefore, this literature review aimed discuss about critical issues that can influence reproductive biotechnologies in horses. It was observed that: despite the advances in the pregnancies results achieved in biotechnologies, more studies on the subject are needed; the *in vitro* embryo production by ICSI can become a important tool to obtain products from high zootechnical value mares.

Keywords: Embyo transfer. Oocyte transfer. GIFT. ICSI.

Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

Diante disto, o objetivo da presente revisão de literatura foi abordar os pontos críticos que podem interferir na obtenção do oócito em equinos.

Maturação folicular e oocitária

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

A Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) administrada na presença de folículos preovulatórios leva a expansão da Hialurona Sintetase-2 (HAS-2) nas células da granulosa mural enquanto a onda de LH causa a expansão de toda camada de células do cumulus (STOCK, 2002). O hCG pode ainda proporcionar mais rapidamente a

elevação na concentração de LH (GINTHER *et al.*, 2009), o que pode influenciar no processo de expansão das células do cumulus e liberação oocitária, aumentando a taxa de recuperação.

Durante o processo de expansão destas células, ocorre a secreção de ácido hialurônico (HA) pelo próprio cumulus, o que leva a formação de uma matriz extracelular viscosa. A deposição de matriz extracelular é prejudicada pelo citoesqueleto das células do cumulus. Entretanto, o LH estimula a despolarização e o alongamento destas células, acompanhadas pela redistribuição e extensão dos microfilamentos, permitindo a deposição de matriz extracelular e o processo de expansão (SUTOVSKY, 1994).

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

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

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

considerado, com exceção dos suínos, um período longo de maturação em relação às demais espécies de mamíferos, nas quais varia entre 12 e 24 horas.

Agentes indutores de maturação folicular e oocitária

Pode-se utilizar gonadotrofinas como o hCG ou Acetato de Deslorelina (análogo de GnRH), o que está bem documentado na literatura (quadro 1) resultando em alta taxa de recuperação oocitária (CARNEVALE, 2004). Entretanto, não foi observado diferença entre os grupos, tratado ou não com hCG (69% e 71%, respectivamente) puncionando folículos com diâmetro de 39,7 mm (HINRICHS *et al.*, 1990). Segundo Squires; Cook (1996), geralmente, o hCG é administrado 30 a 36 horas antes do momento da aspiração folicular e repetidas administrações de injeções do fármaco podem levar à formação de anticorpos e redução na resposta à gonadotrofina. Diante disto, pode-se tentar o tratamento com análogo de GnRH para estas éguas previamente à aspiração folicular.

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

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

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

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

Falhas reprodutivas e limitações da TE

Apesar da consolidação da técnica de transferência de embriões em equinos na década de 90, alguns autores sustentam sua limitação nesta espécie. Allen (2005) defende que a resposta ovariana inadequada aos tratamentos à base de hormônios gonadotróficos exógenos tem sido o maior limitante nos programas de TE em equinos. Devido a deficiências no trato reprodutivo, algumas éguas se mostram incapazes de produzir ou manter embriões (CARNEVALE *et al.*, 2001). Fêmeas apresentando lesões que dificultem o transporte espermático, a reação entre oócito e espermatozoides, o transporte do embrião através do oviduto e o seu desenvolvimento uterino não devem ser utilizadas como doadoras de embrião (HINRICHS *et al.*, 1998). Segundo Carnevale (2004), as fêmeas que não podem ser beneficiadas pela técnica de TE são aquelas que após diversas tentativas de recuperação embrionária não se obteve sucesso por falha na ovulação, infecção uterina, lesões cervicais e outras patologias do trato reprodutivo.

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

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

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

1990).

As causas uterinas de redução de fertilidade são frequentemente diagnosticadas na égua. Alterações inflamatórias ou infecciosas são facilmente diagnosticadas e são prejudiciais ao espermatozóide e ao embrião. Éguas com endometrite severa ou persistente requerem elevado investimento para tratamento e geralmente não são produtivas em programas de TE. Muitas éguas não têm causa de infertilidade diagnosticada, mas após diversas tentativas, não se obtém embrião (CARNEVALE, 2007).

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

Reprodução assistida envolvendo o oócito equino

ASPIRAÇÃO FOLICULAR

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

Ovum pick up (OPU), como é conhecido, é um método pouco invasivo que vem apresentando sucesso para obtenção de oócitos. Os oócitos obtidos podem ser fertilizados *in vivo* através da técnica de transferência de oócito (TO), onde o oócito maturado *in vivo* ou *in vitro* é transferido cirurgicamente para o oviduto de uma égua receptora através de acesso pelo flanco (laparotomia). A fecundação ocorre através da inseminação da égua receptora 12 horas antes e duas horas após a TO, utilizando-se dose inseminante de concentração convencional (CARNEVALE *et al.*, 2000; 2001b;

2002). Os oócitos podem ainda ser destinados a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) que segue o mesmo protocolo da TO, porém a inseminação artificial é realizada diretamente no oviduto junto ao oócito, utilizando-se sêmen com baixa concentração espermática (CARNEVALE, 2004).

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

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

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

A técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom foi inicialmente desenvolvida para recuperação de oócitos em mulheres associada à fertilização *in vitro* (FIV) (DELLENBACH *et al.* 1984; FEICHTINGER; KEMETER, 1986; LENZ *et al.*, 1987) e posteriormente, no decorrer dos anos 80, foi adaptada para bovinos (PIETERSE *et al.*, 1988). O primeiro relato de OPU transvaginal em éguas foi o de Bruck *et al.* (1992). Nesse estudo, foram realizadas somente quatro aspirações em folículos preovulatórios, sendo que em três delas utilizou-se a administração de hCG e obteve-se apenas um oócito. Para tanto, os autores utilizaram um transdutor setorial acoplado a uma guia transvaginal conectado ao

aparelho de ultrassonografia, direcionando-se a agulha de lúmen simples por uma linha de punção que o aparelho disponibilizava. Em seguida, Cook *et al.* (1992) obtiveram 52,9% (9/17) e 18,5% (25/135) ao aspirar folículos preovulatórios e de diestro, respectivamente. Utilizando a técnica transvaginal, Bracher *et al.* (1993) aspiraram duzentos folículos durante 24 sessões em que pelo menos quatro folículos estavam presentes, em qualquer fase do ciclo estral, obtendo-se 34 oócitos e taxa de recuperação de 12,3% e 24,4% utilizando agulha de lúmen simples e duplo, respectivamente.

Esta técnica também pode ser utilizada em éguas em fase inicial de gestação, com índices de recuperação de oócitos variando de 54% (GOUDET *et al.*, 1997) a 76% (MEINTJES *et al.*, 1995a). Dez doadoras em torno dos dias 20 a 150 de gestação foram submetidas à aspiração folicular transvaginal durante um período de 130 dias, com as aspirações sendo realizadas quando pelo menos um folículo atingia 25 mm ou pelo menos três folículos atingiam 15mm de diâmetro. Foram obtidos 152 oócitos de 304 folículos aspirados (50%) e o número médio de aspirações realizadas por égua foram 5,7 (MEINTJES *et al.*, 1994). Cochran *et al.* (1998) aspiraram em média 13 folículos por seção com índices de recuperação de 66% em 20 aspirações realizadas entre os dias 14 e 70 de gestação.

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

A fertilidade das éguas submetidas ao procedimento de OPU não sofre alteração, o que foi comprovado em experimento realizado por Mari *et al.* (2005). De 20 éguas que foram submetidas a três ou quatro sessões de aspiração folicular durante estro e diestro, 10 foram inseminadas e sete ficaram gestantes. Em estudos iniciais desenvolvendo a técnica em cinco éguas, Bracher *et al.* (1993) realizaram 24 sessões (quatro a sete sessões

por égua) de aspiração folicular transvaginal e aspiraram 200 folículos, recuperando 34 oócitos. Os autores não relataram nenhum efeito sobre o ciclo das éguas, bem como concluíram que a técnica pode ser empregada repetidamente sem que haja o risco de peritonite ou aderências. Para avaliar funcional e morfológicamente os ovários de éguas após repetidas sessões de OPU, Bogh *et al.* (2003) realizaram estudo em que observaram que todas as éguas mantiveram normal a função ovariana, definida como a capacidade de ovular e desenvolver corpo lúteo regularmente.

FATORES QUE INTERFEREM NA OBTENÇÃO DO OÓCITO

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

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

Entretanto, a manipulação do ovário isolado também pode sofrer influência devido a forte adesão do oócito à parede folicular (HINRICHS, 1998). Desta maneira,

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

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

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

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

Bruck *et al.* (1992) e Hinrichs *et al.* (1998) utilizaram uma seringa de 50 mL para realizar a punção folicular. Entretanto, a bomba de vácuo é empregada pela maioria

dos autores. Pressões entre 70mmHg e 400mmHg são relacionados, sendo 70 a 90mmHg (MEINTJES *et al.*, 1995), 100 a 150mmHg (MARI *et al.*, 2005), 150mmHg (CARNEVALE, 2001; 2003; 2005), 230 a 300mmHg (DUCHAMP *et al.*, 1995; MEINTJES *et al.*; 1995a) e 400mmHg (KANITZ *et al.*, 1995). Para quantificar a pressão negativa de maneira mais precisa, alguns autores sugerem mensurar o vácuo em volume de água por minuto.

Pressões negativas de até 300mmHg apresentam bons índices de recuperação oocitária. Utilizando as pressões acima citadas, vários autores obtiveram diferentes taxas de recuperação por folículo aspirado: Carnevale *et al.* (2001), 70% (39/56); Carnevale *et al.* (2003), 76% (331/434); Mari *et al.* (2005), 30,8% (16/52); Carnevale *et al.* (2005), 77% (548/710). Entretanto, utilizando 400mmHg, Kanitz *et al.* (1995) afirmam que esta pressão provocou perda das células do cumulus. Pycock (1996) reitera que pressões muito elevadas podem lesionar os oócitos. Kanitz *et al.* (1995) utilizaram 14 ovários de abatedouro e obtiveram 37 complexos cumulus - oócito (COC) de 134 folículos entre 5 e 46mm de diâmetro utilizando pressão 0,2 ou 0,4 bar (1 mmHg = 1,333x10⁻³ bars). Não houve diferença na taxa de recuperação (28,8% x 26,4%) quando comparadas as duas pressões de vácuo.

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

TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS E GIFT

O primeiro potro nascido oriundo de TO ocorreu no final da década de 80 (MCKINNON *et al.*, 1988). Entretanto, a eficiência da técnica não foi comprovada devido à obtenção de apenas duas gestações (13%) e um potro nascido oriundo de 15 oócitos transferidos (1/15, 7%). Posteriormente, resultado expressivo (92%, 11/12) de desenvolvimento embrionário (detectado por ultrassonografia aos 12 dias) foi alcançado

por Carnevale; Ginther (1995) a partir de oócitos recuperados de éguas jovens. Neste experimento, os oócitos foram cultivados *in vitro* antes de serem transferidos para receptoras inseminadas no oviduto. Entretanto, esses autores obtiveram apenas 31% (8/26) de desenvolvimento embrionário quando utilizaram doadoras velhas, indicando a idade avançada e a baixa qualidade do oócito e o trato reprodutivo da doadora como as principais causas para a baixa eficiência da técnica.

A primeira vez que a técnica foi realizada com fins comerciais foi na Universidade do Estado do Colorado (CSU), a partir de 1998 (CARNEVALE *et al.*, 2001). Os autores relatam entre 30 e 40% de taxa de gestação em éguas de diferentes graus de subfertilidade, creditando à qualidade do sêmen utilizado e, principalmente, à qualidade dos oócitos recuperados como os principais fatores que afetam o sucesso do programa. Em 2004 e 2005, os mesmos fatores influenciaram os resultados do programa de TO, da CSU, segundo Carnevale *et al.* (2005).

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

ICSI - Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides

A produção *in vitro* (PIV) de embriões, técnica largamente utilizada na reprodução assistida em humanos, bovinos, ovinos e suínos, não apresenta o mesmo sucesso para a espécie equina. Alguns estudos vêm sendo realizados visando melhores resultados desta técnica, tais como Wirtu *et al.* (2004). Entretanto, segundo Landim-Alvarenga *et al.* (2008), os dados disponíveis são de difícil interpretação devido às variações na técnica utilizada pelos diferentes centros de reprodução assistida. A PIV na

espécie equina apresentou pouca evolução, obtendo-se o nascimento de apenas dois potros (PALMER *et al.*, 1991; SQUIRES *et al.*, 1996), ambos provenientes de oócitos maturados *in vivo*.

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

Na tentativa de melhorar os resultados da PIV em equinos devido à baixa eficiência da técnica padrão, a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) vem sendo cada vez mais estudada. A ICSI é uma técnica bastante difundida em reprodução assistida humana em casos de subfertilidade masculina. Clinicamente, a ICSI tem sido utilizada na produção de potros provenientes de garanhões que apresentam números baixos de espermatozóides. Para o seu emprego, é necessário obter oócitos maturados. Isso pode ser obtido por aspiração do folículo preovulatório ou obtido possivelmente por maturação *in vitro* de oócitos coletados de folículos pequenos, imaturos, de ovários de abatedouro ou pela aspiração de pequenos folículos imaturos (SQUIRES, 2005).

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

Considerações Finais

A partir da presente revisão de literatura, foi possível observar que alguns fatores podem interferir no sucesso das biotécnicas da reprodução assistida em éguas. A transferência de oócitos, apesar de ter alcançados resultados expressivos de gestação, a qualidade dos gametas utilizados podem comprometer os resultados. A produção *in*

vitro de embriões pode se tornar futuramente importante ferramenta para reprodução de animais de alto valor zootécnico.

Sendo assim, pode-se afirmar que tais revisões de literatura sejam de grande importância para obtenção de informações sobre o tema, fornecendo médico veterinário recursos técnicos sobre as biotécnicas de reprodução assistida na espécie.

Referências

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

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

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

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

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

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

BOGH, I.B.; BRINK, P.; JENSEN, H.E.; LEHN-JENSEN, H.; GREVE, T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures.

Equine Veterinary Journal, v. 35, n. 6, p. 575-579, 2003.

BRACHER, V.; PARLEVLIET, J.; FAZELI, A.R.; PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J.; TAVERNE, M. A. M.; COLENBRANDER, B. Repeated transvaginal aspiration ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 25(15), p. 75-78, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RAY, B.S.; SQUIRES, E.L.; COOK, N.L.; TARR, S.F.; JASKO, D.J.; HOSSNE, K.L. Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. **Journal of equine**

veterinary science, v. 14, p.27-30, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STOCK A.E.; BOUCHARD N.; BROWN K.; SPICER A.P.; UNDERHILL C.B.; DORÉ M.; SIROIS J. Induction of hialuran synthase 2 by human Chorionic

Gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v.143, p. 4375-4384, 2002.

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

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

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

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

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