

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA

EFEITO DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE
PITUITARIA EQUINA (EPE) E HCG NO INDICE DE
RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E MATURAÇÃO
FOLICULAR EM EQUINOS

IEDA DALLA PRIA BLANCO

Botucatu-SP
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA

EFEITO DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE PITUITARIA EQUINA
(EPE) E hCG NO INDICE DE RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E
MATURAÇÃO FOLICULAR EM EQUINOS

IEDA DALLA PRIA BLANCO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda da Cruz
Landim e Alvarenga
Co-Orientador: Prof. Dr. Marco Alvarenga

Nome do autor: Ieda Dalla Pria Blanco

Título: EFEITO DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE) E hCG NO ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DE OOCITOS E MATURAÇÃO FOLICULAR EM EQUINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Presidente e Orientadora
Departamento de reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Cezinande Meira
Membro
Departamento de reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Membro
Departamento de Clínicas Veterinárias
Universidade Estadual de Londrina

Data da Defesa: 21 de janeiro de 2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudio e Flavia

in memoriam: Às minhas avós, Leonor e Ana, meus avôs Walter e

Francisco, ao meu tio Dante

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, pela estrutura, pela formação.

À professora Fernanda, pela orientação, pela disponibilidade, pela paciência e acima de tudo pela confiança. Ao professor Marco pela co-orientação.

À Liani e ao Heder por terem trabalhado no meu projeto como se fosse deles, ao Marcio e a Claudia pela ajuda, ao Miguel pela enorme e fundamental colaboração, e ao Gustavo pela estatística.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, pela contribuição prestada à minha formação desde a residência, em especial aos professores Frederico Ozanan Papa e Cezinande Meira pelo apoio técnico durante a execução deste trabalho.

Às minhas amigas Guta, Mariana, Bethânia e Bruna por estarem perto de mim nas horas mais importantes, mais impróprias, mais especiais, mais complicadas, mais bobas, enfim, porque sem elas eu não teria conseguido. À Camila, Carol, Giovanna, Tatiana, Isabela, simplesmente pela amizade destes anos, que rendeu momentos inesquecíveis e tornou a vida mais fácil. À Viviane Chirinea, porque Botucatu não seria a mesma sem ela. À Catalina pelas longas conversas, pelos palpites em horas inusitadas e pelos momentos engraçados. À Jeanne pela ajuda com a impressão da dissertação.

Às amigadas que estão perto mesmo de longe: Fiorella, Thais Pagni, Carolina Filippis, Carolina Rossi, Carolina Casalderrey, Viviane Purri, Eloísa e Juliana Brentan, Rosiane Machado, Danielle Modena, Daniela Chiebao.

Aos meus amigos André Crespilho, pelos churrascos despreziosos, Anthony, Gabriel Felício, Daniel Pasquini, Vicente, Bruno Menarin, Carla, pela companhia, pelas conversas, pelas risadas, pelo apoio. Aos amigos da época da residência que ficaram por aqui me ajudando a não me sentir sozinha, e aos amigos da faculdade que ainda me fazem rir sempre que eu preciso.

À Claudinha e a Lilian, pela ajuda no laboratório e pela amizade.

À Cely e ao Duroc pela ajuda com as éguas prenhes, e ao Ian pela dosagem de progesterona.

Aos colegas de pós-graduação, Dani, Fernanda, Cássia, Rodrigo, Thiago, João, Tati, Zé e Ana Izabel, e aos residentes Gabriel, Carmo, Maria Clara e Rosiara.

Aos funcionários do departamento, Cristina, Edílson, Walter, Raquel, Marcio e Tico, pela ajuda desde a residência até o mestrado.

Ao meu gato Alemão, meu companheirinho amarelo de todas as horas, e as éguas 27, 31, 33, 36, 39, 42, Pé de Pano, 48, 56, Preta, 255, Quatro Estrela, 59, Cicatriz, 40 e 41, a base de todo o trabalho, pelo apoio inconsciente e pelas lições.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS | I |
| LISTA DE FIGURAS | II |
| LISTA DE ABREVIATURAS | III |
| RESUMO | IV |
| ABSTRACT | VI |
| 1.INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. FISIOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL EM ÉGUAS | 3 |
| 2.2. MATURAÇÃO FOLICULAR E OVULAÇÃO | 8 |
| 2.2. 1 ESTEROIDOGÊNESE | 14 |
| 2.2.2. EXPANSÃO DO CUMULUS | 17 |
| 2.3. FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO | 19 |
| 2.4.LUTEÓLISE | 21 |
| 2.5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS FOLÍCULOS EQÜINOS | 24 |
| 2.6. ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIA TRANS-VAGINAL GUIADA POR ULTRASSONOGRRAFIA EM ÉGUAS | 25 |
| 2.6.1 MÉTODOS DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR | 25 |
| 2.6.2. INFLUÊNCIA DA PRESSÃO DE VÁCUO, AGULHA, LAVAGEM E ESCARIFICAÇÃO DO FOLÍCULO. | 27 |
| 2.6.3. INTERVALO DE ASPIRAÇÃO | 30 |
| 2.6.4. USO DE HORMÔNIOS EXÓGENOS | 31 |
| 2.6.5. INFLUÊNCIA DA FASE DO CICLO, DO TAMANHO DOS FOLÍCULOS E DA GESTAÇÃO NO MOMENTO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR | 35 |
| 2.6.6 EFEITOS DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE O CICLO ESTRAL | 38 |
| 2.7 SUPEROVULAÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA | 40 |
| 3. HIPOTEESES | 44 |
| 4. OBJETIVOS | 45 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 46 |

| | |
|--|----|
| 5.1 ANIMAIS | 46 |
| 5.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA | 47 |
| 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 48 |
| 5.4 TRATAMENTO HORMONAL | 48 |
| 5.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR | 50 |
| 5.6 AVALIAÇÃO DO LAVADO FOLICULAR | 51 |
| 5.7 DOSAGEM DE PROGESTERONA | 51 |
| 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 52 |
| 6. RESULTADOS | 53 |
| 6.1 ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS | 53 |
| 6.2 CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA | 55 |
| EXPANSÃO DO CUMULUS | 57 |
| 6.4 EFEITOS DAS ASPIRAÇÕES NA DURAÇÃO DO CICLO ESTRAL | 59 |
| 7. DISCUSSÃO | 61 |
| 8. CONCLUSÕES | 73 |
| 9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 74 |
| 10. TRABALHO CIENTÍFICO | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01: Valores das taxas de recuperação dos oócitos por OPU nos diferentes grupos. | 53 |
| Tabela 02: Valores das taxas de recuperação dos oócitos por OPU nos diferentes grupos para diferentes categorias de tamanho. | 54 |
| Tabela 03: número médio de folículos de cada categoria de tamanho presentes no momento da aspiração e porcentagem de folículos aspirados | 55 |
| Tabela 04: Número e Porcentagem de folículos aspirados em cada categoria de acordo com grupo de tratamento | 55 |
| Tabela 05: Concentrações plasmáticas de progesterona (média \pm erro padrão) 7 dias depois da aspiração folicular ou de pelo menos uma ovulação normal em éguas não aspiradas | 56 |
| Tabela 06: Concentração de progesterona (média \pm erro padrão) no fluido folicular de éguas aspiradas nos diferentes grupos | 57 |
| Tabela 07: Influência do tamanho do folículo e do tratamento hormonal sobre a morfologia das células do <i>cumulus</i> . | 58 |
| Tabela 08: Intervalo entre o início do tratamento com EPE e aspiração | 59 |
| Tabela 09: Intervalos entre ovulação natural e aspiração (Ov-Asp); aspiração e ovulação natural (Asp-Ov) e inter-ovulatórios (Ov-Ov) e as concentrações séricas de progesterona para os diferentes grupos. | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 01: Grupos de tratamento hormonal | 49 |
| Figura 02: transdutor convexo para aspiração folicular | 50 |
| Figura 03: Número de folículos entre 20-30 mm de diâmetro com células expandidas em cada grupo | 58 |
| Figura 04: Intervalos ovulação-aspiração, aspiração ovulação e interovulatório para os diferentes grupos de tratamento | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

<:menor

>:maior

®: marca registrada

3 β HSD: enzima 3 β desidrogenase

C: carbono

CL: corpo lúteo

COC: complexo *cumulus oophorus*

E2: estradiol

EGF: fator de crescimento epidermal

FIV: fertilização *in vitro*

FSH: hormônio folículo estimulante

Ga: gauge

HAS: hialurona sintetase

hCG: gonadotrofina coriônica humana

ICSI: inoculação intra-citoplasmática de espermatozóides

LH: hormônio luteinizante

LH-R: receptor de LH

MI: meiose I

MII: meiose II

MIV: maturação *in vitro*

mm: milímetros

MMPs: metaloproteinases

OPU: aspiração folicular via trans-vaginal guiada por ultrassonografia

OXT: oxitocina

P4: progesterona

P450scc: enzima P450 clivadora de cadeia lateral

TO: transferência de oócitos

RESUMO

Em éguas, o aprimoramento e a aplicação de técnicas como a ICSI, TO e transferência nuclear é restrita devido à dificuldade de obtenção de oócitos *in vivo*, atribuída a particularidades dos folículos ovarianos da espécie. Em folículos pré-ovulatórios, a expansão do cumulus que ocorre com a progressão da maturação folicular e deposição de ácido hialurônico aumenta os índices de recuperação de oócitos por folículo, enquanto o tratamento superovulatório, embora não seja eficiente em aumentar os índices de recuperação por folículo, melhora os índices de recuperação por égua. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da administração de hCG na expansão das células da granulosa e do cumulus e no índice de recuperação de oócitos a partir de folículos imaturos de éguas superovuladas. Para isso 10 éguas foram submetidas à OPU após três diferentes tratamentos hormonais (G1: EPE, G2: EPE/hCG e G3:controle). Cada égua foi submetida aos três tratamentos, tendo sido alternados um ciclo onde era permitido que houvesse ovulação, sem interferência, e um ciclo com OPU. No ciclo onde devia ocorrer aspiração, as éguas recebiam aplicações de prostaglandina no sétimo e oitavo dia após a ovulação. Para os grupos 1 e 2, iniciava-se o tratamento com EPE no D7. Quando a maioria dos folículos atingia entre 22 e 27 mm, somente o grupo 1 recebia hCG, a EPE era suspensa e efetuava-se OPU 24 horas depois para ambos os grupos. Para o grupo controle, após a aplicação de prostaglandina a OPU era efetuada 24 horas após o folículo dominante atingir 27-30 mm.

Em todos os grupos foram aspirados folículos entre 10 e 35 mm. Não houve diferença entre os 3 grupos quanto aos índices de recuperação de oócitos por folículo, com médias de 15% a 16,7%. Entretanto, a hCG foi capaz de induzir uma expansão e luteinização precoce das células foliculares. Além disso, foi avaliado o efeito das aspirações no comprimento do ciclo estral, avaliando-se os intervalos entre ovulação e aspiração, aspiração e ovulação e entre ovulações. Portanto, o tratamento superovulatório associado a hCG não foi capaz de aumentar o índice de recuperação de oócitos a partir de folículos imaturos, embora a administração de hCG tenha ocasionado expansão e luteinização precoce das células foliculares. Além disso, observou-se um prolongamento do intervalo inter-ovulatório em éguas submetidas à OPU, provavelmente pela interferência do procedimento na morfologia ovariana e dinâmica folicular.

Palavras-chave: OPU, eqüinos, oócitos, superovulação, EPE, hCG, maturação folicular.

Abstract

In mares, the use of artificial reproductive techniques (ART) such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI), oocyte transfer (OT), and cloning is limited by the low availability of oocytes obtained either *in vitro* or *in vivo*. The low recovery rate of oocytes from immature follicles seems to be linked with anatomical particularities of the follicular wall. In pre-ovulatory follicles (>35mm in diameter), final oocyte maturation is accompanied by the expansion of the *cumulus*, which releases the oocyte from the follicular wall resulting in increased recovery rates after follicular aspiration. The number of oocytes recovered in each OPU (Ovum Pick Up) section should be higher with superovulation. However, although the total number of oocytes recovered by each individual mare is increased, the recovery rate per follicle is still low. Treatment with hCG modifies the intra-follicular environment by inducing precocious expansion of the granulosa cells, leading to a higher recovery rate during OPU of pre-ovulatory follicles. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of hCG treatment on the recovery rate of oocytes obtained from immature follicles in mares superovulated with Equine Pituitary Extract (EPE). Ten mares were rotated in three different treatments: G1 - superovulated with EPE; G2 - Superovulated with EPE and treated with hCG, and G3 - Control. For all treatments, when the biggest follicle reached 27 - 30 mm, all follicles bigger than 10 mm were aspirated. Each OPU cycle was alternated with a rest cycle when a spontaneous ovulation occurred. Although treatment with hCG increased the number of follicles presenting expanded granulosa and high intra-follicular progesterone concentration, no statistically

significant differences were observed between groups regarding oocyte recovery. The OPU procedure resulted in a prolonged estrus cycle length, probably due to the removal of large amounts of follicular cells delaying the formation of the corpus luteum (CL).

Key words: OPU, equine, oocytes, follicular maturation, superovulation, EPE, hCG

1. INTRODUÇÃO

Em eqüinos, desde o estabelecimento das primeiras prenhez por inseminação artificial, em 1898, outras técnicas de reprodução assistida foram desenvolvidas e vêm sendo utilizadas, em maior ou menor escala, em animais de alto valor econômico ou afetivo, com o intuito de promover um incremento do ganho genético e o aproveitamento de animais em competição, com infertilidade adquirida ou sub-fertilidade, e até mesmo mortos. No que concerne às éguas, a transferência de embriões e inseminação artificial são amplamente disseminadas, e técnicas mais avançadas como a inoculação intra-citoplasmática de espermatozóides (ICSI), a transferência de oócitos para fertilização in vivo na receptora (TO) e a clonagem já produziram potros saudáveis e surgem como novas possibilidades de aproveitamento da espécie, havendo inclusive programas comerciais nos Estados Unidos e Itália.

Entretanto, a aplicação destas técnicas encontra limitações como a baixa taxa de resposta aos tratamentos superovulatórios, de recuperação embrionária e de recuperação de ovócitos por aspiração trans-vaginal (OPU) e de maturação in vitro (MIV) quando comparados aos índices observados em bovinos. Até hoje não se obteve um potro de FIV em eqüinos, o que é atribuído à dificuldades na maturação in vitro e na capacitação espermática.

Para o aprimoramento e utilização de todas estas técnicas, a disponibilidade de oócitos é um fator limitante. Em centros de pesquisa, a

possibilidade de se trabalhar com oócitos oriundos de ovários coletados em matadouros encontra entraves em decorrência da escassez de matadouros eqüinos no Brasil, enquanto a campo as baixas taxas de recuperação de oócitos por foliculo aspirado também limitam a aplicação das referidas técnicas.

Algumas particularidades da espécie eqüina influenciam negativamente os resultados, como o oócito mais aderido ao foliculo e a dificuldade de manipulação do ciclo estral com hormônios exógenos. Além disso, os oócitos recuperados devem ter a capacidade de retomarem a meiose e completarem a maturação *in vitro*, para que estejam aptos à fertilização.

No mundo todo poucos laboratórios desenvolvem pesquisas nesta área, o que dificulta o progresso da técnica e a análise de dados disponíveis para o estabelecimento de um protocolo adequado que proporcione taxas de recuperação satisfatórias.

Desta forma, neste experimento foram avaliados o efeito da adição de hCG ao tratamento superovulatório no índice de recuperação de oócitos por OPU a partir de foliculos imaturos, a maturação folicular de foliculos eqüinos não pré-ovulatórios após a administração de hCG e os efeitos da aspiração folicular sobre o ciclo estral das éguas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL EM ÉGUAS

As fêmeas eqüinas são classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais, apresentando atividade sexual durante a fase de maior luminosidade, ou seja, de setembro a março no hemisfério sul. (MCKINNON & VOSS, 1993). O ciclo estral possui duas fases, entre dois períodos sucessivos de cio: estro e diestro (ANDRADE, 1986), também chamadas fase folicular e fase luteal (DIELEMAN, 1986). A fase de estro ou fase folicular, em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo dominante com mais de 30 mm de diâmetro, e também pela produção de níveis crescentes de estradiol por este folículo (GINTHER, 1992).

O estradiol induz o comportamento de estro e a elevação gradual do LH (HAFEZ, 1995). Além disso, o alto nível de estrógeno também é responsável pela instalação do edema uterino, quando as dobras endometriais se tornam visíveis à ultra-sonografia, com a porção densa das glândulas apresentando aspecto ecogênico enquanto a área edemaciada se mostra anecogênica. O edema uterino tende a diminuir nos dois dias que antecedem a ovulação (MCKINNON & CARNEVALE, 1993; PYCOCK, 1995; BURATINI, 1997).

As concentrações plasmáticas de estradiol começam a aumentar entre 5 a 7 dias antes da ovulação, e apresentam valores máximos 24 a 48 horas antes

da ovulação, quando então começam a diminuir, atingindo níveis basais 48 depois, quando também terminam as manifestações de estro (PYCOCK, 1995).

A ovulação é o início da fase luteal, na qual o corpo lúteo produz progesterona até a luteólise, que ocorre entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo, quando os níveis plasmáticos de progesterona se tornam inferiores a 1ng/ml (GINTHER, 1992).

O período interovulatório é de em média 21 ou 22 dias (GINTHER, 1992). As éguas podem apresentar uma ou duas ondas foliculares (GINTHER, 1990), havendo uma maior predisposição a uma única onda. A duração média comparativa do intervalo interovulatório para ciclos que apresentaram uma ou duas ondas foliculares foi de 19,4 e 23,3 dias, respectivamente (BURATINI, 1997).

O comprimento do ciclo reprodutivo é determinado, em parte, pelas concentrações de progesterona, que estão baixas durante a fase folicular. Nesta fase, as altas concentrações de estradiol agem no hipotálamo e pituitária para estimular pulsos de LH de baixa amplitude e alta frequência, resultando em elevadas concentrações circulantes de LH e direcionando o desenvolvimento folicular para a ovulação. Após a ovulação, conforme o corpo lúteo se desenvolve, as altas concentrações de progesterona restringem a secreção de LH a uma baixa frequência com alta amplitude. Isto ocorre porque a progesterona age tanto no hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH,

quanto na hipófise, diminuindo a expressão de receptores para GnRH (NISWENDER, 2000).

A partir do dia 14, quando se inicia a luteólise, tanto progesterona quanto LH diminuem significativamente a uma taxa similar, o que é compatível com uma perda gradual do efeito de *feed-back* positivo do LH na liberação da progesterona, ou seja, o LH tem um efeito positivo na progesterona (no início da fase luteal, quando é considerado luteotrófico) enquanto a progesterona tem um efeito negativo no LH (GINTHER, 1992; GINTHER, 2006).

O termo “onda folicular” se refere à emergência de vários folículos, que iniciam seu crescimento e o mantêm em sincronia, até o momento do desvio, quando um deles começa a crescer mais rapidamente e os outros entram em atresia ou temporariamente apresentam taxas de crescimento reduzidas até começarem a diminuir. A emergência de uma onda folicular na égua acontece quando os folículos apresentam 6 mm, e o desvio folicular ocorre quando o maior folículo atinge 22,5 mm (GINTHER, 2000).

O intervalo interovulatório nas éguas contém combinações de ondas foliculares menores, nas quais o maior folículo não atinge a dominância, e ondas foliculares maiores, que são aquelas onde o maior folículo atinge a dominância (GINTHER, 1992). O crescimento diário dos folículos recrutados pelas ondas foliculares pode variar de 2,5 a 3,0mm (GINTHER, 1986).

A dinâmica de crescimento folicular é primariamente regulada através dos hormônios do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal. O GnRH é o hormônio

hipotalâmico que proporciona a interface entre o sistema nervoso e o endócrino no controle da reprodução. Via sanguínea, o GnRH liberado na eminência média do hipotálamo chega à hipófise anterior, onde se liga a receptores específicos das células que armazenam LH e FSH: o aumento do cálcio intracelular leva então à excitação dos grânulos de FSH e LH (HAFEZ, 1995).

Há dois locais de secreção e produção de GnRH no hipotálamo: o centro tônico, localizado no núcleo arqueado, responsável pela secreção basal e contínua, que não sofre influência hormonal, e o centro pré-ovulatório, localizado no núcleo paraventricular, que apresenta secreção pulsátil, podendo apresentar um padrão crescente, responsável pela onda pré-ovulatória de LH. A liberação pré-ovulatória de GnRH é controlada pela combinação de alto estradiol e baixa progesterona. Na fase luteal, sob baixas concentrações de estradiol e altas de progesterona, há inibição da liberação de GnRH pelos neurônios do centro pré-ovulatório. Durante a fase folicular, os níveis de progesterona estão baixos, enquanto os de estradiol aumentam progressivamente. Assim que as concentrações de estradiol atingem um limiar, ou pico, o centro pré-ovulatório é estimulado a liberar grandes quantidades de GnRH, que por sua vez estimulam o lobo anterior da hipófise a liberar o LH pré-ovulatório (SENGER, 2005).

O FSH e o LH são hormônios glicoprotéicos, conhecidos como gonadotrofinas e secretados pela hipófise, que apresentam duas subunidades semelhantes, α e β , sendo a subunidade β responsável pela especificidade de

cada molécula. Os níveis tônicos de LH e FSH são regulados pelo estímulo do GnRH e pelo *feed back* gonadal negativo. O FSH estimula o crescimento inicial dos folículos, sendo o aumento de suas concentrações responsável pelo recrutamento de cada nova onda folicular, enquanto o LH em níveis basais atua em conjunto com o FSH para estimular o desenvolvimento final do folículo dominante e a produção de estradiol, que por sua vez é responsável pelo estímulo à liberação de LH que promove o pico pré-ovulatório (HAFEZ, 1995, MCKINNON & VOSS, 1993).

No hipotálamo as gonadotrofinas causam um bloqueio parcial na liberação de GnRH, mecanismo conhecido como “feedback” negativo, e nos ovários o FSH estimula o desenvolvimento dos folículos, enquanto o LH estimula a maturação folicular final e a ovulação (HAFEZ, 1995).

Os folículos ovarianos em crescimento produzem estrógenos, que via circulação sistêmica promovem, no hipotálamo, a inibição da secreção tônica de GnRH e o estímulo aos centros controladores da onda-ovulatória (SENGER, 2005).

Com a progressão de seu desenvolvimento, os folículos passam a secretar outro hormônio, a inibina, que via sistêmica tem a função de bloquear seletivamente a síntese de FSH na hipófise. Por este motivo, acompanhando o pico de liberação de GnRH (onda pré-ovulatória) tem-se aumento apenas de LH, já que a produção de FSH encontra-se parcialmente bloqueada. Esta elevação de LH é responsável pela ovulação. As células foliculares, após a ovulação, sofrem uma transformação chamada

luteinização, formando o corpo lúteo, que produz progesterona. Estes eventos também são coordenados pelo LH. O corpo lúteo é responsável pela secreção de progesterona, que por sua vez inibe a produção de LH (HAFEZ, 1995).

Se não houver fertilização, por volta de 12 a 15 dias após a formação do corpo lúteo, receptores para oxitocina se formam no endométrio. Desta forma a oxitocina, promove a contração uterina e o estímulo para a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, responsável pela regressão do corpo lúteo. Com isso, a concentração plasmática de progesterona diminui, possibilitando o aumento gradativo na secreção de GnRH, FSH e LH, iniciando um novo ciclo (MCKINNON & VOSS, 1993).

2.2. MATURAÇÃO FOLICULAR E OVULAÇÃO

Os folículos ovarianos são unidades morfológicas e funcionais onde células somáticas e germinativas estão intimamente associadas e são interdependentes, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de um folículo maduro e na ovulação de um oócito completamente competente para ser submetido à fertilização (CANIPARI, 2000).

Em mamíferos, a onda pré-ovulatória de LH desencadeia uma série de mudanças no folículo ovariano, que são necessárias para a ovulação de um oócito fertilizável. Elas incluem a indução da retomada da meiose oocitária, diferenciação das células da granulosa mural e reprogramação de sua atividade esteroidogênica, expansão e alterações das células do cumulus

como a expressão de tipos diferentes de mRNAs e proteínas, e mudanças nas propriedades secretórias destas células (PARK, 2004; TSAFRIRI, 2005).

A ruptura da parede folicular e liberação da célula germinativa feminina, o oócito, é o que chamamos de ovulação. Para que isto aconteça, o ovário deve sofrer uma série de eventos intimamente regulados, e os folículos devem chegar ao estágio pré-ovulatório, onde as células da granulosa, da teca e o oócito apresentam características específicas. O oócito deve estar apto para retomar a meiose, as células da granulosa devem ter adquirido a capacidade de produzir estrógenos e responder ao LH e as células da teca começam a sintetizar quantidades maiores de andrógenos, que servirão de substrato para a esteroidogênese (RICHARDS, 2002).

As células somáticas do folículo coordenam o estímulo ovulatório para a retomada da meiose e liberação do oócito, bem como remodelação e luteinização do folículo. Uma complexa comunicação intercelular comanda estágios críticos da maturação oocitária e liga este processo com a liberação do oócito do folículo. A ovulação é, portanto, controlada através de muitos fatores, incluindo hormônios endócrinos, sinais imunológicos e metabólicos e fatores paracrinos das células da teca, granulosa mural e cumulus, bem como pelo próprio oócito (RUSSELL e ROBKER, 2007).

A seqüência temporal de eventos que ocorrem durante a ovulação é iniciada em resposta ao LH pré - ovulatório, que age tanto nas células da granulosa quanto nas da teca para estimular o AMPc e ativar a PKA, o que rapidamente induz a transcrição de genes específicos, os quais iniciam ou

alteram processos que irão causar a ruptura folicular e a remodelação do folículo para a formação do corpo lúteo (RICHARDS, 2002).

O LH age via interação com seus receptores (LH-R) que pertencem à super-família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), sendo primariamente acoplados à proteína G_s e ativados pela adenilil ciclase. Portanto, o sinal primário proveniente deste receptor é o acúmulo de cAMP nas células da teca e da granulosa, e este segundo mensageiro é o provável mediador da maioria das mudanças que ocorrem no folículo pré-ovulatório. (CONTI, 2006).

As células da teca desenvolvem receptores para LH e as da granulosa inicialmente para FSH e depois para LH em decorrência da maturação folicular. Na realidade, o FSH age em conjunto com o estradiol para estimular o desenvolvimento de LHR nas células da granulosa do folículo maduro (HUNTER, 2003).

Os folículos pré-ovulatórios contêm dois tipos de linhagens distintas de células da granulosa que se separam com a formação do antro. As células da granulosa mural se alinham na parede folicular e estão muito próximas à membrana basal, e as células do *cumulus* são diretamente adjacentes ao oócito. Estas duas categorias de células apresentam respostas diferentes durante a ovulação. A resposta direta ao LH pré-ovulatório é predominante nas células da granulosa mural devido à maior quantidade de receptores (RUSSELL e ROBKER, 2007).

A expressão de LH-R, inicialmente restrita às células da teca, é observada nas células da granulosa mural nos estágios finais de desenvolvimento folicular, mas estes receptores estão ausentes ou em pequeno número em células do *cumulus* e no oócito, o que torna estas células insensíveis à estimulação direta pelo LH, sendo necessária a presença de mediadores parácrinos (MEHLMANN, 2005; PARK ET AL, 2004; CONTI, 2006). O sinal ovulatório do LH é recebido e respondido pelas células da teca e da granulosa mural, que o transmitem como sinal secundário às células do *cumulus*, induzindo mudanças e a própria regulação da expressão de LH-R (RUSSELL, 2007).

A íntima conexão entre as células foliculares e o oócito, conectados via junções GAP, permite que fatores parácrinos secretados tanto pelas células da granulosa quanto pelo oócito regulem muitas funções importantes no ambiente folicular, promovendo o crescimento e diferenciação das células da granulosa, a deposição de matriz extra-celular e a regulação da maturação oocitária (ALBERTINI, 2001; PARK, 2004). Dentre estes fatores, os membros da família do fator de crescimento epidermal (EGF) são os mais prováveis mediadores da ação do LH pré-ovulatório, uma vez que o LH ou a hCG estimulam um aumento transitório e seqüencial na expressão de ampirregulina, epirregulina e beta-celulina, que pertencem à família do EGF (PARK, 2004).

Ampirregulina, epirregulina e beta-celulina se ligam aos receptores de EGF (EGF-R) presentes no ovócito e nas células do *cumulus*. A ativação dos EGF-R

por estas proteínas induz a expansão das células do *cumulus* e maturação nuclear em humanos e camundongos (FEUERSTEIN, 2007; PARK, 2004). Em éguas, 2 a 4 horas após a administração sistêmica de hCG, observou-se aumento da expressão de RNAm para ampirregulina e epirregulina nas células da granulosa de folículos dominantes pré-ovulatórios (LINDBLOOM, 2007).

O LH pré-ovulatório também é responsável pelo estímulo à esteroidogênese folicular, síntese de prostaglandina e leucotrienos, secreção de proteases para a degradação de matriz extra-celular e alterações na permeabilidade vascular que levam ao acúmulo de fluido e aumento da pressão intra-folicular (ZHUO E KIMATA, 2001)

Nos estágios finais de maturação folicular, o acúmulo de água e expansão da matriz extra-celular do folículo o leva ao seu diâmetro máximo. O crescimento e a remodelação da membrana basal deve ser extremamente rápido para suportar estas mudanças finais, e imediatamente antes da ovulação há dissolução completa da membrana basal, além de modificações vasculares que incluem vasodilatação e hiperemia, com progressiva mudança de cor do folículo, devido ao aumento da permeabilidade vascular. Acredita-se que a hiperemia é mediada por histamina e prostaglandina E2 (PGE2).Entretanto, observa-se isquemia local no ápice do folículo. (HUNTER, 2003).

Esta isquemia local é responsável pela morte das células epiteliais, as quais liberam hidrolases que contribuem para a dissolução das camadas

celulares adjacentes. A quebra final da parede folicular depende da apropriada degradação de tecido conjuntivo e outros componentes da matriz extra-celular. Além disso, o aumento de volume do folículo pré-ovulatório é facilitado pela dissociação progressiva das fibras colágenas, um processo que começa na túnica albugínea horas antes da ruptura folicular. Fibroblastos adjacentes à teca se tornam ativos e proliferam, sendo provavelmente responsáveis pela liberação de enzimas proteolíticas, especialmente colagenases, que degradam a matriz extra-celular, facilitando sua movimentação e levando a um adelgaçamento da parede folicular (ESPEY, 1994).

Na maioria das espécies, incluindo ovinos, suínos, bovinos e eqüinos, há redução da pressão intra-folicular antes da ovulação, com o folículo se tornando mais flácido e perdendo a tensão da parede folicular. Neste caso a fase final de desenvolvimento folicular é caracterizada pela deformação do folículo, que pode ser detectada por palpação retal em vacas e éguas (HUNTER, 2003).

2.2.1 ESTEROIDOGÊNESE

O estradiol é o principal hormônio secretado por um folículo em maturação, apesar de nas horas após a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas a síntese de progesterona gradualmente assumir importância. A via biossintética para os hormônios esteróides é descrita convencionalmente com o colesterol (27C, ou seja, uma molécula com 27 átomos de carbono) como

ponto de início. Conversões enzimáticas subseqüentes capacitam a molécula a progredir para o estágio de progestágenos (21C), andrógenos (19C) e estrógenos (18C). Tanto as células da teca quanto as da granulosa têm o potencial de sintetizar progesterona a partir de colesterol, sendo esta conversão estimulada pelo LH para células da teca e pelo FSH/LH para as células da granulosa. Assim que as células da granulosa desenvolvem receptores para LH, ambas as células secretam principalmente progesterona. (HUNTER, 2003).

As células da granulosa e da teca produzem estrógenos coordenadamente. As células da teca expressam as enzimas necessárias para a conversão de colesterol a andrógenos, mas não as enzimas que convertem os andrógenos a estradiol, enquanto as células da granulosa produzem progesterona, mas não são capazes de converter pregnenolona ou progesterona a andrógenos e podem converter andrógenos a estradiol, Portanto, as células da teca produzem andrógenos que são aromatizados a estradiol pelas células da granulosa (BAO AND GARVERICK, 1998; NISWENDER, 2000).

Em eqüinos também se observa que o padrão de secreção de esteróides é diferente entre as células da granulosa e da teca. Em estudo conduzido in vitro, Sirois et al (1990; 1991) observaram que as células da teca predominantemente secretam androstenediona, enquanto as da granulosa inicialmente (e na presença de testosterona) secretam estradiol, para depois

gradualmente aumentar a secreção de progesterona com a progressão do desenvolvimento folicular durante o estro.

A mudança secretória de estradiol para progesterona reflete o processo de luteinização, e é uma consequência da perda do potencial de aromatização (HUNTER, 2003; KERBAN, 1999). O aumento pré-ovulatório nas concentrações de LH ocasiona a luteinização das células da teca e da granulosa, e altera vias enzimáticas da esteroidogênese, uma vez que a progesterona é o principal hormônio que deve ser produzido por estas células após a luteinização (NISWENDER, 2000).

A maturação do folículo pré-ovulatório ocasiona alterações nas concentrações de esteróides do fluido folicular, e Grøndahl et al (2005) encontraram concentrações de progesterona dez vezes mais altas durante a maturação folicular, particularmente associada com a progressão do estágio da meiose (MI para MII) dos oócitos. Estes autores concluíram que as mudanças nucleares e citoplasmáticas da maturação oocitária final ocorrem em paralelo com o aumento das concentrações de progesterona no fluido folicular, enquanto as concentrações de estradiol permanecem constantemente altas.

Tanto lipoproteínas de alta quanto de baixa densidade são fontes de colesterol no ovário. Ligado a ambas as lipoproteínas, o colesterol fica disponível na circulação sistêmica e chega ao leito vascular das células da teca, atingindo inicialmente esta camada celular e em seguida as células da

granulosa adjacentes, onde a atividade enzimática irá regular a geração de esteróides, dos quais o precursor é a pregnenolona (HUNTER, 2003).

A conversão do colesterol a pregnenolona é feita na mitocôndria pela enzima citocromo P450 clivadora de cadeia lateral (P450_{scc}). A liberação adequada das moléculas hidrofóbicas do colesterol na membrana lipídica mitocondrial interna é uma etapa limitante no processo de regulação da esteroidogênese (KERBAN, 1999; HUNTER, 2003).

A proteína responsável pela entrada do colesterol para o lado interno da membrana mitocondrial é a StAR (proteína de regulação aguda da esteroidogênese). Em eqüinos, esta proteína é composta de 285 aminoácidos, e sua seqüência é altamente homóloga a outras espécies. O tratamento com hCG causou, em folículos pré-ovulatórios, a indução da expressão gênica do RNAm desta proteína nas células da granulosa e o seu desaparecimento na teca interna, mudança que foi creditada à luteinização das células da granulosa, associada à uma degeneração da teca interna antes da ovulação nas éguas (KERBAN, 1999).

Uma das funções das gonadotrofinas é programar estas enzimas, sendo relevante a disponibilidade de sítios de ligação do LH e do FSH nas células da granulosa e da teca em diferentes estágios de maturação. A disponibilidade de receptores específicos nos respectivos tipos celulares da parede folicular indica o potencial de atividade biossintética, entretanto, a resposta folicular a hormônios gonadotróficos é modulada localmente por fatores autócrinos como esteróides, peptídeos e proteínas. O FSH, por exemplo, estimula a

aromatização e sua influencia é aumentada pela ação autócrina do IGF-1 e inibina produzidos pelas próprias células da granulosa, mas reduzida pela ação do EGF das células da teca. As interações entre o FSH e a insulina agindo sobre a atividade da aromatase mudam de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular e a viabilidade do oócito (HUNTER, 2003).

2.2.2 EXPANSÃO DO CUMULUS

A expansão do *cumulus* também é estimulada pelo LH e envolve a formação de uma matriz extra-celular viscosa, composta principalmente por ácido hialurônico (HA), secretado pelas próprias células do *cumulus*. O ácido hialurônico forma um esqueleto estrutural juntamente com moléculas associadas (TSAFRIFRI, 2005, KIMATA, 2001), e é uma glicosaminoglicana, composta por 2000- 25000 unidades de dissacarídeos, que contribui para a homeostase e biomecânica tecidual em diversos tecidos, além de desempenhar um papel fundamental na ovulação e fertilização de oócitos de mamíferos. É sintetizado na membrana celular pelas hialurona sintetases (HAS). Em mamíferos, a família das HAS é composta por três conhecidas iso-enzimas: HAS-1, -2 e -3 (EINSPANIER e SCHOENFELDER, 2003).

A deposição de matriz extra-celular é afetada pelo cito-esqueleto das células do *cumulus*, e o LH estimula a despolarização e o alongamento destas células, acompanhadas pela redistribuição e extensão dos micro-filamentos (SUTOVSKY, 1994).

Ao contrário do que acontece em outras espécies, onde a expansão celular é verificada somente nas células do *cumulus*, em eqüinos o LH pré-ovulatório causa uma expansão de toda a camada das células da granulosa *in vivo*, e nesta espécie foi caracterizada a expressão de HAS-2 nas células da granulosa mural em resposta ao hCG em folículos pré-ovulatórios (STOCK, 2002). Além disso, o hCG foi capaz de induzir expansão precoce do *cumulus* em folículos imaturos (BLANCO, 2007a).

A deposição e degradação da matriz extra-celular, composta por ácido hialurônico e proteínas associadas, provoca o aumento de volume do complexo *cumulus oophorus* e sua dissociação ocorre em poucas horas, paralelamente à maturação oocitária, caracterizada pela retomada da meiose com a quebra da vesícula germinativa e extrusão do primeiro corpúsculo polar (D'ALESSANDRIS, 2001; ZHUO E KIMATA, 2001).

A expressão de genes envolvidos com a deposição de matriz extra-celular é dependente de fatores de crescimento secretados pelo oócito, além do LH. A expressão de HAS-2, por exemplo, é correlacionada com a competência de desenvolvimento do oócito (DUNNING, 2007).

Complexos *cumulus oophorus* cujo oócito havia sido retirado, quando cultivados *in vitro*, não responderam ao FSH da mesma forma que os COCs que ainda possuíam oócitos: a expansão do *cumulus*, os níveis de AMPc intracelular e a atividade da HAS só foram observadas nos COCs intactos. A adição de EGF também falhou em induzir a expansão das células do *cumulus* na ausência de oócitos. Por outro lado, COCs oocitotomizados, em co-cultivo

com oócitos desnudos, apresentaram expansão em resposta à adição tanto de FSH quanto de EGF ao meio de cultivo, demonstrando a capacidade oocitária de regular a expansão do cumulus (BUCCIONE, 1990).

Já foi demonstrado também que oócitos suínos produzem ao menos dois fatores parácrinos, durante sua maturação meiótica, que afetam a expansão do *cumulus* e que a expressão destes fatores é regulada de acordo com o grau de desenvolvimento. O primeiro fator afeta a produção total de ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, e o segundo, a retenção dele na matriz extracelular (NAGYOVA, 2000).

2.3 FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO

O aumento pré-ovulatório das concentrações de LH induz à ovulação e à diferenciação das células foliculares residuais, que formam o corpo lúteo e começam a produzir progesterona em altas taxas (NISWENDER, 2000). Após a ovulação, as paredes foliculares se colabam e capilares sanguíneos invadem o corpo lúteo em desenvolvimento, provavelmente sob influencia de fatores angiogênicos e mitogênicos (MCCRACKEN, 1999).

A diferenciação em células capazes de produzir progesterona a altas taxas é acompanhada pelo aumento da expressão de enzimas necessárias para a conversão de colesterol à progesterona, ou seja, P450scc, responsável pela conversão do colesterol à pregnenolona, e 3 β HSD, que converte pregnenolona em progesterona. Também há diminuição da expressão de enzimas que

convertem progesterona a estrógenos, que são a 17 α hidroxilase e a aromatase (BAO E GAVERICK, 1998).

A diferenciação das células da granulosa e da teca originam dois tipos celulares que são distintos morfológica e fisiologicamente: as da granulosa se diferenciam em células chamadas de luteais grandes, enquanto as da teca passam a ser designadas como células luteais pequenas. Além das células luteínicas grandes e pequenas, o corpo lúteo contém fibroblastos, células endoteliais e células originadas da corrente sanguínea. No corpo lúteo de mamíferos não primatas, as células luteínicas, os fibroblastos e as células endoteliais ficam misturadas e muito próximas umas das outras (NISWENDER, 2000). A proliferação das células no corpo lúteo em desenvolvimento é muito rápida, com uma taxa de mitose que em ovinos é igual a de tumores de rápido crescimento (JABLONKA-SHARIFF, 1993).

Conforme revisto por Niswender et al (2000), os fatores que regulam a proliferação de células luteínicas e fibroblastos envolvem os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), o hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Em um estudo utilizando microscopia eletrônica, Levine et al (1979) avaliaram a ultra-estrutura do corpo lúteo eqüino. As células foram avaliadas nos dias 3, 9 e 15 após a ovulação. No dia 3, as células já estavam completamente luteinizadas e continham numerosas gotas lipídicas, mitocôndria alongada com crista tubular, elementos perinucleares de Golgi e regiões com reticulo endoplasmático liso altamente desenvolvido. No dia 9, as

células continham poucas gotas lipídicas, mitocôndria pleomórfica com crista tubular e elementos de Golgi dispersos e um aumento do retículo endoplasmático liso. A diminuição do número de gotas lipídicas e a hipertrofia do retículo endoplasmático liso coincidiram com o pico de progesterona. No dia 15, as células luteínicas apresentavam sinais de degeneração, incluindo diminuição nas mitocôndrias, condensação e vesiculação do retículo endoplasmático liso, núcleo irregular ou picnótico e presença de vacúolos autofágicos.

As concentrações plasmáticas de progesterona dependem da quantidade de tecido esteroideogênico, bem como de sua capacidade de síntese, e do fluxo sanguíneo. A quantidade do tecido esteroideogênico depende do número e tamanho das células luteais, que aumentam durante o desenvolvimento luteal (NISWENDER, 2000).

2.4 LUTEÓLISE

A regressão do corpo lúteo, chamada de luteólise, pode ser dividida em luteólise funcional, representada pela queda dos níveis circulantes de progesterona, e luteólise estrutural, que se inicia com mudanças na estrutura celular, acarretando a involução gradual da estrutura até se tornar uma pequena cicatriz de tecido conjuntivo, conhecida como *corpo albicans* (MCCRACKEN, 1999).

Em éguas, Ginther et al (2005), observaram que a luteólise funcional e a morfológica não são sincrônicas, já que as concentrações de progesterona diminuem mais rápido que a área do corpo lúteo.

O processo de luteólise acontece pela ação coordenada de esteróides ovarianos, oxitocina e prostaglandina. Por ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), o ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídios e convertido a PGF2 α pela enzima cicloxigenase (COX). O endométrio, em rumionantes, é o principal sítio uterino de síntese de PGF2 α que chega ao ovário através de mecanismo circulatório de contra-corrente, da artéria ovariana para a veia uterina (MCCRACKEN, 1999).

Em éguas, todavia, há evidências de passagem pela circulação sistêmica antes de chegar ao corpo lúteo, já que a histerectomia total mantém o corpo lúteo, enquanto a hemisterectomia, nesta espécie, não impede a luteólise, indicando um efeito da prostaglandina na circulação sistêmica (GINTHER, 1971).

Além disso, para ovelhas e vacas, baixas doses de prostaglandina intra-uterina são mais eficientes que a aplicação sistêmica, enquanto nas éguas as duas vias são igualmente eficientes. Isto acontece porque a artéria ovariana, na égua, tem pouco contato direto com a veia uterina, em comparação com a ovelha e a vaca. Além disso, as éguas são aparentemente mais sensíveis à prostaglandina (GINTHER, 1992).

Durante a regressão luteal, a relação entre o decréscimo nas concentrações de progesterona não parece ser devido à perda das células

esteroidogênicas luteais, mas provavelmente ocorre pela diminuição do fluxo sanguíneo e pela redução da atividade esteroidogênica destas células, o que foi verificado por alterações na expressão de RNAm para 3 β HSD e StAR após a administração de prostaglandina exógena (NISWENDER, 2000).

Em estudo conduzido com *color-dopler*, Ginther et al. (2007), investigaram a relação entre a diminuição do fluxo sanguíneo e as concentrações de progesterona na fase luteal de éguas, e observaram que durante o período luteolítico (D15-D17), o decréscimo nas concentrações plasmáticas de progesterona foi cerca de seis vezes maior que durante o período pré-luteolítico (D10-D14), enquanto o decréscimo na área do corpo lúteo e no fluxo sanguíneo foi cerca de duas vezes maior no mesmo período. Não houve indícios de uma diminuição ou aumento agudo no fluxo sanguíneo luteal antes da diminuição na concentração plasmática de progesterona.

A secreção endometrial de prostaglandina, considerada a luteolisina dos mamíferos domésticos, é controlada pela oxitocina, um hormônio peptídico cujo precursor é sintetizado no hipotálamo e liberado e ativado na hipófise, para depois atingir o sistema circulatório. Além disso, já foi demonstrado que em ruminantes há produção de oxitocina no corpo lúteo, e em éguas e porcas foi verificada a produção endometrial (MCCRACKEN, 1999).

Em ruminantes, está bem esclarecido o mecanismo de interação entre a oxitocina, o estradiol e a progesterona: o estradiol induz a formação de receptores endometriais para oxitocina, mas esta ação é bloqueada pela progesterona durante a fase luteal, que inibe a ação estrogênica e também

age diretamente alterando a conformação gênica dos receptores de oxitocina. Isto faz com que o útero se torne refratário, em termos de secreção de PGF₂, à ação da oxitocina. Entretanto, a progesterona induz *down-regulation* de seus próprios receptores, permitindo que o estradiol volte a estimular a expressão de receptores endometriais para oxitocina (MCCRACKEN, 1999).

Em éguas, há evidências da participação dos esteróides ovarianos, estradiol e progesterona, no processo de luteólise. Éguas ovariectomizadas tratadas com progesterona por 14 dias tiveram níveis de prostaglandina aumentados em comparação às éguas não tratadas. O estradiol, por sua vez, aumentou quatro vezes a síntese de prostaglandina induzida pela oxitocina exógena (revisto por Ginther, 1992).

A luteólise ocorre, nas fêmeas eqüinas, por volta de 12 a 15 dias após a formação do corpo lúteo, quando a oxitocina da hipófise promove a contração uterina e a liberação da PGF₂ (MCKINNON & VOSS, 1993).

2.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS FOLÍCULOS EQÜINOS

Hawley et al (1995) analisaram comparativamente folículos dissecados de ovários de bovinos e eqüinos provenientes de matadouro, e concluíram que há entre eles diferenças que justificam a dificuldade de obtenção de oócitos eqüinos. A égua possui um *cumulus oophorus* mais espesso e compacto, sem áreas vacuolizadas como observado na vaca, que se apresenta menos saliente em relação à lamina basal, com uma ampla base na região em que o cumulus

está fixado. Além disso, estes autores observaram que, somente em alguns folículos eqüinos, na teca interna imediatamente abaixo do oócito, havia uma área relativamente acelular, fibrilar e vacuolizada na qual se estendiam processos celulares das células do cumulus, e concluíram que esta região serve como âncora para o oócito, impedindo que ele seja facilmente destacado da parede folicular. Para folículos pré - ovulatórios, entretanto, a deposição de ácido hialurônico mediada por LH favorece o destacamento do oócito (GOUDET, 1997; HAFEZ, 2000).

A partir da aspiração de folículos pré-ovulatórios, Carnevale et al (2005), obtiveram uma taxa de recuperação de oócitos de 77%, preconizando a aspiração desta categoria de folículos como melhor alternativa para coleta em programas comerciais de transferência de oócitos. Esta taxa relativamente alta se deve provavelmente às alterações morfológicas observadas nos folículos pré - ovulatórios.

2.6 ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIA TRANS-VAGINAL GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA EM ÉGUAS

2.6.1 MÉTODOS DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Palmer (1987) foi o primeiro a descrever uma técnica de aspiração com o animal em estação, onde o operador manipulava o ovário pelo reto e guiava uma agulha pelo flanco até os folículos. Os primeiros milímetros do fluido folicular eram reinjetados para recuperar o oócito e então o folículo era lavado

com 20 ml de solução Dulbecco com heparina. A taxa de recuperação obtida neste trabalho pioneiro foi 63%.

Vogelsang et al (1988) compararam a coleta de oócitos via punção transcutânea pelo flanco com a coleta via laparotomia e exposição do ovário. O primeiro experimento obteve taxas recuperação entre 10% e 38%. Com a laparotomia, esta taxa aumentou para 14% a 60%, indicando que a coleta de oócitos com o animal em estação era possível, com sucesso moderado, sem danos ao oócito.

McKinnon et al (1988) relataram excelentes taxas de recuperação (71,4%) quando usaram uma cânula e uma agulha de 9,8 mm para aspirar folículos pré-ovulatórios pelo flanco.

Outro procedimento, o da colpotomia, foi descrito por Hinrichs et al (1987) com taxas de recuperação de 73%: além da incisão pelo flanco, outra era feita em fundo de vagina, permitindo que o operador introduzisse sua mão na cavidade peritoneal e direcionasse o ovário diretamente contra a cânula.

Entretanto, todas estas técnicas envolvendo procedimentos cirúrgicos apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como aderências ovarianas que limitam o número de vezes em que o procedimento pode ser repetido, infecções e complicações anestésicas, entre outros fatores (SQUIRES, 1996).

A aspiração trans-vaginal guiada por ultrassom é um método pouco invasivo e relativamente simples para punções repetidas de folículos imaturos e pré-ovulatórios na égua. O procedimento é bem tolerado, entretanto Wandervall e Woods (2002) relataram hemorragia severa após a OPU em

função de comprometimento vascular da artéria do ligamento uterino em uma égua. Além disso, Bogh et al (2003), analisaram a função e morfologia ovariana após punções freqüentes por um período de oito anos, e concluíram que embora não ocorram alterações na foliculogênese, ovulação e formação do corpo lúteo, as punções induzem fibrose reparativa no estroma ovariano e há risco de formação de abscessos.

A técnica foi inicialmente descrita por Brück et al (1992), que baseando-se nos métodos utilizados em programas de FIV humana e bovina, usaram um transdutor micro-convexo conectado a um monitor de ultrassom, que mostrava uma linha de punção na tela, para aspirar folículos pré-ovulatórios. Uma agulha de lúmen simples acoplada a uma seringa de 50 ml foi usada para lavar a cavidade folicular por até três vezes com PBS com heparina. Um oócito foi recuperado de quatro folículos aspirados, demonstrando que a técnica era acurada, rápida e pouco complicada para efetuar coleta de oócitos em éguas.

2.6.2 INFLUÊNCIA DA PRESSÃO DE VÁCUO, AGULHA, LAVAGEM E ESCARIFICAÇÃO DO FOLÍCULO.

Vogelsang (1998) puncionou folículos pré-ovulatórios pelo flanco com uma agulha de 13 Ga e obteve melhores índices com sistema de aspiração à vácuo e irrigação contínua do que efetuando a aspiração com seringa de 50 ml (38% x 10%, respectivamente). Por laparotomia, a pressão de vácuo

também incrementou os resultados: obteve-se 14% de recuperação no sistema simples e 60% no sistema de irrigação/aspiração à vácuo.

A influência da pressão de vácuo nas taxas de recuperação de oócitos também foi estudada por Kanitz e Berger (1995). Quatorze ovários de matadouro forneceram 37 complexos cumulus - oócito (COC) de 134 folículos entre 5 e 46 mm quando uma pressão de 0,2 ou 0,4 bar ($1 \text{ mmHg} = 1,333 \times 10^{-3} \text{ bars}$) era usada. Não houve diferença na taxa de recuperação (28,8% x 26,4%) quando comparadas as duas pressões de vácuo. Bruck e Greeve (1997) investigaram os efeitos da aspiração e lavagem do folículo usando uma agulha de 18G e uma seringa de 60 ml, comparado à sucção e lavagem do folículo com bomba de elétrica. O uso da bomba elétrica só aumentou 1% o índice de recuperação, o que não foi considerado um aumento efetivo (33% x 34%).

A pressão de vácuo utilizada para aspiração varia de 150 mmHg (CARNEVALE, 2001 e 2005; PURCELL, 2007) até 300 mmHg (DUCHAMP, 1995; SQUIRES, 1996; BOGH, 2002), mas em função do grande número de outras variáveis envolvidas nestes experimentos, possíveis diferenças nos resultados devem ser atribuídas a outros fatores.

Hinrichs et al (1987), aspiraram por colpotomia 13 folículos, e obtiveram 9 oócitos, dos quais apenas 3 foram encontrados no fluido aspirado inicial e os outros no lavado. Além disso, Cook et al (1992) determinaram que a lavagem do folículo aspirado era essencial para a coleta de ovócitos, já que nenhum foi encontrado no fluido folicular, enquanto repetidas lavagens do

mesmo folículo resultaram em taxas de recuperação de 52% para folículos pré-ovulatórios previamente tratados com hCG. A turbulência criada pela lavagem do folículo após a aspiração facilita o destacamento do oócito em folículos pré-ovulatórios, onde a conexão entre o oócito e as células da parede folicular é mais fraca, porque após o estímulo gonadotrófico pré-ovulatório ocorre deposição de ácido hialurônico que causa a expansão das células do *cumulus* (BRÜCK, 1996; HAFEZ, 2000).

Pode-se utilizar pressão para a lavagem do folículo, além da pressão utilizada na aspiração. Bogh et al (2002) obtiveram entre 42-50% de recuperação de oócitos, a partir de folículos de até 30 mm, utilizando 500 mmHg para a lavagem. Duchamp et al (1995) obtiveram em média 29% de recuperação, efetuando lavagem com fluxo contínuo de 500 mmHg e agulha de lúmen duplo, índice superior ao obtido com lúmen simples e pressão de 380 mmHg na lavagem (23%, $p < 0,05$).

Enquanto para folículos pré-ovulatórios a lavagem efetivamente aumentou as taxas de recuperação (46,4% x 12,5%), esta melhora não foi observada em folículos imaturos: obteve-se 10% x 5,6% para folículos < 20 mm e 30% x 26% para os maiores que 20, lavados e não lavados, respectivamente. Além disso, os autores sugerem que em folículos de diestro, só a lavagem não é suficiente para a retirada do oócito, recomendando a escarificação da parede folicular com agulha para que seja liberado o oócito imaturo (MARI, 2005).

Em estudo conduzido por Squires et al (1996), a escarificação da parede de folículos pré-ovulatórios não produziu índices satisfatórios (22%). Neste mesmo estudo o uso da agulha de lúmen duplo para a lavagem com fluxo contínuo por 2 a 4 minutos ocasionou 84% de recuperação de oócitos por folículo, enquanto com lúmen simples e 3 a 5 lavagens alternadas com a aspiração obtiveram 51%.

A curetagem da parede folicular é mais facilmente realizada quando o folículo apresenta diâmetro pequeno, no entanto, os oócitos oriundos de folículos com menos de 10 mm de diâmetro apresentam baixa capacidade de sofrer maturação in vitro (GOUDET, 1997).

Considerando que um complexo-cumulus-oócito apresenta um diâmetro entre 0,3-1mm, melhores resultados são obtidos com agulhas de pelo menos 18 G, cujo diâmetro interno é de 0,9 mm. Agulhas menores poderiam danificar as estruturas (ERICE, 1988).

2.6.3 INTERVALO DE ASPIRAÇÃO

Bruck et al (1996) compararam os resultados da aspiração a intervalos de 6 e 23 dias e obtiveram maiores taxas quando as éguas eram aspiradas a cada 23 dias (35,8% contra 18,4%), além de não encontrarem melhora significativa com o uso de FSH. Duchamp et al (1995) obtiveram uma taxa de 29% quando as aspirações eram efetuadas uma vez por ciclo, enquanto para aspirações semanais o índice de recuperação foi de 18%. Estes resultados indicam que aspirações a intervalos maiores proporcionam recuperação de

maior número de oócitos, embora a intervalos menores a taxa final de todas as aspirações somadas possa ser equivalente ou superior.

Com uma aplicação de análogo de prostaglandina no diestro, Meintjes et al (1999) encurtavam o ciclo das éguas e dessa forma conseguiram efetuar entre 1 e 3 aspirações em um intervalo de 32 dias, obtendo 42,9% de recuperação de oócitos por folículo pré-ovulatório e previamente estimulado com hCG (2500 UI). Também com intervalo de 10-11 dias, Purcell et al (2007) obtiveram até 23% de recuperação aspirando folículos durante o diestro. Galli et al (2002, 2007), com sessões de aspiração conduzidas a cada 10- 15 dias conseguiram um índice de 48% de recuperação de oócitos, a partir da aspiração de todos os folículos maiores que 10 mm presentes no ovário.

2.6.4 USO DE HORMÔNIOS EXÓGENOS

O uso de hCG é amplamente disseminado para acelerar a maturação folicular e melhorar o índice de recuperação de oócitos por OPU de folículos pré-ovulatórios. As doses utilizadas variam de 1500 a 3300 UI, e após sua aplicação a aspiração é efetuada entre 20-36 horas depois. O critério para o momento da administração é a presença de folículo dominante (27-35mm), edema uterino, útero e cérvix relaxada e comportamento de cio (VOGELSANG, 1988; HINRICHS, 1987 e 1998; BRUCK, 1992; SQUIRES e COOK, 1996; CARNEVALE, 2001 e 2005; CARNEVALE e GINTHER, 1995).

Vogelsang et al (1988) trataram 14 éguas com 2000 UI de hCG ou 2 mg de gonadorelina quando um folículo dominante estava presente, sendo então

efetuada a laparotomia para aspiração folicular, cuja taxa de recuperação foi maior para o grupo das éguas tratadas (83%) que para o das não tratadas (18%). Em um segundo experimento, 6 éguas foram submetidas à aspiração não cirúrgica: 5 receberam 1000 UI de hCG e uma recebeu 20 mg de buserelina, e a taxa de recuperação foi de 15% para as não tratadas contra 31% para as tratadas. Apesar do pequeno número de éguas utilizado neste experimento, concluiu-se que o tratamento com hormônios exógenos era benéfico para a recuperação de oócitos.

Hinrichs e Kenney (1987) relataram um procedimento que associava colpotomia com aspiração pelo flanco onde não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de recuperação de éguas tratadas com hCG, em comparação ao grupo não tratado. O índice de recuperação obtido com a administração de 2200 UI de hCG 36 horas antes da coleta foi 75% (3 oócitos obtidos de 4 folículos) enquanto para as éguas não tratadas obteve-se 66% de recuperação (6 oócitos de 9 folículos aspirados). Entretanto a colpotomia proporciona uma facilidade de manipulação que pode ter influenciado estes resultados, já que os autores relatam neste mesmo trabalho índices de apenas 17% sem hCG e até 62% com hCG em estudos anteriores.

Carnevale et al (2005) relataram 77% de recuperação de oócitos com protocolo de aspiração de folículos pré-ovulatórios, após em média 21 horas da indução da ovulação com hCG (1500-2500) e deslorrelina (4 horas antes do hCG), já que em estudos prévios o hCG sozinho algumas vezes resultou em falhas na resposta folicular e obtenção de oócitos imaturos.

Entretanto, segundo Hylan et al (2002), o uso crônico de hCG pode diminuir os índices de recuperação oocitária, além de repetidas aplicações de hCG induzirem a formação de anticorpos. Por isso seria interessante utilizar outros indutores de ovulação antes da aspiração. O GnRH (deslorelina, 2,2 mg, s.c) e o EPE (80 mg, i.m), ambos aplicados 36 horas antes da OPU, proporcionaram 47 e 63% de recuperação de oócitos por folículo. No mesmo estudo este índice foi de 82% quando se utilizou 3300 UI de hCG, i.v, 36 horas antes da OPU (SQUIRES e COOK, 1996). Bogh (2002), induzindo a ovulação com EPE (25 mg, i.m) obteve 68% de recuperação de oócitos por folículo > 30 mm aspirado.

Se no momento da aspiração houvesse uma maior disponibilidade de folículos, provavelmente mais oócitos poderiam ser obtidos por ciclo. Por isso vários trabalhos utilizaram protocolos de superovulação, na tentativa de incrementar os índices de recuperação (BÉZARD, 1995; SQUIRES e COOK, 1996; BRUCK, 1997 e 2000; MACLELLAN, 2002; PURCELL, 2007).

Segundo Bruck et al (1997), o tratamento com FSH suíno (100mg/dia por 4 dias) não influenciou a taxa de recuperação de oócitos por folículo aspirado, embora tenha aumentado a disponibilidade de folículos.

Bézard et al (1995), utilizaram EPE enriquecido com FSH (12,5% FSH + 3% LH) em tratamento de curta duração (iniciava-se quando um folículo atingia 17 mm) ou de longa duração (a partir da aplicação de PGF2 α no sétimo dia do ciclo) e induziram a ovulação com hCG quando o maior folículo atingiu 35 mm nas éguas controle (não estimuladas) ou 30-35 mm nas

superovuladas. Desta forma obtiveram 79,2% de recuperação de oócitos por folículo no grupo controle, 67,9% no grupo submetido à tratamento de curta duração e 50% no de longa duração. Embora o maior índice tenha sido obtido no grupo controle, esta diferença não foi significativa ($p>0,05$), e o número total de oócitos recuperados foi maior nos grupos superovulados, em função da maior disponibilidade de folículos no momento da aspiração.

Bruck et al (2000) iniciaram a aplicação de EPE (25 mg uma vez por dia) imediatamente após a aspiração de todos os folículos maiores que 4 mm durante o estro (D0) e novamente aspiraram todos os folículos no oitavo dia de tratamento (D8). Não houve diferença entre o número de folículos presentes entre os grupos não tratados e o grupo tratado no dia das aspirações. O índice de recuperação de oócitos também não aumentou com o tratamento, sendo obtidos em média 37% (oócitos/folículo) nas aspirações no D0 e 48% x 40% no D8 para os grupos controle e EPE, respectivamente. Também utilizando EPE, Squires et al (1996) obtiveram 61% de recuperação aspirando folículos pré-ovulatórios 36 ± 6 horas após indução da ovulação efetuada com hCG, GnRH ou EPE.

Maclellan et al (2002) obtiveram melhores índices a partir de éguas não estimuladas (69%) que de éguas superovuladas (20%) utilizando 25 mg de EPE duas vezes por dia, a partir do sétimo dia do ciclo, e induzindo a ovulação quando a maioria dos folículos atingia 35 mm. Os autores atribuíram estes baixos índices à dificuldade de manipulação dos ovários com

grande número de folículos, em função do tratamento superovulatório, e a deficiências na maturação folicular.

Purcell et al (2007) utilizaram FSH purificado eqüino (FSHe) em éguas transicionais e cíclicas, e não obtiveram melhora significativa nos índices de recuperação de oócitos por folículo das éguas tratadas (11-21%) em comparação às do grupo controle (5,8- 23%).

2.6.5 INFLUÊNCIA DA FASE DO CICLO, DO TAMANHO DOS FOLÍCULOS E DA GESTAÇÃO NO MOMENTO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR

A aspiração de folículos pré-ovulatórios proporciona índices de até 78-84% (GOUDET, 1999; CARNEVALE, 2005; SQUIRES, 1996), conforme descrito anteriormente. Entretanto, em folículos imaturos, estes índices são bastante inferiores, variando de 6,9% a 43% (KANITZ e BERGER, 1995; DIPPERT, 1995; SQUIRES e COOK, 1996; BOGH, 2002, GALLI, 2007).

Squires et al (1996) obtiveram em média 52% de recuperação de oócitos por folículo aspirado durante o estro e apenas 22% durante o diestro, onde maiores índices foram observados para folículos menores que 15 mm (31%) que para os maiores que 20 mm (8%). Os autores citam dificuldades para efetuar a OPU em folículos de diestro devido à profundidade em que estes se encontram no estroma ovariano, o que ocasiona demora no procedimento e o torna mais doloroso.

Kanitz e Berger (1995), relataram um decréscimo na taxa de recuperação de oócitos por folículo no diestro conforme progredia o ciclo

estral (26,3% para folículos do dia 5 do ciclo e 12,4% para folículos do dia 12). Quando foram comparados os resultados em relação ao diâmetro folicular, esta diferença foi ainda maior, com índices de 38,9 para folículos menores que 10 mm e 6,9% para folículos entre 21-30mm. Entretanto, Bruck et al (1996), trabalhando com ovários provenientes de abatedouro obteve mais oócitos de folículos entre 11 e 20 mm que dos menores que 10mm (61,3% x 43,7% oócitos/folículo, respectivamente).

Dippert et al (1995) tentaram aumentar o número de folículos pequenos e médios aspirando o folículo dominante antes da inibição do crescimento de outros folículos. Para isso efetuavam a aspiração do folículo dominante e dos outros folículos (>15mm) 3 ou 6 dias depois, comparando os resultados com éguas onde o folículo dominante era identificado, mas não aspirado, e os outros eram puncionados também 3 ou 6 dias depois. Desta forma não observaram aumento do número de folículos pequenos e médios, mas diminuíram a quantidade de folículos que entraram em processo de atresia. As taxas de recuperação de folículos aspirados 3 dias após a punção do folículo dominante foi maior que as do grupo controle, no qual o folículo dominante era identificado mas não aspirado (35% x 22%).

Bogh et al (2002) obtiveram em média 0,4 oócitos por folículo aspirado no oitavo dia do ciclo e 0,5 oócitos por folículo para as aspirações efetuadas no estro e após a indução da ovulação com EPE (D0), não havendo diferença estatística entre estes grupos para $p < 0,01$. Os folículos aspirados eram divididos em categorias de acordo com seu tamanho (4-9 mm, 10-19mm, 20-

29 mm, >30mm). Para os folículos aspirados no D0, não houve influência do tamanho na recuperação de oócitos até 29 mm (45-52%) e 68% de recuperação foi obtido para os folículos maiores que 30. Quanto aos folículos de diestro, nenhum atingiu 30 mm e os índices foram maiores para folículos com menos de 20 mm que para os de 20-29 mm (45% x 30%, respectivamente).

Folículos ovarianos de éguas prenhes constituem uma fonte adicional de ovócitos (MEINTJES, 1995; COCHRAN, 1998; PURCELL, 2007). A recuperação de oócitos de éguas prenhes parece ser mais alta quando comparada a éguas em diestro.

Meintjes et al (1995) obtiveram 75% de recuperação de oócitos em éguas prenhes contra 42.9% no grupo controle de éguas com folículos pré-ovulatórios. Onze aspirações foram realizadas por égua num período de 44 dias (entre os dias 22 a 66 de gestação) com um máximo de 7 ovócitos sendo recolhidos por seção. Eram aspirados todos os folículos quando um deles atingia 25 mm de diâmetro. Este mesmo grupo, trabalhando com éguas que se encontravam entre os dias 22 e 150 de gestação, obteve 40,2% de recuperação quando só os folículos maiores que 20 mm eram aspirados e 43% quando aspiraram todos os folículos maiores que 4 mm. O número médio de aspirações por égua foi 7.6 e o número médio de oócitos obtidos 18.9 por égua. Os autores concluíram que cerca de 2,5 ovócitos podem ser coletados a cada 7 a 10 dias em éguas prenhes.

Cochran et al (1998) aspiravam todos os folículos maiores que 5 mm entre os dias 14 e 70 de gestação, obtendo desta forma 66% oócitos/folículo aspirado. Segundo Purcell et al (2007) os melhores índices de recuperação de oócitos de éguas prenhes foram observados no 25º dia de gestação e diminuíram conforme progredia a gestação. As éguas foram submetidas à OPU até o 55º dia de gestação e os índices de recuperação variaram de 10-38%.

2.6.6 EFEITOS DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE O CICLO ESTRAL

Bruck et al (1994) avaliaram os níveis de progesterona em éguas cujos folículos eram aspirados durante o diestro. Punções sucessivas dos mesmos folículos nos dias 6, 14, 18 e 22 não afetaram os níveis de progesterona nem interferiram no comprimento do ciclo.

Okolski e Bezard et al (1995) efetuaram punções sucessivas com agulhas finas para obtenção de amostras e analisaram o fluido folicular para determinar se este procedimento influenciava o crescimento folicular e a qualidade dos oócitos. A primeira punção era realizada quando o folículo tinha 25mm de diâmetro, uma segunda era feita 48 horas depois da primeira e a terceira 34-35 horas após. As éguas eram tratadas com EPE para induzir a ovulação no momento em que a terceira aspiração era realizada. Sessenta e cinco por cento dos folículos sobreviveram após a primeira punção, 64% após a segunda e 45% ovularam depois da terceira punção. Os autores

concluíram que a coleta de uma pequena quantidade de fluido folicular (0,5 ml) de cada vez ainda permitiria um bom ambiente folicular para o oócito ser fertilizado e produzir embriões.

Watson e Sertich (1990) trataram éguas com hCG quando o folículo dominante estava maior que 35 mm de diâmetro e aspiraram o conteúdo folicular 12, 24 ou 36 horas depois. Neste estudo não se observou diferença entre as concentrações plasmáticas de progesterona entre as éguas que ovularam normalmente e as que foram submetidas à OPU. Além disso, os autores concluíram que o fluido folicular poderia ser aspirado a qualquer momento após a administração de hCG (efetuada no momento da detecção de um folículo >35mm), porque embora as concentrações de P4 tenham sido inferiores nos grupos aspirados entre 0-12 horas após o hCG, a luteinização está mais relacionada ao momento da aplicação do hCG que ao momento da aspiração.

Em um estudo anterior, McKinnon et al (1987) observaram que as concentrações de progesterona nos dias 5 e 8 pós-aspiração foram normais para éguas cíclicas durante o diestro. No dia 1 após aspiração, 50% dos corpos lúteos foram classificados como centralmente anecogênicos, e no dia 8 pós-aspiração, 38%.

Os níveis de progesterona após a aspiração de folículos pré-ovulatórios em éguas tratadas com hCG permaneceram normais (BRACHER, 1993; COOK, 1993). Estes resultados indicaram que a função do CL pode ser normal após a aspiração de folículos pré-ovulatórios, particularmente se o

hCG é administrado 24 a 36 horas antes da aspiração e a lavagem do folículo não remove todas as células da granulosa.

Hayna et al (2006) observaram variação na formação de tecido luteal de acordo com o tamanho dos folículos aspirados: a maioria resultou em estrutura hipercóica à ultrassonografia, mas só uma parte das éguas apresentou concentrações plasmáticas de progesterona indicativas de presença de corpo lúteo funcionante (> 1 ng/ml). Observou-se presença de tecido luteal em 88% das éguas com folículos aspirados entre 26-30mm, em 100% das éguas com folículos maiores que 30 mm e em nenhuma com folículos menores que 25 mm, concluindo-se que a aspiração de folículos maiores que 25 mm em éguas em estro induz a formação de tecido luteal com atividade hormonal.

Segundo Hinrichs et al (1991) a aspiração de folículos maiores que 30 mm não prejudicou a função luteal de éguas cíclicas. Para éguas transicionais a aspiração de folículos maiores que 30 mm após a administração de hCG resultou em apenas 38% de luteinização (ALVARENGA, 1999) e todas as éguas onde se verificou a formação de tecido luteal retornaram à ciclicidade.

2.7 SUPEROVULAÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA

A espécie eqüina é considerada monovulatória, ou seja, apenas um folículo dominante é destinado à ovulação em cada onda folicular. A ocorrência de duplas ovulações espontâneas é descrita na espécie, com sua incidência relacionada à raça. A base hormonal da ocorrência de ovulações múltiplas em

éguas não está esclarecida e estudos demonstram que as concentrações circulantes de LH e FSH são semelhantes entre éguas de ovulações simples e múltiplas, sugerindo haver uma maior sensibilidade ovariana à gonadotrofina em determinadas raças e indivíduos (URWIN & ALLEN, 1983).

A indução de múltiplas ovulações pode incrementar os índices de recuperação embrionária, disponibilizando mais embriões para transferência imediata ou criopreservação. Métodos diferentes de superovulação já foram testados para a espécie eqüina, como a utilização de FSH suíno, vacinas para inibina, eCG e GnRH, Extrato de Pituitária Eqüina e FSH purificado eqüino (FSHe) (SQUIRES, 2007).

Com a utilização de FSH suíno o índice de ovulações obtido variou entre 1,5 e 1,8 por ciclo (SQUIRES, 1986; FORTUNE E KIMMICH, 1983). A dose utilizada, entretanto, é muito variável e alta, o que inviabiliza o custo do procedimento. Além disso, os resultados são inferiores aos obtidos com EPE (SQUIRES, 2007).

A imunização ativa contra inibina aumenta os níveis de FSH, porque diminui as concentrações de inibina, e induziu ovulações duplas (MCCUE, 1993). Entretanto, inoculações múltiplas são necessárias e foram observadas reações adversas, o que inviabiliza o seu uso comercial.

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) não apresentou resultados satisfatórios, o que foi atribuído a uma limitada ligação do eCG aos receptores de FSH nos folículos de éguas não gestantes (MCCUE, 1996).

Os tratamentos a base de GnRH foram efetivos em estimular a liberação de FSH e induzir a ocorrência de múltiplas ovulações (3,5 ovulações utilizando 100µg de GnRH/hora) em éguas em anestro (JONHSON E BECKER, 1988). Em éguas cíclicas, no entanto, a utilização de GnRH não foi efetiva para indução de superovulação (MCCUE,1996).

Atualmente o EPE e o FSH purificado eqüino (FSHe) são os únicos fármacos que consistentemente induzem ovulações múltiplas em éguas (CARMO,2007). O EPE é preparado de acordo com o procedimento proposto por Guillou e Combarous (1983), e possui entre 6-10% LH e 2-4% de FSH. Em um estudo retrospectivo com 170 éguas na Universidade Estadual do Colorado, a média de ovulações variou de 2,3 a 3,9 (média de 3,2), com uma média de recuperação de 1,96 embriões por égua, a qual foi superior à média das éguas não superovuladas (0,65 embriões por égua) mas inferior ao numero de ovulações (SQUIRES, 2007).

Comparadas a outras espécies domésticas, as éguas têm algumas características especiais. A diferença entre os ovários dos ruminantes e os das éguas é que nestas os ovários possuem o córtex no interior e a medula no exterior do órgão. A fossa de ovulação é a única área onde o folículo é capaz de romper-se e ovular. É por isto que o número de folículos que ovulam pode ser limitado pelo espaço disponível na fossa (SQUIRES, 2007).

A inconsistência da taxa de recuperação embrionária poderia ter causas intrínsecas e extrínsecas. Quanto às primeiras, estariam relacionadas a inconvenientes no desenvolvimento folicular, problemas na qualidade do

oócito e liberação do mesmo durante a ovulação, captação pela fimbria e trânsito pelo oviduto. Também pode estar relacionada à falhas na morfologia embrionária e ao tempo normal de trânsito pelo oviduto (DIPPERT ET AL., 1994; PALMER ET AL., 1993; CARMO, 2007). Quanto às causas extrínsecas poderiam interferir fatores individuais (estação do ano, ambiente, estado nutricional, raça, causas genéticas, repetições sucessivas de tratamentos superovulatórios) e fatores relacionados ao tratamento (início, relação com o ciclo estral, drogas utilizadas). Além disso, foi demonstrado que o protocolo de superovulação com EPE+hCG induz a ocorrência de falhas na maturação oocitária (Carmo, 2007).

Com base no descrito acima, o objetivo deste trabalho foi fornecer uma contribuição à pesquisa científica na área de recuperação de oócitos eqüinos *in vivo*, como tentativa de aumentar a disponibilidade de oócitos para uso a campo ou para aprimoramento das técnicas de produção de embriões *in vitro*.

3. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que a hCG é capaz de induzir a expansão das células do *cumulus* em folículos com menos de 30 mm de diâmetro e aumentar o índice de recuperação de oócitos a partir de folículos imaturos.

4. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da adição de hCG ao tratamento superovulatório no índice de recuperação de oócitos por OPU e na maturação folicular de folículos eqüinos não pré-ovulatórios;
- Observar os efeitos da aspiração folicular sobre comprimento do ciclo estral das éguas.
- Observar se o procedimento de aspiração folicular para obtenção de oócitos interfere com a luteinização dos folículos e produção de progesterona pelo corpo lúteo formado a partir da aspiração.

5.MATERIAL E MÉTODO

5.1.ANIMAIS

Foram utilizadas 10 éguas mestiças, com idade entre 4 e 15 anos, pesando entre 300 e 450 kg e com históricos reprodutivos sem alterações quanto à ciclicidade e fertilidade durante as estações de monta (outubro a março) dos anos 2006 e 2007. Todos os animais utilizados não apresentaram alterações detectadas no exame do trato reprodutivo (histórico, palpação retal, exame ultrassonográfico e citologia uterina). Cada animal foi submetido alternadamente aos três grupos de tratamento durante o experimento. Além disso, alternava-se um ciclo onde efetuava-se a aspiração com um onde permitia-se que ocorresse a ovulação naturalmente.

As éguas eram mantidas em piquete, com livre acesso à água, com um fornecimento de 1,5 kg de concentrado/animal/dia e 5kg de feno/animal/dia, além de suplementação mineral em área coberta. O experimento foi realizado durante os meses de setembro a dezembro de 2006, no Posto de Monta da Fazenda Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu (LAT.220 S e LONG. 480 W), estado de São Paulo. As éguas eram utilizadas somente após a segunda ovulação do ano.

A detecção do cio das éguas foi realizada diariamente e individualmente em troncos de contenção, com o auxílio de um rufião. A dinâmica de crescimento folicular foi acompanhada por palpação retal e

ultrassonografia (AQUILAVET, ESAOTE-PIE MEDICAL, HOLANDA) utilizando-se transdutor linear de 5 Mhz em dias alternados até que se observasse um folículo de 30 mm ou se iniciasse o tratamento hormonal , quando efetuava-se o acompanhamento diário.

5.2.PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA

O extrato de pituitária eqüina foi preparado segundo o método proposto por Guillon & Combarous, (1983) no laboratório da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu-SP. As pituitárias eram adquiridas no frigorífico, localizado na cidade de Santa Fé-PR, onde eram congeladas e conduzidas para o laboratório (UNESP). Depois de descongeladas, as pituitárias eram banhadas em água destilada/deionizada, trituradas em liqüidificador doméstico com solução de 40% de etanol, álcool etílico P.A. (Laboratório Dinamica®, São Paulo), e 6% de acetato de amônia (Laboratório Synth®, São Paulo-SP). A fração ativa era precipitada, aumentando-se a concentração de etanol em 80%, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20° C. Ao ser utilizado, o EPE liofilizado foi diluído em solução fisiológica na proporção de 10 mg/mL, sendo conservado em refrigerador a 5° C no período máximo de sete dias.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Cada uma das 10 éguas disponíveis, após a segunda ovulação do ano, era aleatoriamente dirigida a um dos três grupos de tratamento hormonal. Cada ciclo de aspiração foi alternado com um ciclo onde ocorreu ovulação espontânea, e após este ciclo de descanso, cada animal era posto em um segundo grupo, e assim por diante, de forma que todas as éguas fossem submetidas aos três tratamentos, alternados com ciclos de ovulação espontânea.

5.4 TRATAMENTO HORMONAL

Os animais foram submetidos à protocolos de tratamento hormonal da seguinte maneira (Figura 1):

- Grupo 1 (EPE/hCG): No sétimo dia após a ovulação, aplicava-se prostaglandina (250 µg/dia de cloprostenol) e iniciava-se o tratamento com EPE (25 mg, BID), que era mantido até que a maioria dos folículos estivesse entre 22-27 mm de diâmetro ou que o maior folículo atingisse 30 mm. Efetuava-se então a aplicação de hCG (Vetecor, 2500 UI, i.v., Caler do Brasil, São Paulo, SP) e procedia-se, 24 horas depois, à aspiração de todos os folículos com mais de 10mm de diâmetro .
- Grupo 2 (EPE): o tratamento também iniciava-se no sétimo dia após a ovulação com uma aplicação de prostaglandina (250 µg/dia de cloprostenol) , iniciando-se as aplicações de EPE (25mg BID) até que a maioria dos folículos se encontrasse entre 22-27 mm ou que o maior

foliculo atingisse 30 mm de diâmetro, efetuando-se a aspiração de todos os foliculos >10mm, 24 horas depois.

- Grupo 3 (controle): no sétimo dia após a ovulação aplicava-se prostaglandina (250 µg/dia de cloprostenol) e o crescimento folicular era acompanhado até que o maior foliculo estivesse com 27-30 mm, quando era efetuada a aspiração de todos os foliculos > 10mm, 24 horas depois.

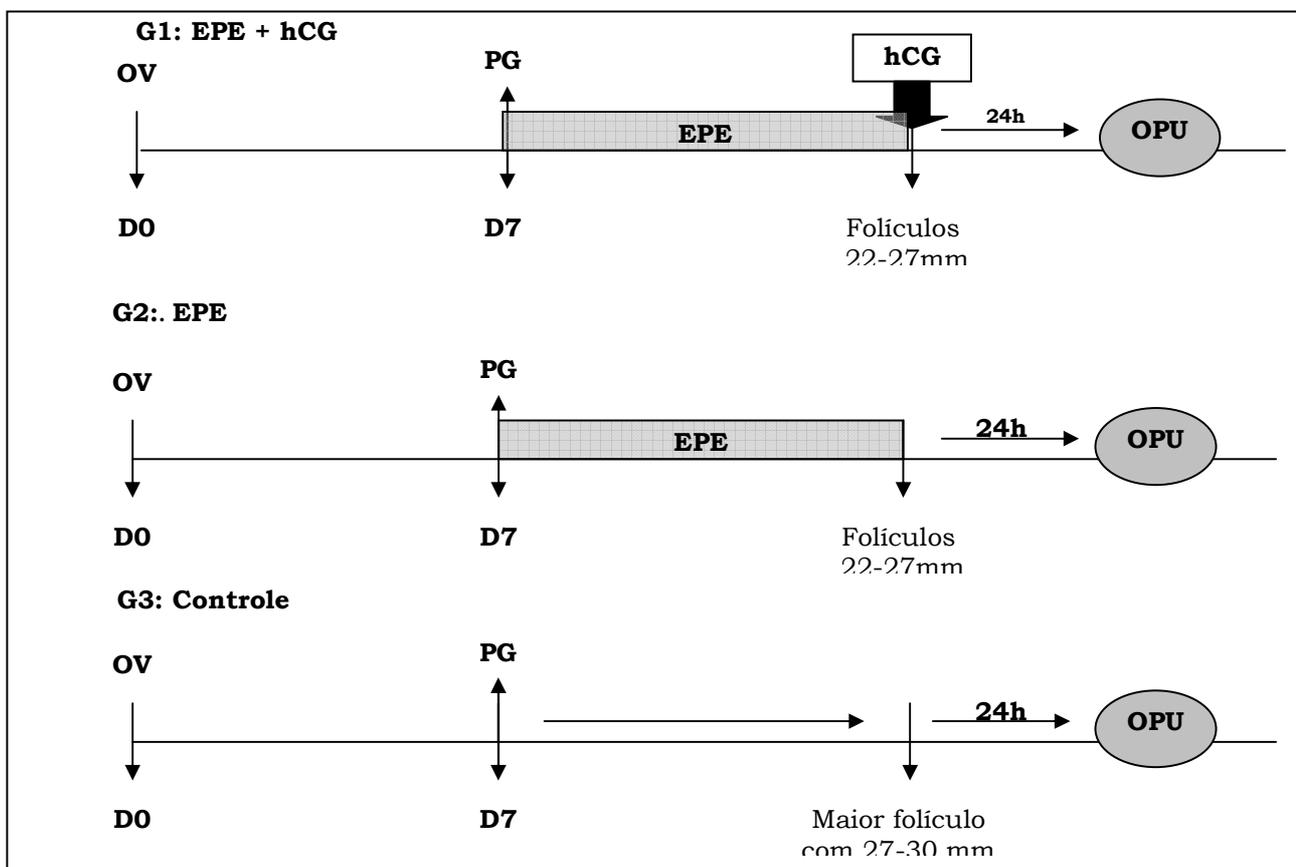


Figura 1: grupos de tratamento hormonal

5.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Após a higienização da região perivulvar, as éguas eram sedadas por via intra-venosa com 2 ml de acepromazina (Acepram 1%®, 10 mg/ml), 0,08 mg/kg de Romifidina (Sedivet® , Boehringer Ingelheim, São Paulo-SP). Além disso, para o relaxamento do reto aplicava-se 15-30 ml de brometo de N-butilescolamina. (Buscopan®, 20 mg/ml). Para as aspirações, utilizou-se uma agulha modelo Cook com lúmen duplo (12-GA-Cook Veterinary Products, Spencer, IN) acoplada a um transdutor convexo de 7,5 Mhz (figura 01) e a uma bomba de aspiração com pressão entre 180-200 mmHg. O antro do folículo puncionado era lavado de forma contínua com 5-50 ml de PBS (Nutricell, Campinas-SP) com 1 ml (1000 UI) de heparina, e era efetuada a escarificação da parede folicular, com a própria agulha, para a recuperação de oócitos e células da granulosa. A quantidade de meio utilizada para a lavagem, bem como o número de vezes em que o folículo era repreenchido, variou com o diâmetro folicular: folículos menores permitiam lavagens com menor quantidade de fluido de cada vez, por menos vezes.

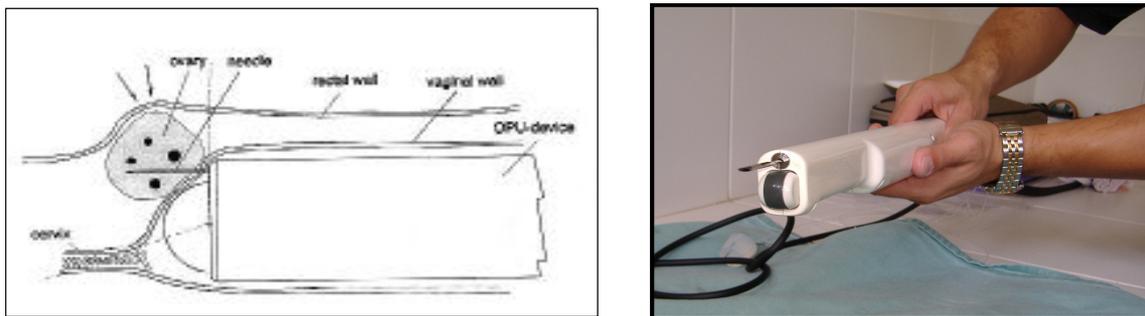


Figura 02: transdutor convexo para aspiração folicular. Adaptado de Bols et al, 1995.

5.6 AVALIAÇÃO DO LAVADO FOLICULAR

O fluido e o lavado eram depositados em placa de Petri (45x25) e examinados em estereomicroscópio com aumento de 40x para identificação e classificação dos complexos cumulus-oócito (COCs) e análise visual do grau de expansão das células da granulosa.

Os COCs eram classificados da seguinte maneira:

- 1- Grau 1: cumulus compacto e corona compacta
- 2- Grau 2 cumulus expandido e corona compacta
- 3- Grau 3 cumulus expandido e corona expandida

5.7 DOSAGEM DE PROGESTERONA

A progesterona foi quantificada no soro e no fluido folicular. Amostras de sangue da jugular dos animais foram coletadas no sétimo dia após as aspirações e no sétimo dia após as ovulações naturais. O sangue, não heparinizado, era então centrifugado a 2000 g por 10 minutos, para

separar a fração líquida dos constituintes, que era colocada em eppendorf de 1,5 ml, identificado, e então congelado a -20°C . O fluido folicular dos folículos maiores que 30 mm era separado no momento da aspiração, quando não se observava presença de sangue, para ser submetido à análise posterior. Para efeito de comparação, foram coletadas amostras de fluido folicular pré-ovulatório (folículos maiores que 45 mm) de éguas submetidas a tratamento superovulatório (EPE+hCG) conforme descrito para o grupo 1. A dosagem foi efetuada por radio-imuno-ensaio (RIA) utilizando-se o kit comercial Coat-A-Count® Progesterone (DPC, Los Angeles, Califórnia). Para a dosagem do fluido folicular, onde as concentrações de progesterona são mais altas que no sangue, foi efetuada diluição previa das amostras em PBS (1:100).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados dos grupos passaram pelo teste de homogeneidade e normalidade antes de se realizar as comparações. Os valores expressos em porcentagem foram analisados pelo teste qui-quadrado (porcentagem de folículos aspirados do total de folículos ovarianos), as demais proporções foram analisadas pelo teste exato de Fisher, ambos a 5% de significância. Os valores dos intervalos em dias e concentração de progesterona foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida, quando necessário, pelo teste de Tukey a 5% de significância, esses

mesmos valores quando comparados aos pares passaram pelo teste t de Student.

6. RESULTADOS

6.1 ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS

Foram efetuadas 30 sessões de aspiração (n=10 aspirações por grupo), com um total de 45 folículos aspirados no grupo 1 (EPE e hCG), 40 no grupo 2 (EPE) e 30 no grupo 3 (controle). Não foi observada diferença estatística na recuperação de oócitos nos diferentes grupos estudados ($p > 0,05$). O índice médio de recuperação de oócitos por folículo foi de 15,5% para o grupo EPE/hCG, 15% para o grupo EPE e 16,7% para o grupo controle (Tabela 1).

A média de recuperação de oócitos por égua foi 70% (7 de 10), 60% (6 de 10) e 50% (5 de 10) para os grupos EPE, EPE com hCG e controle (Tabela 1). Novamente, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 01: Valores das taxas de recuperação dos oócitos por OPU nos diferentes grupos.

| | G1(EPE+hCG) | G2 (EPE) | G3 (controle) |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------|
| Oócito por égua | 70% (7/10) | 60% (6/10) | 50% (5/10) |
| Oócito por folículo aspirado | 15,5% (7/45) | 15% (6/40) | 16,7% (5/30) |

($p > 0,05$) Teste exato de Fisher a 5% de significância

EPE= Extrato de Pituitária Eqüina

Tabela 02: Valores das taxas de recuperação dos oócitos por OPU nos diferentes grupos para diferentes categorias de tamanho.

| | EPE/HCG | EPE | CONTROLE | TOTAL |
|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| <20mm | 14,28% ^a | 8,3% ^a | 15,4% ^a | 12,50% |
| 20-30mm | 20% ^a | 16,6% ^a | 15,4% ^a | 18% |
| >30mm | 0 ^a | 20% ^a | 25% ^a | 13,63% |

($p > 0,05$) Teste exato de Fisher a 5% de significância

Dos folículos presentes nos ovários no momento da aspiração, foram aspirados em média 63,5% (40 de 63) no grupo EPE (G1), 73,8% (45 de 61) no grupo hCG (G2) e 71,4% (30 de 42) no grupo 3 (G3). Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à porcentagem de folículos aspirados em relação aos presentes ($p < 0,05$) (tabela 3).

O número de folículos >25mm presentes no dia da aspiração foi 23 (grupo EPE), 32 (Grupo hCG) e 15 (Grupo Controle), enquanto o número de folículos que apresentaram entre 20 e 30 mm foi 25 (Grupo EPE), 30 (Grupo hCG) e 13 (Grupo Controle).

Tabela 03: número médio de folículos de cada categoria de tamanho presentes no momento da aspiração e porcentagem de folículos aspirados

| | 10-15mm | 16-20mm | 21-25mm | 26-30mm | >30mm | Asp/total (%) |
|------------------|---------|---------|---------|---------|-------|----------------------------|
| EPE + hCG | 10 | 12 | 7 | 23 | 9 | 45/61 (73,8%) ^a |
| EPE | 9 | 20 | 11 | 14 | 9 | 40/63 (63,5%) ^a |
| controle | 8 | 15 | 4 | 9 | 6 | 30/42 (71,4%) ^a |

Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística no teste Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Tabela 04: Número e Porcentagem de folículos aspirados em cada categoria de acordo com grupo de tratamento

| | EPE | EPE/hCG | CONTROLE |
|-----------------|---------------|--------------|------------|
| <15mm | 2/9 (22%) | 2/10 (20%) | 2/8 (25%) |
| 16-20mm | 9/20 (45%) | 7/12 (58,3%) | 9/15 (60%) |
| 21-25mm | 5/11 (45,45%) | 7/7 (100%) | 4/4 (100%) |
| 26-30mm | 14/14 (100%) | 23/23 (100%) | 9/9 (100%) |
| >30mm | 9/9 (100%) | 9/9(100%) | 6/6 (100%) |

6.2 CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA

O coeficiente de variação intra-ensaio da análise foi 5%. As concentrações médias de progesterona sérica (P4) no dia 7 foram significativamente maiores em éguas que ovularam espontaneamente que nas éguas submetidas à aspiração ($p < 0,05$). As éguas submetidas à OPU apresentaram em média 3,73 nanogramas/ml de progesterona, enquanto nas que ovularam espontaneamente a média foi 7,51 ng/ml (Tabela 5). Duas éguas ovularam dois folículos cada, mas foram incluídas na média por terem valores iguais ($p > 0,05$) à média dos outros animais com uma ovulação apenas.

Oito de 23 éguas (34,78%) aspiradas apresentaram, no dia 7, concentração de P4 menor que 2 ng/ml de progesterona plasmática. Das 23 éguas que ovularam naturalmente, duas (8,7%) tinham esse mesmo quadro ($p = 0,071$ – teste exato de Fisher).

Tabela 05: Concentrações plasmáticas de progesterona (média \pm erro padrão) 7 dias depois da aspiração folicular ou no sétimo dia pós ovulação em éguas não aspiradas.

| | Aspiradas (n=23) | Ovuladas (n=23) |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
| [] P4 | 3,73 \pm 0,87 ^b | 7,51 \pm 0,81 ^a |

Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística no teste t não pareado ($p < 0,05$).

A concentração média de progesterona no fluido folicular foi semelhante entre os folículos imaturos ou pré-ovulatórios de éguas tratadas com EPE+hCG (G2 e G4) e maior nestes dois grupos que para os grupos EPE e controle. Não houve diferença estatística entre os grupos EPE (G1) e controle (G3) (Tabela 6).

Tabela 06: Concentração de progesterona (média \pm erro padrão) no fluido folicular de éguas aspiradas nos diferentes grupos.

| | G1 (n=11) | G2 (n=5) | G3 (n=10) | G4 (n=10) |
|---------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| [] P4 | 158,80 \pm 29,62 ^{ab} | 72,50 \pm 55,91 ^b | 82,05 \pm 13,85 ^b | 268,57 \pm 55,91 ^a |

Letras distintas (a, b) indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

G1:EPE + hCG, folículos < 35mm

G2: EPE, folículos < 35

G3:CONTROLE, folículos < 35mm

G4:EPE +hCG, folículos > 35 mm

Não houve diferença entre as concentrações plasmáticas de progesterona no sétimo dia após a aspiração entre os três diferentes grupos de tratamento, tendo sido observadas médias de 4,364 ng/ml para o grupo controle, 2,9 ng/ml para o grupo EPE e 3,28 ng/ml para o grupo EPE + hCG. Também não houve correlação entre estes valores e o número de folículos aspirados em cada sessão, que foi em média 3 para o grupo controle, 4,5 para o grupo EPE e 4,1 para o grupo EPE+hCG.

6.3 EXPANSÃO DO CUMULUS

A presença de células da granulosa (do cúmulus ou mural) com aspecto expandido foi observada em 29 folículos do grupo 1 (60%), 10 do grupo 2 (25%) e somente em um folículo do grupo 3 (3%). O número de folículos com células expandidas foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo EPE/hCG, em comparação aos outros dois grupos. Os valores não diferem estatisticamente entre os grupos 2 e 3 ($p > 0,05$).

Tabela 07: Influência do tamanho do folículo e do tratamento hormonal sobre a morfologia das células do *cumulus*.

| | Grupo EPE+hCG | | Grupo EPE | | Grupo Controle | |
|----------|---------------|------------|-----------|------------|----------------|------------|
| | compactas | expandidas | compactas | expandidas | compactas | expandidas |
| <15 mm | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 |
| 16-20 mm | 3 | 3 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| 21-25mm | 3 | 4 | 3 | 2 | 4 | 0 |
| 26-30mm | 5 | 16 | 9 | 3 | 9 | 0 |
| >30 | 4 | 6 | 6 | 5 | 3 | 1 |
| total | 16 | 29 | 30 | 10 | 29 | 1 |

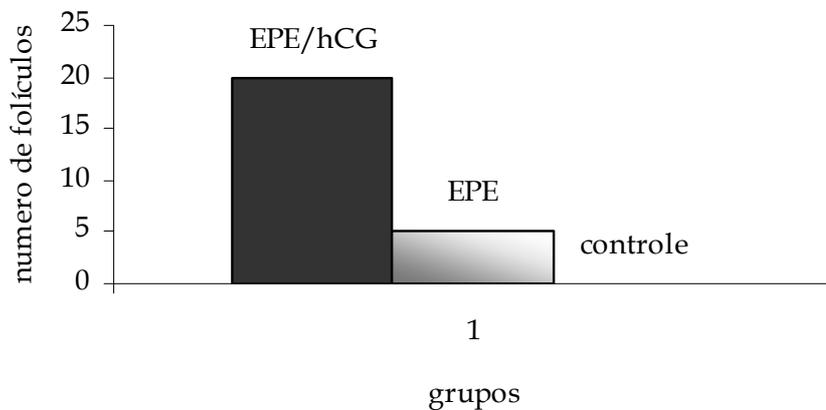


Figura 03: Número de folículos entre 20-30 mm de diâmetro com células expandidas em cada grupo

6.4 EFEITO DAS ASPIRAÇÕES NA DURAÇÃO DO CICLO ESTRAL

O intervalo médio entre as ovulações foi de 28 ± 6 dias, considerando-se um intervalo entre a aplicação de PGF e as aspirações de 6 ± 3 dias. O intervalo médio do início do tratamento com EPE ao dia da aspiração foi $5,8 \pm 1,48$ para o grupo EPE e $4,6 \pm 1,71$ para o grupo EPE+hCG, valores que não diferem estatisticamente (tabela 08).

Tabela 08: Intervalo entre o início do tratamento com EPE e aspiração

| Tratamento | Intervalo (dias) |
|----------------|------------------|
| EPE | $5,8 \pm 1,48^a$ |
| EPE+hCG | $4,6 \pm 1,71^a$ |

Letras iguais(a) indicam que não houve diferença segundo teste ANOVA

O intervalo médio entre as ovulações naturais e as sessões de aspiração foi $11,56 \pm 2,01$ dias (G1), $12,33 \pm 1,66$ dias (G2), e $11,4 \pm 1,89$ dias (G3), não havendo diferença estatística entre os grupos. O intervalo entre as aspirações e as ovulações foi maior para os grupo 1 e 2 ($22,6 \pm 12,06$ e $27,33 \pm 15,17$ dias, respectivamente) que para o grupo 3 ($15 \pm 4,55$ dias) ($p < 0,0369$) (tabela 09, figura 04).

Em apenas 1 dos ciclos não se observou à ultra-sonografia presença de estrutura semelhante ao corpo lúteo após procedimento de aspiração.

Tabela 09: Intervalos entre ovulação natural e aspiração (Ov-Asp); aspiração e ovulação natural (Asp-Ov) e inter-ovulatórios (Ov-Ov) e as concentrações séricas de progesterona para os diferentes grupos.

| | Ov - Asp | Asp - Ov | Ov - ov | P4 |
|------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| EPE + hCG | $11,56 \pm 2,01^a$ | $22,6 \pm 12,6^{ab}$ | $33,4 \pm 12,3^{ab}$ | $2,91 \pm 2,93^a$ |
| EPE | $12,33 \pm 1,66^a$ | $27,33 \pm 15,17^a$ | $40,17 \pm 16,27^a$ | $3,28 \pm 2,92^a$ |
| Controle | $11,4 \pm 1,89^a$ | $15 \pm 4,55^b$ | $26,33 \pm 4,92^b$ | $4,36 \pm 1,71^a$ |

Letras distintas (a,b) indicam diferença estatística segundo teste de Fisher

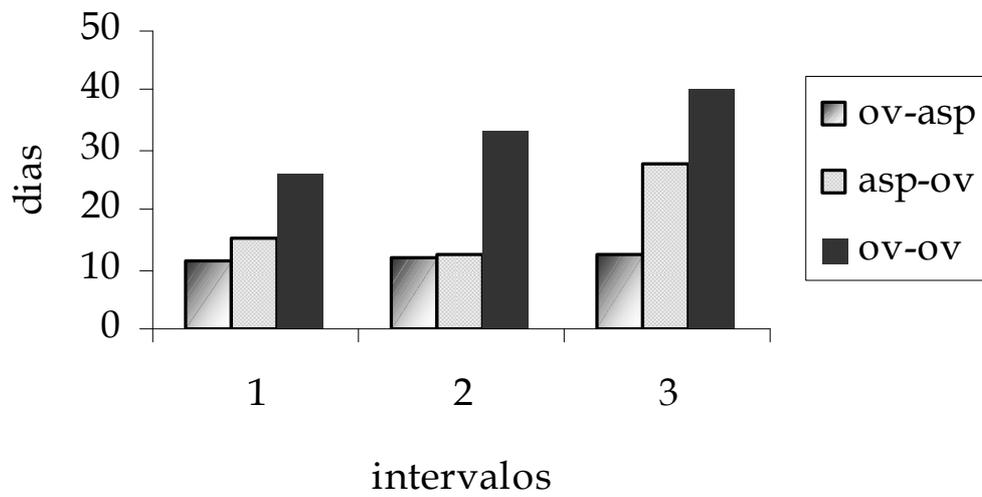


Figura 04: Intervalos ovulação-aspiração, aspiração ovulação e intervulatório para os diferentes grupos de tratamento.

1: EPE, 2: EPE+hCG, 3: CONTROLE

7. DISCUSSÃO

O índice médio de recuperação de oócitos por folículo foi de 15,5% para o grupo EPE/hCG, 15% para o grupo EPE e 16,7% para o grupo controle. Considerando tratar-se de folículos não pré-ovulatórios, estes valores se encontram dentro da ampla margem de variação citada na literatura para as taxas de recuperação de oócitos por OPU em folículos desta categoria, que varia de 6,9 a 48% (KANITZ e BERGER, 1995; DIPPERT, 1995; SQUIRES e COOK, 1996; BOGH, 2002; GALLI, 2007).

Neste trabalho, a comparação entre os índices médios de recuperação de oócitos por folículo entre diferentes tamanhos revelou que foi recuperado número semelhante de oócitos entre as categorias de folículos de 21-30 mm (18%), maiores que 30 mm (13%) ou menores que 20mm (12%), o que contraria resultados de estudos anteriores onde diferença significativa foi observada com a variação no tamanho dos folículos. No geral, a literatura cita um índice de recuperação menor para folículos entre 20-30 mm: Kanitz e Berger (1995) obtiveram um índice de 28,3% em folículos de 10-20 mm, 6,9 % em folículos de 21-30mm e 8,3% em folículos > 30 mm e Squires et al (1996) atingiram em média 22% de recuperação de oócitos por folículo imaturo aspirado, sendo observada taxa maior para folículos menores que 15 mm (31%) que para os maiores que 20 mm (8%). Bogh et al (2002) aspirou *in vivo* folículos de até 30 mm e também obteve índices maiores para folículos com menos de 20 mm que para os de 20-29 mm (45% x 30%, respectivamente).

Bruck et al (1996), trabalhando com ovários provenientes de abatedouro, obteve 61,3% com folículos de 11 e 20 mm que dos menores que 10mm, resultado que contrasta com os outros, provavelmente em função da facilidade de manipulação dos folículos ovarianos *post-mortem*, que podem ser abertos um a um, escarificados com auxílio de bisturi e lavados diretamente sobre a placa de Petri.

O tamanho e a quantidade de folículos aspirados interfere na manipulação do ovário durante a aspiração. Folículos menores que 35 mm se encontram inseridos profundamente no estroma ovariano, o que torna a manipulação mais dolorosa para o animal e incômoda para o técnico, em função de sangramento excessivo e maior dificuldade de contenção da égua durante o procedimento, já que, além disso, a disponibilidade de folículos não pré-ovulatórios em um ovário é sempre maior e, portanto, uma sessão de OPU onde são aspirados folículos entre 10 e 35 mm, como ocorreu neste trabalho, é mais demorada que uma na qual se aspira apenas um folículo pré-ovulatório (>35mm). Além disso, o protocolo de contenção farmacológica dos animais pode ter influenciado negativamente os resultados, já que autores com índices superiores (CARNEVALE, 2005, GALLI, 2007) referem o uso de anestésicos mais potentes, como o butorphanol, que não foi utilizado neste experimento. O tamanho dos folículos também interfere nos resultados porque enquanto folículos menores que 20mm são mais fáceis de se escarificar, em função da menor área de parede folicular, folículos maiores que 35mm já apresentam expansão das células do *cumulus*, o que proporciona maior

eficiência de destacamento do oócito com a lavagem, aumentando o índice de recuperação de oócitos.

Neste experimento foi utilizada somente a pressão de aspiração (180-200 mmHg), semelhante aos trabalhos de Carnevale et al (2005) e Purcell et al (2007). No trabalho de Bogh et al (2002) a utilização de pressão de 500 mmHg para a lavagem do folículo aumentou para 50% a recuperação de oócitos/folículo, a partir de folículos <30mm. Entretanto, Duchamp et al (1995), utilizando a pressão de lavagem de 500 mmHg, obtiveram um índice de 29%. As diferenças entre estes resultados devem ser atribuídas ao tratamento hormonal e ao dia de aspiração, que foram completamente diferentes para os dois grupos. O estudo de Bogh et al em 2002 foi conduzido para comparar índices de recuperação de folículos de estro com os de diestro, tendo sido efetuadas duas aspirações sucessivas (uma no D0 e uma D8), enquanto Duchamp et al (1995) avaliaram o uso de agulhas com lúmen simples e duplo e o tratamento superovulatório no diestro.

O uso de indutores da ovulação antes da OPU é preconizado por diversos autores. Índices de recuperação maiores que 80% são obtidos a partir da aspiração de folículos pré-ovulatórios após a indução com hCG (CARNEVALE E GINTHER, 1995). Para outros indutores de ovulação, como o EPE e o GnRH, os índices obtidos em trabalho comparativo realizado por Squires et al (1992) foram, respectivamente, 63 e 42%.

Nem a hCG nem o EPE foram capazes, neste estudo, de aumentar os índices de recuperação de oócitos obtidos por aspiração de folículos imaturos,

o que também aconteceu em outros estudos publicados com folículos pré-ovulatórios, onde a superovulação, com FSH suíno (BRUCK, 1997) ou eqüino (PURCELL, 2007), EPE (CARMO, 2007; BRUCK, 2000; SQUIRES, 1996) ou EPE enriquecido com FSH (BEZARD, 1995) não aumentou os índices de recuperação por folículo, embora aumente os índices de recuperação por égua. No trabalho de Maclellan et al (2002), os melhores índices surpreendentemente foram obtidos a partir de éguas não estimuladas (69%) em comparação com as éguas superovuladas (20%). O baixo índice de recuperação pode ser atribuído à dificuldade de manipulação do ovário super estimulado, como no estudo conduzido por Carmo et al (2007), que obtiveram um maior percentual de oócitos recuperado/folículo aspirado no grupo controle (66%) do que no grupo superovulado (25%), mas o percentual de oócitos recuperados/égua foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo superovulado quando comparado ao grupo controle (116,7 e 66%).

Para recuperar 100 oócitos eqüinos, trabalhando com ovários de abatedouro, são necessários 4 técnicos trabalhando por 3-4 horas, enquanto para obter o mesmo numero de oócitos bovinos são necessários apenas 2 técnicos trabalhando por no máximo 40 minutos, o que deixa clara a dificuldade de obtenção de oócitos inerente à espécie eqüina. Além disso, é freqüente a observação de oócitos circundados apenas pelas células da corona radiata ou, ao contrário, por grande quantidade de camadas da granulosa mural, indicando os efeitos da extensiva lavagem e escarificação da parede folicular necessária para o procedimento (GALLI, 2007).

No presente experimento não foi avaliada a taxa de maturação nuclear dos oócitos, que foram avaliados somente conforme a morfologia do cumulus. Embora não tenha havido aumento na recuperação de oócitos, neste experimento a hCG foi capaz de induzir uma expansão precoce das células do *cumulus*, já que 21 dos 32 folículos com menos de 30 mm obtidos no grupo EPE/hCG apresentaram células do *cumulus* expandidas, o que só ocorreu em 4 dos 19 do grupo EPE e em nenhum dos 14 do grupo controle. Estes resultados diferem dos de Torner e Alm (1995), que avaliaram a configuração meiótica de oócitos eqüinos em relação à morfologia do complexo *cumulus-oophorus*, e observaram proporções quase iguais de oócitos com *cumulus* compacto ou expandido, bem como desnudos, nos folículos de até 30 mm, enquanto os folículos com mais de 30 mm apresentaram apenas cumulus expandidos. Os oócitos foram avaliados, após fixação com orceína e ácido acético, e classificados, de acordo com a configuração da cromatina, em imaturos (vesícula germinativa), retomada da meiose, maduros ou degenerados, e a porcentagem de oócitos em retomada da meiose foi maior para os oócitos expandidos.

Isto poderia se justificar pela expressão diferencial de receptores de LH. Em bovinos, onde a expressão de receptores para LH é detectada nas células da granulosa somente após o pico pré-ovulatório de LH, Nogueira et al (2007) detectaram a formação de *splicings* alternativos de LHR, com deleção dos exons 10 e 11, que poderiam ser responsáveis pela expressão de LHRs com maior afinidade pela hCG que pelo LH.

Em eqüinos, o trabalho de Goudet et al (1999) relata a expressão de receptores de LH tanto em células da teca quanto em células da granulosa em folículos com apenas 5 mm de diâmetro. Entretanto, estes autores utilizaram EPE 34 horas antes da OPU, o que pode ter induzido a expressão precoce destes receptores, uma vez que o FSH age em conjunto com o estradiol na indução de expressão de receptores para LH, e o EPE é um preparado parcial de gonadotrofinas que, portanto, contém FSH e LH.

No presente estudo, a presença de FSH no EPE utilizado para o tratamento superovulatório, efetuado previamente à aplicação de hCG, também poderia ter induzido a expressão precoce de receptores para LH, mas o tratamento com EPE sozinho não foi capaz de induzir a expansão precoce das células do *cumulus*, sugerindo então a possibilidade da existência de diferentes tipos de receptores de LH, com afinidade e disponibilidade de ligação diferentes.

A expansão precoce do *cumulus* obtida com a aplicação de hCG não foi capaz de aumentar os índices de recuperação de oócitos. Considerando-se que as aspirações foram efetuadas 24 horas após a administração de hCG, isto pode ter acontecido porque, segundo Stock et al (2002), a administração de hCG causa expansão progressiva do *cumulus*, associada com a deposição de ácido hialurônico, que já pode ser observada após 24 horas da aplicação, mas que se apresenta marcadamente aumentada entre 30 e 39 horas pós-hCG.

Fatores envolvidos na degradação de matriz extra-celular e no processo inflamatório relacionado à ovulação não foram considerados neste trabalho,

mas também estão envolvidos com a maturação folicular final e expansão pré-ovulatória do *cumulus*, podendo também ser necessários para a perda de adesão entre o oócito e a parede folicular e provavelmente sua ação não pôde ser induzida apenas pela ação do hCG em folículos imaturos.

Além da deposição de ácido hialurônico, durante a maturação folicular dependente de gonadotrofinas, a necessidade de migração para a fossa ovariana determina profundas mudanças no formato do folículo ovariano, sendo observado extenso remodelamento tecidual, que por sua vez é em parte regulado pela presença de enzimas como as metaloproteinases (MMPs), envolvidas na degradação de matriz extra-celular. Riley et al (2004) demonstraram a secreção, no fluido folicular de éguas, de metaloproteinases (MMP-2 e -9) com afinidade pelo colágeno tipo IV, um importante constituinte da membrana basal, mas falharam em estabelecer relação entre a secreção destes fatores e a progressão do desenvolvimento folicular, enquanto Desvouges e Sharp (2004) observaram que a produção de MMP-2 requer gonadotrofinas.

Estudos recentes têm dado ênfase na ovulação como processo inflamatório, e a partir daí outros fatores, como as interleucinas, podem ser consideradas mediadores parácrinos da maturação folicular final. Martoriatti e Gerard (2003), por exemplo, demonstraram a expressão gênica de interleucina 1 (IL-1) nas células da granulosa de eqüinos, e no mesmo estudo a quantidade de IL-1 foi relacionada às concentrações séricas de gonadotrofinas.

A maturação folicular pode ser medida pela concentração de progesterona no folículo, uma vez que, com sua progressão, a luteinização das células foliculares promove a diminuição da relação estradiol: progesterona. Neste estudo as concentrações foliculares de P4 para éguas superovuladas tratadas com hCG não apresentaram diferença estatística entre folículos < 35 mm ou > 35mm, enquanto para as éguas tratadas somente com EPE as concentrações intra-foliculares de P4 para os folículos < 35 mm eram semelhantes às do grupo controle não superovulado. Ou seja, além da expansão precoce do *cumulus*, a hCG foi capaz de acelerar a maturação das células foliculares. Mais uma vez, o EPE sozinho não foi tão eficiente quanto a hCG, corroborando a hipótese da resposta folicular diferenciada ao LH e ao hCG.

Riley et al (2004) já haviam observado aumento das concentrações de progesterona no fluido folicular após a administração de hCG a folículos com mais de 30 mm de diâmetro. Grondhal (2005) e Belin et al (2000) também referem aumento das concentrações de progesterona no fluido folicular pré-ovulatório. Entretanto, nenhum trabalho cita este mesmo efeito do hCG em folículos < 35mm, conforme observado neste estudo.

A escarificação da parede folicular é fundamental para incrementar os índices de recuperação de oócitos a partir de folículos imaturos, conforme os trabalhos de Mari et al (2005), Squires et al (1996) e Goudet et al (1997). Considerando que neste trabalho a categoria alvo analisada foi a de folículos menores que 30 mm, a escarificação se fez necessária e pode ter prejudicado a formação luteal, já que as concentrações de progesterona no plasma,

dosadas com o intuito de verificar a influência da aspiração na luteinização dos folículos aspirados, indicaram que o corpo lúteo formado após a OPU pode não ser funcional, uma vez que 34% das éguas apresentaram concentrações plasmáticas de P4 menores que 2 ng/ml no sétimo dia após a aspiração. A partir do momento que a escarificação da parede folicular retira suas células, o número de células foliculares que se diferenciou em células luteais pode ter sido insuficiente para uma adequada produção de progesterona. A escarificação vigorosa também pode ter prejudicado a rede vascular e o suprimento sanguíneo.

Reforçando esta hipótese, Niswender et al (2000), em revisão sobre o assunto, ressaltam que as concentrações plasmáticas de progesterona dependem da quantidade de tecido esteroidogênico, bem como de sua capacidade de síntese, e do fluxo sanguíneo. A quantidade do tecido esteroidogênico, por sua vez, depende do número e tamanho das células luteais, que aumentam durante o desenvolvimento do corpo lúteo.

As concentrações séricas de progesterona foram quantificadas apenas no sétimo dia após a ovulação ou a aspiração, e em ambos os casos a média foi superior a 2ng/ml, o que indica que, na maioria dos casos, nesta data estava presente um corpo lúteo funcional. Entretanto, a variação das concentrações séricas de progesterona foi maior entre o grupo das éguas aspiradas, sendo que 34,78% dos animais apresentaram níveis inferiores a 2 ng/ml, o que só ocorreu em 8,7% das éguas que ovularam naturalmente.

Hayna et al (2006) observaram variação na formação luteal de acordo com o tamanho do folículo aspirado: observou-se presença de tecido luteal em 88% das éguas com folículos aspirados entre 26-30mm, em 100% das com folículos maiores que 30 mm e em nenhuma com folículos menores que 25 mm, concluindo-se que a aspiração de folículos maiores que 25 mm em éguas em estro induz a formação de tecido luteal com atividade hormonal. Neste estudo os dados foram insuficientes para efetuar este tipo de análise, mas apenas uma das éguas que apresentou concentrações insatisfatórias de progesterona (0,2 ng/ml) no D7 não teve nenhum folículo maior que 25 mm aspirado. Outras éguas com baixas concentrações de progesterona tiveram folículos desta categoria aspirados, o que aparentemente não influenciou na luteinização no D7. Além disso, a porcentagem de folículos aspirados nas diferentes categorias de tamanho não variou entre os grupos.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que muitos trabalhos avaliando a produção de progesterona após a aspiração dos folículos foram feitos com base na aspiração apenas para a retirada de fluido folicular, sem escarificação da parede do folículo (BRUCK, 1994; OKOLSKI E BEZARD, 1995; MACKINNON, 1987). Aparentemente é a retirada de células decorrente da escarificação que prejudica a luteinização. Em adição, o procedimento pode prejudicar o suprimento vascular ovariano, importante para o adequado desenvolvimento folicular e formação do corpo lúteo, ainda mais quando se trata de aspiração de folículos imaturos, localizados mais profundamente no estroma.

Considerando a duração média do ciclo estral de 21 dias, observou-se um prolongamento do ciclo estral nas éguas submetidas à OPU, tendo sido o intervalo inter-ovulatório de 40, 33 e 26 dias para os grupos EPE, EPE/hCG e controle, respectivamente. O intervalo entre as ovulações e as aspirações não variou entre os grupos, e foi de em média 12 dias, enquanto o intervalo das aspirações até as ovulações naturais apresentou ampla variação, sendo maior para os grupos superovulados (40 dias para o grupo EPE e 33 para o grupo hCG) que para o grupo controle (26,33).

As concentrações séricas de progesterona no D7 não variaram entre os grupos, indicando atividade luteal nesta data, e apesar dos dados obtidos não serem suficientes para estabelecer qualquer relação entre o intervalo aspiração-ovulação, as hipóteses formuladas para explicar este prolongamento do ciclo se relacionam à possíveis alterações morfológicas causadas pelo procedimento, tais como a ablação folicular e alterações no fluxo sangüíneo como causa de possíveis deficiências no mecanismo de crescimento folicular, ovulação e mesmo luteólise, já que para que haja regressão do corpo lúteo é necessária prévia ação do estrógeno folicular para haver a formação de receptores endometriais para oxitocina. Pode ter havido um crescimento mais lento dos folículos em função de alterações vasculares, ocasionando baixas concentrações de estradiol, o que além de prolongar a fase folicular por si só, atrasando o *feed-back* hipotalâmico positivo sobre a liberação de LH e o desvio folicular, também ocasionou falhas no mecanismo de formação de receptores de oxitocina. Corroborando esta hipótese, observa-

se que o prolongamento do ciclo foi menor no grupo controle, onde o número total de folículos aspirados foi menor, e portanto, o procedimento foi menos agressivo.

8. CONCLUSÕES

- o tratamento superovulatório com EPE associado ao hCG não foi capaz de aumentar o índice de recuperação de oócitos obtidos por OPU de folículos < 35 mm;
- a hCG induziu maturação folicular em folículos com 25-35 mm de diâmetro, com aumento das concentrações intra-foliculares de progesterona e expansão das células da granulosa;
- a aspiração dos folículos imaturos aumentou o intervalo inter-ovulatório;
- as concentrações séricas de progesterona no sétimo dia após a ovulação foram semelhantes às observadas no sétimo dia após as ovulações naturais.

9 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, D.F. COMBELLES, C.M.H.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 121, p. 647–653, 2001.
- ALVARENGA, M.A; MCCUE, P.M.; FRANZ, L.C. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. *Theriogenology*, v. 51, n.1, p. 431, 1999.
- AMI, I. B. A.; BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Molecular Human Reproduction*, v.12, n.7 p. 413–419, 2006.
- ANDRADE, L.S. *O ciclo estral da égua e seu controle endócrino*. In: *Fisiologia e manejo da reprodução eqüina*, 2 ed, recife, 1986, p. 57-63.
- BALTSSEN, M.; BOGH, I.B.; BYSKOV, A.G. Content of meiosis activating sterols in equine follicular fluids: correlation to follicular size and dominance. *Theriogenology*, v. 56, p. 133-145, 2001.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci*, v. 76, p. 1903-1921, 1998.
- BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, v. 132, p. 265, 377, 2006.
- BELIN, I.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; GERARD, N. Interfollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biology of reproduction*, v. 62, p. 1335-1343, 2000.
- BÉZARD, J.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. *Biol. Reprod. Mono*, v.1, p. 261-271, 1995.

- BLANCO, I.D.P.; DEVITO, L.G.; FERREIRA, H.N.; CARMO, M.T.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Efeito do tratamento com EPE e hCG no grau de expansão das células da granulosa de folículos eqüinos. Anais do XVII Congresso do colégio brasileiro de reprodução animal, p. 163, Curitiba, 2007a.
- BLANCO, I.D.P.; DEVITO, L.G.; FERREIRA, H.N.; CARMO, M.T.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Efeito da superovulação e tratamento com hCG na recuperação de oócitos equinos através de OPU de folículos imaturos. Anais da XXI Reunião Anual da SBTE, v. 35, supl 1, p. 1054, Costa do Sauípe, 2007b.
- BLANCO, I.D.P.; FERREIRA, H.N.; DEVITO, L.G.; CARMO, M.T.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Efeito da aspiração de folículos imaturos sobre a duração do ciclo estral de éguas. Anais da XXI Reunião Anual da SBTE, v. 35, supl 1, p. 1040, Costa do Sauípe, 2007c.
- BØGH, 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.
- BOGH, I.B.; HOIER, R.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Steroid concentrations in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. *Theriogenology*, v. 54, p. 877-888, 2000.
- BOLS, P.E.J.; VANDENHEED, J.M.M.;VAN SOOM, A.;DE KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v. 43, n. 3, p. 677-687, 1995.

- BRUCK, I.; BEZARD J.; BALTSSEN M.; SYNNESTVEDT B.; COUTY I.; GREVE T.; DUCHAMP G. Effect of administering of a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation in vivo. *Journal of reproduction and fertility*, v. 118, p. 351-360, 2000.
- BRUCK, I.; GREVE, T. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. *Theriogenology*, v. 41, p. 170, 1994.
- BRUCK, I.; GRONDAHL, C.; HOST, T.; GREVE, T. In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. *Theriogenology*, v.46, p. 75-84, 1996.
- BRUCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound guided technique. *Equine Veterinary Journal*, v.24, n.1, p. 58-59, 1992.
- BRUCK, I.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH- treated mares. *Theriogenology*, v. 47, p. 1157-1167, 1997.
- BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B.C ;CARON, P.J; EPPIG, J.J. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Developmental biology*, v. 138, n. 1, p. 16-25, 1990.
- BURATINI JR, J. *Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando a ultrassonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante*. Dissertação, Mestrado, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, 1997.
- CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cells interactions. *Human Reproduction Update*, v. 6, n.3, p.279-289, 2000.
- CARMO, M.T. *Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária eqüina*. 2007. 214f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia. Universidade estadual paulista- UNESP- Botucatu.

- CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, pg. 252 – 254, 2002.
- CARNEVALE, E.M. Use of oocyte transfer in a commercial program for mares with reproductive abnormalities. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 218, n.1, p. 87-91, 2001.
- CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the succes of oocyte tranfer in a clinical program fro subfertile mares. *Theriogenology*, v. 64, p. 519-527, 2005.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono*, v.1, p. 209-214, 1995.
- 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, n. 6, p. 331-333, 1993.
- COCHRAN, R.; MEINTJES, M.; REGGIO, B. Live foals produced from sperm injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 18, n. 11, p. 736-740, 1998.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y. Q. Role of the EGF network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 4, p.715-723, 2006.
- 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.

- DESVOUGES, A.L; SHARP, D.C. Ovarian tissue remodeling and pre-ovulatory follicle development. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, n. 14, *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, p. 25, 2004.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; VAN TOL, H.T.M.; WILLENSE, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period. *Animal Reproduction Science*, v. 10, p. 275-292, 1986.
- DIPPERT, K.D.; RAY, B.S.; SQUIRES, E.L. Maximizing ultrasound-guided retrieval of equine oocytes. *Theriogenology*, v. 41, p. 190, 1994.
- DIPPERT, K.D; B.S. RAY; SQUIRES, E.L. Aspiration of the dominant follicle in mares and its effect on subsequent follicular development. *Animal Reproduction Science*, v. 40, p. 77-88, 1995.
- DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O.J. Route of prostaglandin F2a injection and luteolysis in mares. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.148, p. 263–269, 1975.
- DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; PALMER, E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. *Biol. Reprod. Mono*, v.1, p. 233-241, 1995.
- DUNNING, K.R.; LANE, M.; BROWN, H.M.; YEO, C.; ROBKER, R.L.; RUSSELL, D.L. Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. *Human Reproduction*, v.22, n.11, p. 2842–2850, 2007.
- EINSPANIER, R., SCHOENFELDER, M. Expression of Hyaluronan Synthases and corresponding Hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 269-277, 2003.

- EPPIG, J.J. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. *Biology of reproduction*, v. 23, p. 545-552, 1980.
- ERICE, I.; GIL, L.; JOSA, A.; ECHEGARAY, A.; MARTINEZ, F.; ESPINOSA, E. Effect of mare's age and recovery methods on the recovery rates of equine follicular oocytes for IVM procedures. *Theriogenology*, v.49, p. 735-741, 1998.
- ESPEY, L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to a inflammatory reaction. *Biology of reproduction*, v. 50, p. 233-238, 1994.
- FEUERSTEIN, P. CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUERIF, F.; BIDAULT, R.; ROYERE, D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction*, p. 1-9, 2007.
- FOOTE, R.M.; ELLINGTON, J, E. Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology*, v. 29, n.1, p. 111-122, 1988.
- GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*, v.98, p. 39-55, 2007.
- GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P.; BERGFELT, D. R. ; GINTHER, O. J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentration and follicle deviation in mares. *Theriogenology*, v. 53, p. 925-940, 2000.
- GÉRARD, N.; DELPUECH, T.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T.; MONGET, P. Proteolytic degradation of IGF-binding protein (IGFBP)-2 in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and association with dominant but not

- subordinated follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 182, p.457-466, 2004.
- GERARD, N.; DUCHAMP, G.; MAGISTRINI, M. Relationships between follicular fluid composition and follicular/oocyte quality in the mare. *Livestock Production Science*, v. 60, p. 243-253, 1999.
 - GÉRARD, N.; MONGET, P. Intrafollicular Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein Levels in Equine Ovarian Follicles during Preovulatory Maturation and Regression' *Biology of Reproduction*, v.58, p.1508-1514, 1998.
 - GINTHER, O. J.; FIRST, N.L. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *Am. J. Vet. Res.*, v. 32, p. 1687–1691,1971.
 - GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J. Reprod. Fertil.*, v. 90, p. 311-320, 1990.
 - GINTHER, O.J. *Reproductive Biology of the Mare. Basic and applied aspects*, 2^o ed. Cross Plains: Equiservices, 1992, 640p.
 - GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 61-79, 2000.
 - GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol. Reprod.*, v. 73, p. 315–323, 2005.
 - GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 213-220, 2007.
 - GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 95, p. 144-150, 2006.
 - GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, J.; GERARD, N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin and aromatase in relation to folliculra growth, estrous cycle stage, and oocyte

- competence for in vitro maturation in the mare. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 1120-1127, 1999.
- GRØNDAHL, C.; HYTTEL, P.; GRØNDAHL, M.L.; ERIKSEN, T.; GOTFREDSEN, P.; GREVE, T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Molecular Reproduction and Development*. v. 42, n.1, p. 94-105, 2005.
 - GUILLOU, C.; COMBARNOUS, Y. Purification of equine gonadotrophins and comparative study of their acid-dissociation and receptor- binding specificity. *Biochem. Biophys Acta*, v. 755, p. 229-236, 1983.
 - HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. São Paulo, Manole, 2003, 530 p.
 - HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol. Reprod. Mono.* v. 1, p.243-252, 1995.
 - HAYNA, J.T.; HADILL, S. TROEDSSON, M.H. The effect of transvaginal follicular aspiration on corpus luteum formation in mares. *Equine Embryo Transfer – Havemeyer Foundation Monograph Series*, n.14, 2004.
 - HAYNA, J.T.; MADILL, S.; ROSER, J.F.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 94, p. 355-356, 2006.
 - HINRICHS, K.; MATTHEWS, G.L.; FREEMAN, D.A.; TORELLO. E.M. Oocyte tranfer in mares. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 212, n. 7, 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; KENNEY, R.M. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. *Theriogenology*, v.27, n.1, p. 237, 1987.
- HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 461-477, 2004.
- HYLAN, D.; KLUMP, A.M.; SANSINENA, M.; LACASE, R.J.; PACCAMONTI, D.; DENNISTON, R.S.; GODKE, R.A. Oocyte production from naïve and chronically-aspirated mares. *Theriogenology*, v. 58, p. 739-741, 2002.
- JABLONKA-SHARIF, A.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, P.L. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 133, p. 1871-1879, 1993.
- JAMNONGJIT, M.; GILL, A.; HAMMES, S.R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.102, p.16257-16262, 2005.
- KANITZ, W.; BERGER, F.; ALM, H.; TAMER, H. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. *Biol. Reprod. Mono*, v. 1, p. 225-231, 1995.
- KERBAN, A.; BOERBOOM, D.; SIROIS, J. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory proteins messenger ribonucleic acid in theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Endocrinology*, v. 140, n.2, p. 667-674, 1999.
- KIMATA, K., ZHUO, L. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell structure and function*, v. 26, p. 189-196, 2001.

- LEVINE, H.; WIGHT, T.; SQUIRES, L. Ultrastructure of the corpus luteum of the cycling mare. *Biology of reproduction*, v. 20, p. 492-504, 1979.
- LI, L.Y. In vitro fertilization and development of in vivo matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biol. Reprod. Mono.* v. 1, p. 309-317, 1995.
- LINDBLOOM, S.M.; FARMERIE, T.A.; CLAY, C.M.; SEIDEL, G.E. J.; CARNEVALE, E.M. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. *Anim. Reprod. Sci.* (2007), article in press, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.04.006.
- LOSINNO, L.; AGUILAR, J.J.; LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. *Equine Embryo Transfer*, v. 03, p. 81 – 83, 2000.
- MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, I.; STEFANO, B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Animal Reproduction Science*, v. 88, p. 299-308, 2005.
- MARTORIATI, A.; GÉRARD, N. Interleukin-I (IL-I) system gene expression in granulose cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 43, 2003.
- MCCRACKEN, J.A. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiological Reviews*, v. 79, n. 2, 1999.
- MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. *The estrous cycles*. In: Mckinnon, A.O. EQUINE REPRODUCTION, Malvern: lea and febiger, 1993, p. 211-220.
- MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. Ultrasonography. In: McKinnon, A.O. *Equine Reproduction*, Malvern: Lea & Febiger, 1993, p. 211-220.

- MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, v.130, p. 791-799, 2005.
- MEINTJES, M.; BELOW, M.S.; PAUL, J.B.; BROUSSARD, J.L.; LI, L.Y.; PACCAMONTI, D.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Biol. Reprod. Mono.* v. 1, p. 281-292, 1995.
- NAGYOVA, E.; VANDERHYDEN, B.C.; PROCHA`ZKA, R. Secretion of Paracrine Factors Enabling Expansion of Cumulus Cells Is Developmentally Regulated in Pig Oocytes. *Biology of Reproduction*, v.63, p. 1149-1156, 2000.
- NISWENDER, G. D., JUENGEL, J.L., SILVA, P. J., ROLLYNSON, M. K., MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v. 80, n. 1, p.1-29, 2000.
- NOGUEIRA, M.F.G. ; BURATINI JÚNIOR, J. ; PRICE, C. A. ; CASTILHO, A.C ; PINTO, MAICON, G. L. ; BARROS, C. M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, n. 6, p. 680-686, 2007
- OKÓLSKI, A. ET AL. Successive puncture of the dominant follicle followed by ovulation and fertilization: a new experimental model for the study of follicular maturation in the mare. *Biol. Reprod. Mono*, v.1, p. 385-392, 1995.
- PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.C.; CONTI, M. EGF-Like Growth Factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v.303, p. 682-684, 2004.

- 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.; DIELEMAN, S.; DRIFJHOUT, P.; VAN DER BAG, Y.; OEI, C.; VAN DER WEIJDEN, G.C. Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrous behaviour in the cycling mare. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 30, p. 224-227, 1995.
- RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Ann. Rev. Physiol.* V. 64, p. 69-92, 2002.
- RILEY, S.C.; THOMASSEN, R.; BAE, S.E.; LEASK, R.; PEDERSEN, H.G.; WATSON, E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. *Animal Reproduction Science* V.81, P.329-339, 2004.
- RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, v.13, n.3 p. 289-312, 2007.
- SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to EPE in cyclic mares. *Theriogenology*, v. 58, p. 151-164, 2002.
- SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition, ISBN 0-9657648-2-6, 2005.
- SERTICH, P.L. Transcervical embryo transfer in performance mares. *Journal of the American Association*, v. 195, n.7, p. 940 - 944, 1989.
- SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Developmental changes in steroidogenesis by equine preovulatory follicles: effects of equine LH, FSH, and CG. *Endocrinology*, v.127, p. 2423-2430, 1990.

- SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. *Endocrinology*, v. 128, p.1159-1166, 1991.
- SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v.12, p.223-245, 1995.
- SPICER, L.J.; SANTIAGO, C.A.; DAVIDSON, T.R.; BRIDGES, T.S.; CHAMBERLAIN, C.S. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domestic Animal Endocrinology*, v.29, p. 573-581, 2005.
- SQUIRES, E.L.; COOK, N.L. Transvaginal aspiration. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.12, n. 1, p. 13-29, 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, n. 11, p. 4375-4384, 2002.
- SUTOVSKY, P.; FLECHON, J.E.; PAVLOK, A. Microfilaments, microtubulus and intermediate filaments fulfil diferential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus-oophorus. *Reprod. Nutr. Development*, v. 34; p. 415-425, 1994.
- TORNER, H.; ALM, H. Meiotic configuration of horse oocytes in relation to the morphology of the cumulus-oocyte complex. *Biol. Reprod. Mono*, v.1, p. 253-259, 1995.
- 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.
- URWIN, V.E.; ALLEN, W.R. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and progesterone concentrations in the blood of

Thoroughbred mares exhibiting singles and twin ovulations. *Equine Vet. J. London*, v. 15, p. 325 – 329, 1983.

- VOGELSANG, M.M.; KREIDER, J.L.; BOWEN, M.J.; POTTER, G.D.; FORREST, D.W.; KRAEMER, D.C. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology*, v. 29, n. 5, p. 1007-1018, 1988.
- WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Effect of aspiration of follicular fluid on subsequent luteal function in the mare. *Theriogenology*, v. 33, n. 6, p. 1263-1268, 1990.
- WATSON, E.D.; THOMASSEN, R.; STEELE, M.; HEALD, M.; LEASK, R.; GROOME, N.P.; RILEY, S.C. Concentrations of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinated follicles from mares during spring transition and the breeding season. *Animal Reproduction Science*, v. 74, p. 55-67, 2002.

10. TRABALHO CIENTÍFICO

(a ser enviado à revista ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE)

ASPIRATION OF EQUINE OOCYTES FROM IMMATURE FOLLICLES AFTER TREATMENT WITH EQUINE PITUITARY EXTRACT (EPE) ALONE OR IN COMBINATION WITH HCG

Blanco, I.D.P., Devito, L.G., Ferreira, H.N., Alvarenga M.A., Landim-Alvarenga F.C.

Dep. Animal Reproduction and Veterinary Radiology, FMVZ-UNESP-Botucatu-
SP-18618.000, Brazil

Corresponding author: Prof.^a Dr.^a Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Dep Animal Reproduction and Veterinary Radiology

F.M.V.Z. - UNESP - Botucatu –SP

Brazil - 18.618-000

Fone/Fax: 55 14 3811 6249

fernanda@fmvz.unesp.br

Abstract

In mares the use of artificial reproductive techniques (ART) such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI), oocyte transfer (OT), and cloning is limited by the low availability of oocytes obtained either in vitro or in vivo. The low recovery rate of oocytes from immature follicles seems to be linked with anatomical particularities of the

follicular wall. In pre-ovulatory follicles (>35mm in diameter), the final oocyte maturation is accompanied by the expansion of the cumulus which release the oocyte from the follicular wall increasing the recovery rates after follicular aspiration. The number of oocytes recovered in each OPU (Ovum Pick Up) section should be higher with superovulation. However, although the total number of oocytes recovered by each individual mare is increased, the recovery rate by follicle is still low. Since the hCG treatment modify the intra-follicular environment inducing precocious expansion of the granulosa cells and leading to a higher recovery rate during OPU of pre-ovulatory follicles, this experiment aimed to evaluate the effect of hCG treatment in the oocyte recovery rate obtained from immature follicles in mares superovulated with Equine Pituitary Extract (EPE). Ten mares were rotated in 3 different treatments: G1 – superovulated with EPE; G2 – Superovulated with EPE and treated with hCG, and G3 – Control. For all treatments, when the biggest follicle reach 27 – 30 mm, all follicles bigger than 10 mm were aspirated. Each OPU cycle was alternated with a rest cycle when a spontaneous ovulation occurs. Although the treatment with hCG increase the number of follicles presenting expanded granulosa and high intra-follicular progesterone concentration, no statistic differences were observed between groups concerning oocyte recovery. The OPU procedure resulted in a prolongation of the estrus cycle length probably due to the removal of large amounts of follicular cells delaying the corpus luteum (CL) formation.

Key words: OPU, equine, oocytes, superovulation, EPE, hCG, follicular maturation.

Introduction

The development of assisted reproduction technologies (ART) in the horse has been slow compared with that in other large domestic animals. Although the development of techniques such as oocyte transfer (OT) has led to some clinical interest (Carnevale 2004), other techniques like IVF, ICSI and somatic cell cloning are far away from allowing their use in routine commercial programs. Successful embryo *in vitro* production (IVP) depends on a number of factors such as: availability of healthy immature oocytes, efficient and repeatable methods for IVM, physiological sperm capacitation, and subsequent optimum embryo *in vitro* culture systems.

The good results obtained on *in vitro* production of bovine embryos is, in great part, related with the unlimited availability of abattoir-collected bovine oocytes and the total freedom to conduct research with such material. By contrast, in the case of the horse there was a scarce availability of abattoir ovaries which limited the rate of the advances in research that depends on oocyte utilization (Galli et al., 2007). Moreover, the anatomy of oocyte attachment to the follicle wall in the horse interferes with the efficiency of recovery methods both *in vivo* and *in vitro*. In horses the follicle presents a thecal pad beneath the *cumulus* cells attachment which act as an anchor for the *cumulus* attachment (Hawley et al., 1995).

Ovum Pick Up (OPU) is a non invasive method that has been used successfully to obtain oocytes for OT (Meintjes et al, 1995; Carnevale, 2004). Oocytes are usually collected from one pre-ovulatory follicle per mare that had been treated with hCG to accelerate follicular maturation resulting in high recovery rates. However, the aspiration of immature follicles results in poor recovery rates (Cook et al., 1992), although allowing an increase in the number of follicles punctured. Rates as good as 77% oocyte recovery are

obtained with the puncture of pre-ovulatory follicles after hCG administration (Carnevale et al., 2005). On the other hand, when immature follicles were used a much lower recovery rate is achieved 6.9% a 52% (Kanitz et al., 1995; Dippert et al., 1995; Squires and Cook, 1996; Bogh et al., 2002; Galli et al., 2007). The high recovery rate obtained with pre-ovulatory follicles seems to be linked with the cumulus expansion that take place at the end of follicular maturation preparing the oocyte for release during ovulation.

Since mares are monovulatory animals with just one follicle reaching the pre-ovulatory state at each estrous cycle, to collect a large number of oocytes, it would be beneficial to have numerous follicles on the ovary at the time of aspiration. Superovulation is one way to increase the number of follicles available for aspiration. However, bad results were obtained in previous attempts to aspirate pre-ovulatory follicles from superovulated mares (McLellan et al., 2002; Carmo, 2007). The lower recovery rate has been attributing to difficulties in manipulating the superovulated ovary due to its big size and volume of follicles.

Considering the possibility to have LH receptors (LHr) in immature follicles and the positive effects of hCG in the final maturation, the objective of this experiment was to compare the recovery rates of immature oocytes via transvaginal aspiration in equine ovaries stimulated with EPE. We hypothesized that treatment of mares with EPE alone or in combination with hCG would increase the oocyte recovery obtained from immature follicles.

Materials and Methods

Ten crossbreed mares aging 3 to 15 years and weighing 350 to 400 Kg were used between October and March of 2007, in Botucatu, Sao Paulo, Brazil (Latitude 22°52'S and

Longitude 48°27'W). Before started the experiment, each mare had their uterus and ovaries evaluated by trans-rectal palpation and ultrasonography. Only animals that already presented one spontaneous ovulation at the beginning of the breeding season were used. The equine pituitary extract (EPE) was prepared according with the protocols proposed by Guillon & Combarous, (1983).

The follicular dynamic was followed by rectal palpation and ultrasonography with a 5Mhz linear probe every two days, and daily, after the observation of one 30 mm follicles or the beginning of the superovulatory treatment. Each mare was submitted, randomly, to all treatments with the interval of one spontaneous ovulation between treatments.

Treatment Groups:

- Group EPE/HCG: Seven days after ovulation the mares received 250 µg of cloprostenol. The administration of 25 mg of EPE, im, was performed twice daily, until most follicles reached 22 to 27 mm, when hCG (Vetecor, 2500 UI, i.v., Calier do Brazil, São Paulo, SP) was administered. Twenty four hours after hCG all follicles presenting more than 10 mm were aspirated.
- Group EPE: Treatment also begun 7 days after ovulation with prostaglandin administration (250 µg of cloprostenol). EPE treatment followed the same protocol described in Group 1 and all follicles bigger than 10 mm were aspirated 24 hours after most of the follicles in the ovary reached 22 to 27 mm.
- Control: Seven days after ovulation prostaglandin (250 µg of cloprostenol) was administered and the follicular growth was followed until the biggest follicle reached 27 to 30 mm. Twenty four hours late, all follicles bigger than 10 mm were aspirated.

For follicular aspiration mares were sedated with 1ml of acepromazine (Acepram®, Univet, Sao Paulo, Brazil), 0,08 mg/kg of Romifidine (Sedivet® , Boehringer Ingelheim, São Paulo, Brazil) and 15-30 ml of n-butiloscopolamin bromete (Buscopan®) for rectal relaxation. An Aquilavet (Esaote-Pie Medical, Holanda) ultrasound machine with a 7,5 Mhz convex probe housed in a hard plastic casing was used for visualization and aspiration of follicles. Each follicle was aspirated with a 12-gauge double lumen needle (12-GA-Cook Veterinary Products, Spencer, IN) attached to a vacuum-pump at a pressure of 180-200mmHg. Each follicle was flushed continuously with 50 to 150 mL modified Dulbecco's phosphate buffered saline (Nutricell, Campinas-SP, Brazil) supplemented with 10 U/mL heparin and 0.05% (w/v) fraction V bovine serum albumin (FV-BSA) and warmed to 38 °C. During flushing the follicular wall was scraped with the puncture needle.

The fluid collected from each individual follicle was transferred to Petri dishes (45x25) and examined in a stereomicroscope (40X) for searching of oocytes and visual analysis of granulose cell.

For plasma progesterone quantification blood samples were collected by jugular puncture 7 days after aspirations or expontaneous ovulation (control). Serum samples were stored at – 16°C in identified 1.5 mL Eppendor vials. Follicular fluid was collected at the moment of aspiration and samples with no blood contamination were stored in freezer until de moment of progesterone analysis. For comparison purpose some samples were collected from pre-ovulatory follicles (> 45 mm) of mares treated wit EPE + hCG, according to the protocol described in Group 1. Progesterone measurement was performed by radio immune assay (RIA) using the commercial Kit Coat-A-Count® Progesterone (DPC, Los Angeles,

Califórnia.). Intra- and interassay coefficients of variation were respectively 1.91% and 6.78%. The sensitivity of the method specified by the DPC kit was 0.03 ng/ml. Since the concentration of progesterone in the follicular fluid is physiologically very high, the samples were diluted in PBS (1:100) before analysis.

For values expressed in percentage the statistic analysis used was Qui-square and Fisher Test, both with 5% significance. Progesterone concentration and intervals in days were analyzed by ANOVA, followed, when necessary, by Tukey test with 5% significance. When those same values were compared by pair the Student t test was used.

Results

In this experiment 30 OPU sections were performed (10/treatment) and a total of 45 follicles were aspirated in the group EPE/hCG, 40 in the group EPE and 30 in the control. No statistic differences were observed between groups concerning oocyte recovery ($p > 0.05$). The average index of oocytes recovered per follicle aspirated was 15.5% (7/45) for group EPE/hCG, 15% (6/40) in the EPE group and 16.7% (5/30) in the control group. In the EPE/hCG group the percentage of mares with an aspiration that yield the recovery of at least one oocyte was 70% (7/10), in the EPE group was 60% (6/10) and 50% (5/10) in the control group. Again no statistic differences were observed between groups ($p > 0.05$).

Also no statistic differences were observed between groups ($p > 0.05$) in oocyte recovery rate considering the size of the follicle (Table 1).

Table 1: Oocyte recovery rate from different follicles classified by size.

| | EPE/HCG | EPE | CONTROL | TOTAL |
|-----------------|----------------|------------|----------------|--------------|
| <20mm | 14,28% | 8,3% | 15,4% | 12,50% |
| 20-30mm | 20% | 16,6% | 15,4% | 18% |
| >30mm | 0 | 20% | 25% | 13,63% |

(p > 0.05) Fisher exact test with 5% significance

From the follicles present at the ovaries at the moment of aspiration 73.8% were aspirated in the EPE/hCG group (45 from 61), 63.5% in the EPE group (40 from 63) and 71.4% in the control group (30 from 42). No statistic differences were observed concerning the percentage of aspirated follicles in relation with their size and the total number present at the ovary (Table 2).

Table 02: Number of follicles aspirated in each size category and in each treatment.

| | 10-15mm | 16-20mm | 21-25mm | 26-30mm | >30mm |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| EPE + hCG | 10 | 12 | 7 | 23 | 9 |
| EPE | 9 | 20 | 11 | 14 | 9 |
| control | 8 | 15 | 4 | 9 | 6 |

(p > 0.05) Qui-square.

When the morphological aspect of the granulosa cells was analyzed after OPU, the number of follicles presenting expanded granulosa cells was significantly higher (p < 0.05)

in group EPE/hCG (29/45 follicles - 64.4%), compared with the control group (1/30 follicle - 3.3%). No differences ($p > 0.05$) were observed between the EPE/hCG group and the EPE group (10/40 follicles - 25%).

The mean progesterone concentration in the follicular fluid of immature follicles ($< 35\text{mm}$) aspirated after EPE/hCG treatment was similar to the one observed in pre-ovulatory follicles ($> 35\text{mm}$) used as control ($158,80 \text{ ng/mL} \pm 29,62$ X $268,57 \text{ ng/mL} \pm 55,91$ respectively), and higher than the one observed in immature follicles treated only with EPE ($72,50 \text{ ng/mL} \pm 55,91$) or in non treated (control) mares ($82,05 \text{ ng/mL} \pm 13,85$) (Tukey's test - $p < 0.05$).

The mean intervals observed between beginning of treatment and follicular aspiration, between natural ovulation and followed treatment, and between two consecutive natural ovulations are presented in Table 3. The results showed that the treatment with EPE alone significantly increase the time between the aspiration and the followed natural ovulation and, consequently the time between ovulations, when compared with the control group.

Table 03: Interval between natural ovulation and follicular aspiration (Ov-Asp); aspiration and subsequent natural ovulation (Asp-Ov); between natural ovulations (Ov-Ov) and plasma progesterone concentrations for the 3 different groups.

| | Ov - Asp | Asp - Ov | Ov - ov |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| EPE / hCG | $11,56 \pm 2,01\text{a}$ | $22,6 \pm 12,6\text{ab}$ | $33,4 \pm 12,3\text{ab}$ |
| EPE | $12,33 \pm 1,66\text{a}$ | $27,33 \pm 15,17\text{a}$ | $40,17 \pm 16,27\text{a}$ |
| Control | $11,4 \pm 1,89\text{a}$ | $15 \pm 4,55\text{b}$ | $26,33 \pm 4,92\text{b}$ |

Different letters (a, b) indicate statistic differences using Fisher's test ($p < 0.05$).

Plasma progesterone concentration on day 7 after aspiration was $2,91 \text{ ng/mL} \pm 2,93$ for EPE/hCG group, $3,28 \text{ ng/mL} \pm 2,92$ in the EPE group and $4.36 \text{ ng/mL} \pm 1,71$ in the control group. Those values were not statistically different (Tukey's test – $p > 0.05$). However when spontaneous ovulation was compared with aspiration plasma progesterone concentration was significantly higher in mares with spontaneous ovulation ($7.51 \text{ ng/mL} \pm 0.81^a$) when compared with OPU ($3.73 \text{ ng/mL} \pm 0.87^b$) ($p < 0.05$, "t" test). Progesterone concentration was lower than 2 ng/mL in 34.78% (8/23) from aspirated mares and in only 8.7% (2/23) from mares with spontaneous ovulation ($p=0,071$ – Fisher exact test).

Discussion

The average index of oocyte recovery was around 15% independently of the treatment used. Considering that just immature follicles were aspirated, these values are included in the wide variation observed in the literature (between 6.9 and 48%) concerning oocyte recovery rate after OPU of follicles smaller than 30 mm in diameter (Kanitz et al., 1995; Dippert et al., 1995; Squires and Cook, 1996; Bogh et al., 2002; Galli et al., 2007).

In the present experiment a similar number of oocytes were recovered when follicles with different diameters were aspirated (Table 1) disagreeing with previous results from other authors that showed a lower recovery rate during aspiration of follicles with 20 to 30 mm in diameter (Kanitz et al., 1995; Squires et al., 1996; Bogh et al., 2002). There are evidences that the difficulties in obtaining oocytes from follicles in this size range are related with their large volume, although still immature, which impairs an adequate scarification of the follicular wall. Moreover, the presence of several follicles with this size during superovulation represents an increase in the difficulty for manipulating the ovary

during OPU. In the present experiment the majority of the follicles aspirated had 20 or more mm in diameter and the oocyte recovery rate as similar to the one observed in small follicles, even in superovulated ovaries.

According to the results obtained in this experiment neither the EPE alone nor in combination with hCG were capable of induce a increase in oocyte recovery rate from immature follicles. This result is in agreement with others studies showing that the superovulatory treatment with swine FSH (Bruck et al., 1997), equine FSH (Purcell et al., 2007) or EPE (Carmo, 2007; Bruck et al., 2000; Squires, 1996) did not increase oocyte recovery rate per follicle; although a higher recovery rate per mare was observed.

Despite the low oocyte recovery rate observed in this experiment, the treatment with hCG was efficient in inducing precocious granulosa cells expansion. Although no statistic differences were observed, the same effect was less evident when EPE alone was used despite the high concentration of FSH and LH present in this compound. In Bovine, the expression of LH receptors is detected just after the pre-ovulatory LH surge. However Nogueira et al. (2007) report the presence of an alternative splicing of the LH receptor (LHr) in bovine granulosa cells; witch could be responsible for the formation of LHr with higher affinity for hCG. A similar situation may be happening in the equine, explaining the higher number of follicle presenting expanded cells in the hCG group. The work from Goudet et al. (1999) describes the expression of LHr either in the theca as in granulosa cells in follicles as small as 5mm. However these authors performed the OPU 34 hours after the EPE treatment. Since the FSH present in the EPE act together with the estradiol from the follicle to induce the expression of LHr, a longer interval between treatment and aspiration may be important.

Nevertheless, the expansion of the granulosa cells was not followed by an increase in oocyte recovery, indicating that probably 24 hours is not enough for the occurrence of modifications on the cumulus cells detaching the oocyte cumulus complex from the follicular wall. According to Stock et al. (2002) the hCG administration leads to a progressive expansion of the mural granulosa cells and cumulus cells associated with a deposition of hyaluronic acid in the follicular wall. Although modifications can already be seen 24 hours after hCG, the effect is much more evident after 30 to 39 hours. Besides hyaluronic acid, other factors like, interleucines (Martotiatti and Gerard, 2003) and metalloproteinases (Riley et al., 2004, Desvougues and Sharp, 2004), may be involved in the final maturation of the follicle and release of the oocyte which may not be related with the hCG action.

Follicular maturation may be measured by the intra-follicular progesterone concentration which rises as the follicle grows (Riley et al., 2004; Grondhal, 2005; Belin et al., 2000). In the present experiment the P_4 concentrations were similar between pre-ovulatory follicles and immature follicles treated with EPE/hCG. This result indicates that, besides inducing granulosa cell expansion, the hCG was also able to stimulate maturation in the follicular cells. One more time, the same effect was not observed with the EPE alone, reinforcing the idea of the presence of LHR with different affinity for LH and hCG.

In mares, the scarification of the follicular wall is important to increase oocyte recovery rate (Mari et al., 2005; Squires et al., 1996; Goudet et al., 1997). Considering that in the present work the goal was to recover oocytes from follicles smaller than 30 mm in diameter, the scarification was even more necessary. However, the removal of a high amount of follicular cells during the procedure may be detrimental for the CL formation. The fact that 34% of the mares submitted to OPU had plasma progesterone concentrations

smaller than 2 ng/mL reinforces this idea. Niswender et al. (2000) reported that in mares, plasma progesterone concentrations depends on the quantity of steroidogenic tissue and on the blood flow of the CL. By other hand, the amount of steroidogenic tissue depends on the number and size of luteal cells, witch increase during the development of the CL. The removal of a large amount of follicular cells may result in the formation a CL with a low number of luteal cells. However, in the present work plasma progesterone concentration was measured just on day 7 and a follow up of the luteal function during the all cycle would be necessary to confirm the CL malfunction.

Considering that, in the mare the estrous cycle has 21 days, an expressive increase in the estrous cycle length was observed in mares submitted to superovulation before OPU. The interval between a previous ovulation and the beginning of the treatment did not vary between groups. However the interval between the aspiration of the follicles and the followed natural ovulation was extremely variable between individuals resulting in a much longer time in the superovulated groups. In the groups treated with EPE and EPE/hCG a lower follicular growth may be happening due to vascular alterations of the punctured ovary. This delay in the development of a new follicular wave could result in lower E_2 concentrations leading to a prolongation of the estrogenic phase, delaying the LH release and consequently the follicular deviation. Moreover, the low E_2 may also result in failure of ocitocin receptors expression and consequently PGF production in the uterus. An indicative of this hypothesis is that in the control group were the procedure was less invasive, because a small number of follicles were aspirated (Table 2), the time between aspiration and the followed ovulation was shorter.

In conclusion, the superovulatory treatment with EPE associated with hCG was able to induce follicular cells maturation, but not to increase oocyte recovery from immature

oocytes. Although a functional CL was observed on day 7, the OPU procedure seemed to interfere with the quality of the luteal tissue. Moreover, the OPU of a large number of follicles in the superovulated mares increased the estrous cycle length.

Bibliography

- Belin I., Goudet G., Duchamp G., Gerard, N. Interfollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biology of reproduction*, **62**: 1335-1343. 2000.
- Bøgh I. B., Bézard J., Duchamp G., Baltsen M., Gérard N., Daels P., Greve T. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes. *Theriogenology*, **57**: 1765-1779. 2002.
- Bruck I., Synnestvedt B., Greve T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH- treated mares. *Theriogenology*, **47**: 1157-1167. 1997.
- Bruck I., Bezard J., Baltsen M., Synnestvedt B., Couty I., Greve T., Duchamp G. Effect of administering of a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation in vivo. *J. Reprod. Fertil.*, **118**: 351-360. 2000.
- Carmo M.T. Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária eqüina. 2007. 214f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade estadual paulista-UNESP-Botucatu. 2007.
- Carnevale E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, **82/83**: 617-624. 2004.
- Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Panzani D., Stokes J.E., Squires E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program fro subfertile mares. *Theriogenology*, **64**: 519-527. 2005.
- 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. *J. Equine Vet. Sci.*, **12**: 104-7. 1992.

- Desvougues A.L, Sharp, D.C. Ovarian tissue remodeling and pre-ovulatory follicle development. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, n. **14**, Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, p. 25, 2004.
- Dippert K.D., Ray B.S., Squires E.L. Aspiration of the dominant follicle in mares and its effect on subsequent follicular development. *Anim. Reprod. Sci.*, **40**: 77-88, 1995.
- Galli C., Olleoni S., Duchi R., Lagutina I., Lazzari G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, **98**: 39-55. 2007.
- Goudet G, Bezárd J, Duchamp G, Gérard N, Palmer E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicular size and hormonal environment. *Biol. Reprod.*, **57**: 232-45. 1997.
- Goudet G., Belin F., Bezard J., Gerard N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol. Reprod.*, **60**: 1120-1127. 1999.
- Grøndahl C., Hyttel P., Grøndahl M.L., Eriksen T., Gotfredsen P., Greve T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol. Rep. Dev.*, **42**: 94-105, 2005.
- Guillou F. and Combarrous Y. Purification of equine gonadotrophins and comparative study of their acid-dissociation and receptor binding specificity. *Biophys. Acta*, **755**: 229-236. 1983.
- Hawley L.R., Enders A.C., Hinrichs, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol. Reprod. Mono.* **1**: 243-252. 1995.
- Kanitz W., Becker F., Alm H., Tamer H. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. *Biol. Reprod. Mono.*, **1**: 225-231. 1995.
- Maclellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Scoggin C.F., Bruemmer J.E., Squires E.L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares, *Theriogenology* **58**: 911-919. 2002.
- Mari G., Barbara M., Eleonora I., Stefano B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Anim. Reprod. Sci.*, **88**: 299-308. 2005.

- Martotiatti, A. and Gérard, N. Interleukin-I (IL-I) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reprod. Biol. and Endocr.*, **1**: 43 2003.
- Meintjes M., Below M.S., Paul J.B., Broussard J.L., Li L.Y., Paccamonti D., Eilts B.E., Godke R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Biol. Reprod. Mono.* **1**: 281-292. 1995.
- Niswender G. D., Juengel J.L., Silva P. J., Rollynson M. K., Mcintush E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, **80**: 1-29. 2000.
- Nogueira M. F. G., Buratini J. Jr, Price C. A, Castilho A. C. S., Pinto M. G. L., Barros C. M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **74**: 680-686. 2007.
- Purcell S. H., Seidel G.E., McCue P. M., Squires E. L. Aspiration of oocytes from transitional, cycling, and pregnant mares. *Anim. Reprod. Sci.*, **100**: 291-300. 2007.
- Riley S.C., Thomassen R., Bae S.E., Leask R., Pedersen H.G., Watson E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. *Anim. Reprod. Sci.*, **81**: 329-339 2004.
- Squires E.L. and Cook N.L. Transvaginal aspiration. *Veterinary clinics of North America: Equine Practice*, **12 (1)**: 13-29. 1996.
- Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszyk A. Apregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, **45**: 306 (Abstr.). 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*, **143**: 4375-4384. 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)