

UFSM

Dissertação de Mestrado

**FERTILIDADE DE ÉGUAS CRIOULAS APÓS
ASPIRAÇÃO FOLICULAR**

Vivian Campos Laia Franco

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**FERTILIDADE DE ÉGUAS CRIOULAS APÓS
ASPIRAÇÃO FOLICULAR**

por

Vivian Campos Laia Franco

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antonio Mondino Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**FERTILIDADE DE ÉGUAS CRIOULAS APÓS
ASPIRAÇÃO FOLICULAR**

elaborada por
VIVIAN CAMPOS LAIA FRANCO

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Antonio Mondino Silva
(Presidente/Orientador)

Adriana Pires Neves

Flávio Desessards de La Corte

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2006

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, Luiz Eduardo e Angelina, e meu irmão Eduardo pelo carinho, amor e amizade durante toda minha vida.

Ao Fabrício Desconsi Mozzaquatro por toda dedicação, colaboração e companheirismo.

A Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin pela dedicação e auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Antonio Mondino Silva pelos ensinamentos e orientação deste trabalho.

Ao Departamento de Patologia Veterinária pelo auxílio no processamento das biópsias realizadas.

Ao Sr. Jorge Martins Bastos pelo acolhimento e apoio oferecido e aos funcionários da Cabanha Santo Angelo por toda ajuda.

Ao Prof. José Henrique Souza da Silva pelo auxílio na análise estatística dos dados deste trabalho.

A toda equipe do Embryolab, pelo companheirismo durante esses dois anos.

A CAPES pelo auxílio financeiro cedido através da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO.....	2
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	3
AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2- CAPÍTULO 1- Fertilidade de éguas Crioulas após aspiração folicular.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e Método.....	21
Resultados e Discussão.....	25
Conclusões.....	31
Referências.....	31
3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito da aspiração folicular durante o estro sobre a fertilidade de éguas Crioulas, na estação reprodutiva de 2004..... 34
- Figura 2.** Fertilidade de éguas Crioulas não aspiradas (controle) e aspiradas durante o diestro, na estação reprodutiva de 2005..... 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Éguas Crioulas cuja ovulação ocorreu no ovário *ipis lateralis* ao folículo dominante aspirado..... 36
- Tabela 2.** Fertilidade de éguas Crioulas após aspiração folicular e média em dias da administração de Prostaglandina $F_2\alpha$ até a próxima ovulação..... 37

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

FERTILIDADE DE ÉGUAS CRIOULAS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR

AUTOR: VIVIAN CAMPOS LAIA FRANCO

ORIENTADOR: CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2006.

A aspiração folicular transvaginal é um método não invasivo de obter oócitos de animais vivos. Devido à quase inexistência de estudos relacionados à técnica, na espécie equina ainda não se conhece bem seus efeitos sobre a fertilidade. Para avaliar o efeito da aspiração folicular sobre a fertilidade de éguas no ciclo subsequente, foram realizados dois experimentos utilizando um ultra-som de 5,0MHz com transdutor setorial. No primeiro experimento, quinze éguas Crioulas serviram como controle e não foram aspiradas e outras quinze foram distribuídas em três grupos, de acordo com o tamanho do folículo aspirado: 25-29mm (n=4; Grupo 1); 30-34mm (n=6; Grupo2) ou ≥ 35 mm (n=5; Grupo 3), todas na fase do estro. No segundo experimento, vinte e cinco éguas foram aspiradas durante o diestro e trinta e uma serviram como éguas-controle, não sendo aspiradas. O número de folículos aspirados por ovário variou de quatro a oito. Todos os folículos visualizados no monitor foram aspirados. A escolha do dia da aspiração foi determinada quando as éguas apresentaram acima de quatro folículos com diâmetro superior à 5mm em cada ovário. No primeiro experimento, as taxas de prenhez foram: 75,0% (Grupo 1), 83,3% (Grupo 2), 60,0% (Grupo 3) e 73,3% (Grupo 4 - Controle). No Experimento II, o grupo de éguas com folículos aspirados apresentou porcentagem de gestação de 76,0% e o grupo controle 77,4%. Nos dois experimentos, a taxa de prenhez das éguas controle e das que foram aspiradas foi similar ($P>0,05$). Esta pesquisa indica que a fertilidade das éguas no primeiro ciclo pós-aspiração não foi afetada pela técnica.

Palavras-chave: fertilidade, equinos, éguas, Crioulo, aspiração folicular.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

FERTILITY OF CRIOLLO MARES AFTER FOLLICULAR ASPIRATION

AUTHOR: VIVIAN CAMPOS LAIA FRANCO

ADVISER: CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA

Santa Maria, February 20, 2006.

Transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration is a non-invasive procedure for oocyte recovery from live animals. In equine medicine there are a few studies about this technique, so there is lack of information. Therefore, to evaluate the effect of follicular aspiration on subsequent fertility in mares, two experiments were conducted using an ultrasound with a setorial probe (5.0MHz). On the first experiment, fifteen Criollo mares were not aspirated and fifteen were assigned to one of three groups according to the diameter of the aspirated follicle: 25-29mm (n=4; Group 1); 30-34mm (n=6; Group 2) or ≥ 35 mm (n=5; Group 3), all of them in oestrus. On the second experiment, the follicular aspiration was performed in twenty five mares during dioestrus and thirty one were used as control mares. The number of follicles aspirated was between 4 and 8 and all visualized follicles were aspirated. Follicle aspiration was performed when at least four follicles (≥ 5 mm) were present on both ovaries. In the Experiment I, the pregnancy rates were 75.0% (Group 1), 83.3% (Group 2), 60.0% (Group 3), and 73.3% (Group 4 - Control). In the Experiment II, pregnancy rates were 76.0% in aspirated group and 77.4% in control group. On both experiments, pregnancy rates were similar in treated and control mares ($P>0.05$). So far the study indicated that next cycle fertility was not affected by the follicular aspiration.

Key-words: fertility, equine, mares, Criollo, follicular aspiration.

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é a principal tecnologia de reprodução assistida utilizada na espécie eqüina (COOK *et al.*, 1993). Com a aplicação dessa técnica, é possível obter produtos de éguas em período de competição e aumentar o número de potros de animais de alto valor genético (SQUIRES *et al.*, 1999).

As maiores limitações da TE são a dificuldade de superovulação e os baixos resultados obtidos com éguas idosas e com endometrite (SQUIRES *et al.*, 1999). Para esses animais, a alternativa seria o uso das novas biotécnicas desenvolvidas: transferência de oócitos, fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), transferência nuclear e clonagem. Embora os procedimentos envolvidos na realização dessas técnicas diferirem muito, há um componente em comum, a obtenção de oócitos viáveis. Experimentalmente, os oócitos são coletados de ovários de frigoríficos, mas para a aplicação clínica, os oócitos devem ser obtidos de animais vivos, utilizando um método seguro, prático e eficiente (VANDERWALLS *et al.*, 2002).

Diferentes técnicas são descritas para a coleta *in vivo* de oócitos: a aspiração folicular com exteriorização do ovário (VOGELSANG *et al.*, 1988), a aspiração folicular transcutânea pelo flanco (McKINNON *et al.*, 1986; PALMER *et al.*, 1987) e a aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (BRÜCK *et al.*, 1992; BRACHER *et al.*, 1993; COOK *et al.*, 1993; DUCHAMP *et al.*, 1995; KANITZ *et al.*, 1995; MEINTJES *et al.*, 1995; MARI *et al.*, 2005). A mais

utilizada ultimamente é a transvaginal guiada por ultra-som, por ser prática e pouco invasiva.

Como os estudos sobre aspiração folicular *in vivo* em éguas ainda são escassos, ainda há dúvidas sobre seus efeitos ou as possíveis alterações provocadas sobre a fertilidade após sua realização.

O objetivo desta pesquisa foi determinar se a aspiração folicular em éguas da raça Crioula afeta a fertilidade no próximo ciclo estral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A técnica de aspiração folicular transcutânea através do flanco com a égua em estação foi descrita pioneiramente por McKinnon (1986) e Palmer (1987). Procedimento semelhante foi descrito por Hinrichs *et al.* (1990) com índices de recuperação de 73,0%. Neste caso, foi adicionada à técnica de aspiração pelo flanco, uma incisão na parede cranial da vagina, a qual permitia ao operador introduzir sua mão na cavidade peritoneal e fixar o ovário diretamente contra o trocáter.

O primeiro grupo de pesquisadores que descreveu a aspiração folicular transvaginal em éguas foi o de Brück *et al.* (1992). Fundamentados na técnica utilizada em programas humanos e bovinos, a equipe aspirou folículos pré-ovulatórios com um transdutor setorial conectado a um aparelho de ultra-som, cujo monitor indicava em sua tela, a linha de punção. Desde então, muitos pesquisadores têm utilizado esta técnica, verificando a influência dos seguintes fatores na taxa de recuperação: estágio do ciclo estral (HINRINCHS *et al.*, 1990; BRACHER *et al.*, 1993; COOK *et al.*, 1993; MEINTJES *et al.*, 1995; MARI *et al.*, 2005), tipo de agulha (BRACHER *et al.*, 1993; COOK *et al.*, 1993; DUCHAMP *et al.*, 1995; MARI *et al.*, 2005) tamanho do folículo aspirado (DUCHAMP *et al.*, 1995; KANITZ *et al.*, 1995) e pressão de vácuo (BRACHER *et al.*, 1993; BRÜCK *et al.*, 1997). Há uma variabilidade muito grande entre os resultados e estes ainda não são satisfatórios.

Embora para grandes animais, a técnica da OPU pareça ser simples, pouco invasiva, repetível e eficiente (BRÜCK *et al.*, 1992; BRACHER *et al.*, 1993; CARNEVALE & GINTHER, 1993; COOK *et al.*, 1993; VANDERWALL *et al.*, 2005), algumas equipes relatam complicações decorrentes desse procedimento. Em 1993, a equipe de Bracher descreveu o efeito de quatro aspirações foliculares em ovários (post-mortem) de uma égua, seis semanas após a última aspiração. O estudo revelou diversas aderências na superfície e pequenas e múltiplas áreas circulares de hemorragia no estroma. Já em 2001, Weber e colaboradores descreveram complicações clínicas em três éguas após a realização de procedimento semelhante (tratamento intraluteal). Eles descreveram sinais clínicos consistentes com infecção ovariana persistente, incluindo massa luteal ecogênica, dor no ovário durante a palpação retal, cólica intermitente, piroxia, perda de peso e adesões entre o ovário afetado e estruturas adjacentes.

Em 2002, Vanderwall *et al.* relataram um caso de severa hemorragia interna após uma sessão de aspiração folicular. A hemorragia ocorreu possivelmente por rompimento da artéria uterina esquerda, causado pela agulha de punção. A eutanásia foi realizada devido ao prognóstico desfavorável. Em vacas, também já foram descritas complicações decorrentes da aspiração folicular. Em 2002, Snel-Oliveira *et al.* observaram lesões histológicas evidenciando o efeito direto da intervenção devido a micro-traumas (fibrose capsular e possível atresia folicular patológica), ou a conseqüências secundárias (atresia folicular conseqüente de uma inibição da ovulação), sugerindo que alterações patológicas quando em grande número, podem alterar a

função ovariana. Em humanos, Bennett *et al.* (1993) relataram dezoito casos de complicações após aspiração folicular guiada por ultra-som. Destes, nove foram infecções graves com formação de abscesso pélvico. Exames microbiológicos sugeriram que a provável rota da infecção foi pela inoculação direta de organismos bacterianos da flora vaginal dentro da cavidade peritoneal pela agulha. Outros autores (TURECK *et al.*, 1993; DICKER *et al.*, 1993) também relataram severas complicações abdominais após procedimentos de recuperação transvaginal de oócitos guiada por ultra-som.

Atualmente, a aspiração folicular é utilizada comercialmente somente para bovinos, porém pode ser um importante aliado na reprodução de éguas subférteis. O custo da tecnologia pode ser justificado pelo valor individual do animal. Esse alto custo se deve principalmente aos equipamentos necessários, que incluem um ultra-som equipado com um transdutor e guia de aspiração, uma bomba de vácuo, uma linha de aspiração e agulha.

A realização de biópsia endometrial e citologia uterina é indicada para garantir que a fertilidade não seja influenciada por patologias uterinas. Na espécie eqüina, a análise histopatológica de biópsias de endométrio é indicada como método auxiliar no prognóstico do futuro reprodutivo. As informações obtidas são de grande importância na avaliação do potencial reprodutivo, portanto indicada no exame ginecológico de qualquer égua não gestante em programa de reprodução assistida. Por meio de uma única biópsia é possível chegar ao diagnóstico preciso das condições uterinas e ao prognóstico quanto à capacidade do endométrio de levar a gestação a termo (SILVA *et al.*,

1987; KENNEY *et al.*, 1990). A biópsia do endométrio é de fácil execução, segura, pode ser realizada pelo veterinário de campo e não afeta as taxas de concepção pós-coleta, desde que medidas adequadas de higiene sejam adotadas (WATSON *et al.*, 1992).

Dependendo do grau de inflamação, fibrose e degeneração glandular presente no endométrio, as éguas são classificadas em três categorias distintas. Na primeira, são agrupadas as éguas que apresentam ausência de alterações endometriais, ou com alterações discretas como infiltração por neutrófilos, discreta ou moderada (endometrite aguda), infiltrado mononuclear discreto local e fibrose periglandular focal discreta. Na categoria II, são agrupadas as éguas com endométrio exibindo alterações mais severas que o grupo anterior, tais como infiltrado mononuclear moderado com ou sem formação de acúmulos linfóides e com presença de algumas lacunas linfáticas; fibrose local moderada, alguns ninhos glandulares e endométrio atrófico não estacional. E na última categoria, estão incluídas aquelas éguas que mostram endométrio com graves alterações, as quais interferem significativamente na fertilidade, tais como infiltrado mononuclear difuso acentuado com formação de acúmulos linfóides e abundantes ninhos glandulares (SILVA *et al.*, 1987).

As infecções uterinas bacterianas são consideradas as maiores causas de falhas reprodutivas nas éguas. Assim sendo, a citologia uterina é uma ferramenta fácil e de rápido diagnóstico, principalmente nas condições práticas do trabalho a campo, através da detecção de neutrófilos (NIELSEN, 2005).

2. CAPÍTULO 1

FERTILIDADE DE ÉGUAS CRIOULAS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR

(Fertility of Criollo mares after follicular aspiration)

FRANCO, V.C. L.¹., MOZZAQUATRO, F.D.¹, COSTA, F.F.^a,
CALEGARI, J.^b, SILVA, C.A.M.², RUBIN, M.I.B.²., DE LA CORTE, F.D.²

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM, RS

² DMV, EMBRYOLAB – Laboratório de Embriologia Animal,
Departamento de Clínica de Grandes Animais, CCR, UFSM, RS

^a Bolsista de iniciação científica BIC/FAPERGS

^b Bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq/UFSM

Submetido ao periódico Journal of Equine Veterinary Science

FERTILIDADE DE ÉGUAS CRIOULAS APÓS ASPIRAÇÃO FOLICULAR

(Fertility of Criollo mares after follicular aspiration)

RESUMO

A aspiração folicular transvaginal é um método não invasivo de obter oócitos de animais vivos. Devido à quase inexistência de estudos relacionados à técnica, na espécie eqüina ainda não se conhece bem seus efeitos sobre a fertilidade. Para avaliar o efeito da aspiração folicular sobre a fertilidade de éguas no ciclo subsequente, foram realizados dois experimentos utilizando um ultra-som de 5,0MHz com transdutor setorial. No primeiro experimento, quinze éguas Crioulas serviram como controle e não foram aspiradas e outras quinze foram distribuídas em três grupos, de acordo com o tamanho do folículo aspirado: 25-29mm (n=4; Grupo 1); 30-34mm (n=6; Grupo 2) ou \geq 35mm (n=5; Grupo 3), todas na fase do estro. No segundo experimento, vinte e cinco éguas foram aspiradas durante o diestro e trinta e uma serviram como éguas-controle, não sendo aspiradas. O número de folículos aspirados por ovário variou de quatro a oito. Todos os folículos visualizados no monitor foram aspirados. A escolha do dia da aspiração foi determinada quando as éguas apresentaram acima de quatro folículos com diâmetro superior à 5mm em cada ovário. No primeiro experimento, as taxas de prenhez foram: 75,0% (Grupo 1), 83,3% (Grupo 2), 60,0% (Grupo 3) e 73,3% (Grupo 4 - Controle). No Experimento II, o grupo de éguas com folículos aspirados apresentou porcentagem de gestação de 76,0% e o grupo

controle 77,4%. Nos dois experimentos, a taxa de prenhez das éguas controle e das que foram aspiradas foi similar ($P>0,05$). Esta pesquisa indica que a fertilidade das éguas no primeiro ciclo pós-aspiração não foi afetada pela técnica.

Palavras-chave: fertilidade, eqüino, éguas, Crioulo, aspiração folicular.

ABSTRACT

Transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration is a non-invasive procedure for oocyte recovery from live animals. In equine medicine there are a few studies about this technique, so there is lack of information. Therefore, to evaluate the effect of follicular aspiration on subsequent fertility in mares, two experiments were conducted using an ultrasound with a setorial probe (5.0MHz). On the first experiment, fifteen Criollo mares were not aspirated and fifteen were assigned to one of three groups according to the diameter of the aspirated follicle: 25-29mm (n=4; Group 1); 30-34mm (n=6; Group 2) or ≥ 35 mm (n=5; Group 3), all of them in oestrus. On the second experiment, the follicular aspiration was performed in twenty five mares during dioestrus and thirty one were used as control mares. The number of follicles aspirated was between 4 and 8 and all visualized follicles were aspirated. Follicle aspiration was performed when at least four follicles (≥ 5 mm) were present on both ovaries. In the Experiment I, the pregnancy rates were 75.0% (Group 1), 83.3% (Group 2), 60.0% (Group 3), and 73.3% (Group 4 - Control). In the Experiment II, pregnancy rates were 76.0% in aspirated group and

77.4% in control group. On both experiments, pregnancy rates were similar ($P>0.05$) in treated and control mares. So far the study indicated that next cycle fertility was not affected by the follicular aspiration.

Key-words: fertility, equine, mares, Criollo, follicular aspiration.

INTRODUÇÃO

Cresce o interesse nas técnicas de reprodução assistida em eqüinos, entre elas a aspiração folicular transvaginal. Com essa técnica é possível coletar oócitos diretamente de folículos de éguas vivas, sendo uma alternativa viável para suprir a necessidade de reprodução de éguas subférteis, com patologias reprodutivas e histórico de insucesso com a TE, ou ainda de éguas em competição. Como o protocolo de fertilização *in vitro* (FIV) para a espécie eqüina ainda não está bem estabelecido, os oócitos recuperados são freqüentemente utilizados para a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) [4].

O primeiro grupo de pesquisadores que descreveu a técnica em éguas foi o de Brück et al (1992)³. Embora a aspiração folicular transvaginal pareça ser simples, pouco invasiva, repetível e eficiente [2-5,17], alguns trabalhos relataram complicações decorrentes desse procedimento em éguas, vacas e em humanos [1,2,6, 14-16,19].

Como os estudos sobre aspiração folicular *in vivo* em éguas ainda são escassos, ainda há dúvidas sobre seus efeitos ou as possíveis alterações provocadas sobre a fertilidade após sua realização.

Com o fato das éguas Crioulas pertencerem a uma raça ainda pouco estudada, a literatura sobre as características fisiológicas e resposta ao procedimento de aspiração é escassa. O porte das éguas é um aspecto que pode influenciar na escolha do momento ideal da realização da técnica. A demanda do mercado tem exercido pressão sobre os criadores da raça Crioula que necessitam melhorar o manejo reprodutivo de seus animais e expandir seu próprio mercado. Essas exigências refletem-se diretamente no desenvolvimento e aplicação das pesquisas nessa raça.

O objetivo deste estudo foi determinar se a aspiração folicular em éguas da raça Crioula afeta a fertilidade no próximo ciclo estral.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

As oitenta e seis éguas da raça Crioula deste estudo foram retiradas aleatoriamente de um rebanho de 200 animais, criados no município de Uruguaiana, RS. As éguas, com idade entre 5 a 22 anos e peso de 350 a 460 Kg apresentaram o trato reprodutivo clinicamente sadio, quando avaliado através de palpação retal e ultra-sonografia. Os animais encontravam-se em piquetes com pastagem nativa, sem suplementação alimentar. Diariamente, seus ovários e útero foram examinados através de palpação retal e ultra-sonografia para controle folicular. As éguas não foram submetidas a rufiação.

Aspiração folicular transvaginal

Para o procedimento de aspiração foram utilizados um ultra-som Pie Medical Falcon 100, equipado com transdutor setorial de 5,0 MHz e guia de aspiração transvaginal; bomba de vácuo (V-MAR-5100, Cook, Austrália); linha de aspiração (V-OPAL-1800, Cook, Austrália) e agulha 40x12, 16 Gauge, com lúmen único. A pressão de aspiração foi regulada para 150mmHg para obter um fluxo médio de 20mL/min.

No tronco de contenção, as éguas foram sedadas com 0,45mg kg⁻¹, IV de Xilazina (Coopazine[®], Schering-Plough, SP-Brasil) seguida de uma anestesia peridural com 4 mL de Cloridrato de Lidocaína 2% dez minutos antes da aspiração. Após o esvaziamento do reto, procedeu-se a limpeza da região perineal com papel toalha. A guia de aspiração foi introduzida manualmente na vagina da égua e posicionada adjacente à cérvix. O ovário a ser aspirado foi manipulado pelo reto possibilitando seu posicionamento contra a superfície serosa da vagina para visualização do folículo e posicionamento na linha de aspiração do monitor. A agulha foi introduzida através da guia de aspiração e o líquido folicular aspirado.

Citologia uterina e biópsia endometrial

A biópsia endometrial e a citologia uterina são métodos alternativos de diagnóstico para verificar a capacidade reprodutiva da égua [13]. Para garantir que a fertilidade após a aspiração folicular não fosse influenciada por patologias uterinas, esses procedimentos foram realizados oito dias após a aspiração. Para a realização dos mesmos, os animais foram mantidos no tronco de contenção efetuando-se a

limpeza da região perineal. Nesse mesmo dia todas, as éguas que tiveram folículo aspirado receberam 1mL de Prostaglandina F_{2α} (Lutalyse[®], Pfizer Saúde Animal, SP-Brasil) por via IM.

Para a citologia, coletou-se secreção uterina com um cotonete acoplado a uma pipeta de Inseminação Artificial (IA) introduzida na cavidade vaginal com auxílio do espécuro de Polanski. Os esfregaços foram efetuados em lâminas de microscopia de acordo com a técnica descrita por Wingfield-Digby¹⁸. A coloração utilizada foi Giemsa-May Grünwald. A contagem das células foi realizada aleatoriamente em dez campos sob microscópio com contraste de fase (aumento de 400x).

As biópsias endometriais foram realizadas com uma pinça de biópsia do tipo Yoman, inserida através da cérvix, com auxílio de um espécuro de Polanski. Os tecidos coletados foram mantidos em 4mL de solução de Bouin por doze horas, e conservados em álcool etílico 50° GL até serem processados. Após o estudo histopatológico das lâminas de biópsia as éguas foram agrupadas em uma das três categorias definidas por Silva et al (1987)¹³, para emissão do prognóstico.

Experimento I

Na estação reprodutiva de 2004, 30 éguas da raça Crioula foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos. Nos três primeiros, as éguas tiveram o folículo dominante aspirado ao alcançarem os seguintes diâmetros: 25-29mm (n=4; Grupo1); 30-34mm (n=6; Grupo 2) e acima de 34mm (n=5; Grupo3). O folículo dominante foi definido

como o maior em crescimento, por dois dias consecutivos, com no mínimo 25mm. Antes da aspiração folicular realizou-se acompanhamento de um ciclo estral de todas as éguas, até a ovulação.

Quatro dias após a aspiração, as éguas foram examinadas para verificar a formação de corpo lúteo (CL) e desenvolvimento folicular. A partir do nono dia após a aspiração, as éguas foram examinadas diariamente para observação do crescimento folicular e identificação do melhor momento para a cobertura. Quando identificada a presença do folículo pré-ovulatório, as éguas foram cobertas a cada 48 horas até a ovulação, com um garanhão de fertilidade conhecida.

As éguas-controle (n=15; Grupo 4) não foram aspiradas, no entanto passaram por avaliação diária para serem cobertas no momento adequado. Identificadas em cio, foram submetidas à avaliação do trato reprodutivo através de exame clínico ginecológico, citologia uterina e biópsia endometrial.

Experimento II

Durante os meses de Setembro a Novembro de 2005, cinquenta e seis éguas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. No primeiro, vinte e cinco éguas tiveram seus folículos aspirados durante o diestro. A escolha do dia da aspiração foi determinada quando as éguas apresentaram acima de quatro folículos com diâmetro superior a 5mm em cada ovário, sendo todos os folículos visíveis, aspirados. O número de folículos aspirados por ovário não foi o mesmo entre as éguas e variou de 4 a 8. A aspiração foi efetuada em ordem crescente de tamanho folicular para facilitar a manipulação dos ovários.

No D1, D4 e D8 (D0=dia da aspiração) as éguas foram examinadas através de palpação retal e ultra-sonografia para a observação dos sinais de aspiração e avaliação da sensibilidade ovariana. A partir do nono dia, passaram a ser examinadas diariamente com o mesmo objetivo do experimento I. No segundo grupo, trinta e uma éguas não foram aspiradas, servindo como controle.

Análise Estatística

Os dados deste estudo foram analisados pelo pacote estatístico SAS [11]. As variáveis comparadas no Experimento I foram: grupos formados de acordo com o tamanho do folículo aspirado em relação à prenhez; tamanho do folículo aspirado em relação ao número de dias da aspiração até a primeira cobertura e tamanho do folículo aspirado em relação à prenhez. Para a análise dessas variáveis foram utilizados os testes: X^2 , correlação de Pearson e ANOVA, respectivamente. No segundo experimento foi utilizado o teste X^2 para analisar as variáveis grupos x prenhez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

Tanto a biópsia endometrial quanto a citologia da secreção uterina serviram para avaliar se a fertilidade das éguas aspiradas (n=15), ou não aspiradas (n=15) foi influenciada por possíveis patologias uterinas. O exame citológico revelou a presença de células inflamatórias (2 a 11 células/10 campos analisados) em apenas cinco

animais. Três dessas éguas, haviam parido há menos de um mês do dia da coleta das amostras uterinas (10,13 e 28 dias). A presença de leucócitos na secreção uterina menos de um mês pós-parto é um achado que, sob determinadas circunstâncias, pode ser considerado fisiológico, e se deve ao processo de involução uterina pós-parto. Todas as cinco éguas conceberam e gestaram, indicando que não apresentavam alteração do trato reprodutivo. Duas éguas do grupo controle foram enquadradas na Categoria II [13], revelando a presença de infiltrado multifocal de linfócitos e plasmócitos no *stratum compactum* e fibrose multifocal moderada. Todas as outras éguas foram classificadas na Categoria I.

No presente experimento, em onze éguas das quinze aspiradas (73,3%), o ovário que apresentou o folículo dominante aspirado, foi também, o mesmo ovário que apresentou a ovulação. Nas quatro éguas que ovularam no ovário contra-lateral à aspiração, os folículos aspirados apresentavam 25, 33, 42 e 43mm de diâmetro, respectivamente. A égua com folículo de 25mm de diâmetro, aspirado no ovário esquerdo, possuía também um folículo de 17mm no ovário direito (folículo que, posteriormente, ovulou). Possivelmente por esta razão, a ovulação ocorreu no ovário não manipulado/aspirado (Tabela 1). Suspeita-se que as outras três éguas que ovularam no ovário contralateral, provavelmente o fizeram pelo fato dos folículos subordinados, presentes no ovário aspirado, já estarem em processo de atresia no momento da aspiração. Ao comparar o desenvolvimento folicular subsequente de éguas aspiradas com éguas não aspiradas (controle), Dippert et al (1995)⁷, observaram que a aspiração do

folículo dominante induz o surgimento de uma onda de desenvolvimento folicular secundária, com o recrutamento e dominância de um folículo subordinado; isso ocorreria caso a aspiração fosse realizada antes do folículo dominante inibir os subordinados.

Neste experimento, o diâmetro médio dos folículos no dia da ovulação foi $41,9 \pm 3,2$ mm, diâmetro ligeiramente superior ao encontrado por Hinrichs et al (1991)⁹, cuja média foi $39,3 \pm 4,2$ mm em animais que pesavam entre 400 e 500Kg. No presente estudo, o diâmetro médio dos folículos aspirados foi $32,6 \pm 5,86$ mm e o tempo médio decorrido entre a aspiração e a próxima ovulação foi $20,0 \pm 7,82$ dias, tempo correspondente a um ciclo estral médio. Resultado semelhante foi descrito por Dippert et al (1995)⁷, cujas éguas ovularam $20,7 \pm 6,1$ dias após a aspiração, quando todos os folículos acima de 15mm de diâmetro foram aspirados.

Todas as éguas aspiradas receberam Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Lutalyse[®]) oito dias após a aspiração, visando a lise do provável corpo lúteo. O tempo médio decorrido entre a administração de $PGF_{2\alpha}$ e a ovulação seguinte (Tabela 2) foi de 15,5 dias (Grupo de 25-29mm); 13,0 (Grupo de 30-34mm) e 8,0 (Grupo acima de 34mm). Pode-se supor, com isso, que houve formação de um corpo lúteo funcional na maioria das éguas, já que o tempo médio decorrido entre a administração da $PGF_{2\alpha}$ e a ocorrência da ovulação ficou muito próximo do referido na literatura para ocorrência de ovulação pós indução de cio com $PGF_{2\alpha}$ em éguas com corpos lúteos cíclicos [12]. A diferença do tempo decorrido entre a administração de $PGF_{2\alpha}$ e a

ovulação entre os grupos de éguas aspiradas, pode ser atribuída a maior luteinização dos folículos de maior diâmetro, considerando que há mais receptores de LH nas células da granulosa desses folículos, como relatado por Goudet et al (1999)⁸.

Nesta pesquisa, somente uma ovulação secundária foi detectada nove dias após a aspiração, diferindo da pesquisa de Hinrichs et al (1991)⁹ que verificaram onze ovulações secundárias três a oito dias após o procedimento. Esta mesma equipe relatou que a aspiração de um provável folículo ovulatório pode afetar o crescimento de folículos secundários através da remoção de fatores inibitórios da foliculogênese.

No presente trabalho, a formação do CL foi avaliada com o auxílio do ultra-som, quatro dias após a aspiração. Constatou-se em todas as éguas a presença de uma estrutura ecogênica completando o espaço antes ocupado pelo folículo aspirado. Morfologicamente, esses prováveis corpos lúteos apresentaram aspecto fisiológico.

Hinrichs et al (1991)⁹ observaram o mesmo comportamento utilizando quatorze éguas com idades entre 6 e 15 anos, onde foi avaliada a formação e a funcionalidade do CL após a aspiração do folículo pré-ovulatório. Nenhuma diferença foi encontrada na duração da liberação e no pico de progesterona entre as éguas aspiradas e controle.

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a última cobertura através de palpação retal e ultra-sonografia. As taxas de prenhez dos quatro grupos (75,0%; 25 a 29mm; 83,3%; 30 a 34mm;

60,0%; $\geq 35\text{mm}$ e 73,3%; Controle) foram similares ($P>0,05$) e são visualizadas na tabela 2 e no gráfico 1.

O tamanho do folículo aspirado e o tempo decorrido entre a aspiração do folículo dominante e o dia da ovulação, também não influenciaram as taxas de prenhez. Pelo que foi possível observar pela ultra-sonografia, também não foram detectadas alterações indicativas de patologia ovariana decorrente do procedimento de aspiração.

Experimento II

O exame citológico revelou ausência de células inflamatórias em todas as éguas, confirmando sua saúde reprodutiva. O exame histopatológico das biópsias endometriais não revelou alterações, sendo todas as éguas classificadas na Categoria I [13].

No presente experimento, o diâmetro médio dos folículos das cinquenta e seis éguas, no dia da ovulação, foi $46,11 \pm 4,30$. Esse valor foi superior ao encontrado no experimento I (éguas Crioulas) e no trabalho de Hinrinchs et al (1991)⁹ com éguas mestiças. O tempo médio decorrido da aspiração folicular até a ovulação foi semelhante ($19,83 \pm 6,95$ dias) ao verificado no Experimento I ($20,0 \pm 7,82$ dias) e ao relatado ($20,7 \pm 6,1$ dias) pela equipe de Dippert (1995)⁷.

As aspirações foliculares realizadas no diestro (Experimento II) foram mais traumáticas do que as realizadas no estro (Experimento I). Algumas éguas demonstraram desconforto durante o procedimento. Houve presença de sangue quando maior número de folículos foi aspirado, corroborando os achados de Cook et al (1993)⁵, cujas aspirações durante o diestro foram mais demoradas e seguidas de

desconforto. Isso se deve, possivelmente, ao fato dos folículos de menor diâmetro geralmente se posicionarem mais profundamente no ovário, requerendo maior penetração do estroma.

No D1 e D4 (D0=dia da aspiração) observou-se sensibilidade ovariana em sete éguas. Este fato dificultou o exame do trato reprodutivo. Duas éguas que tiveram seus folículos aspirados apresentaram complicações decorrentes do procedimento. Uma delas, a partir de D4, apresentou dor à palpação retal e síndrome febre com emagrecimento progressivo. Na cavidade abdominal detectou-se, através do ultra-som, a presença de uma massa trabeculada repleta de líquido. A égua faleceu devido a um abscesso localizado próximo ao útero. Esse fato ocorreu, possivelmente, devido à introdução de bactérias durante a penetração da agulha pela superfície mucosa não estéril do vestibulo. Complicação semelhante foi descrita por Weber et al (2001)¹⁹, onde três éguas apresentaram sintomatologia similar e uma delas necessitou ser eutanasiada por não responder à medicação.

No presente estudo, a segunda égua que desenvolveu problema decorrente da aspiração apresentou sensibilidade ovariana no ovário direito. A partir do dia seguinte à aspiração a imagem ultrasonográfica revelou hematoma ovariano. Esse animal passou por acompanhamento ultra-sonográfico diário e em vinte dias o hematoma regrediu totalmente.

Neste experimento, a fertilidade do ciclo subsequente à aspiração folicular também não foi afetada. O grupo das éguas aspiradas apresentou índice de gestação de 76% (n=25) e o grupo controle de 77,4% (n=31), não havendo diferença entre os mesmos (Gráfico 2).

Considerando as características fisiológicas específicas da raça Crioula, unidade experimental desta pesquisa, a taxa de prenhez encontrada foi similar aos 70% (n=10) relatado por Mari et al (1995)¹⁰, com éguas Standardbred, aspiradas e inseminadas no ciclo subsequente. No mesmo ano, a equipe de Vanderwall¹⁷, estudando o efeito de repetidas sessões de aspiração em éguas mestiças, obteve percentuais de gestação (90%, 81% e 85%) semelhantes ao presente experimento, quando a técnica foi realizada de 1 a 2; de 3 a 4 e de 5 a 11 vezes, respectivamente.

CONCLUSÕES

As lesões ovarianas causadas pela agulha não afetam a função ovariana no ciclo subsequente, mesmo que o ovário que chega a ovulação seja o mesmo anteriormente aspirado.

A técnica de aspiração folicular *in vivo*, apesar de não interferir diretamente na fertilidade, deve ser executada com cautela devido ao risco de complicações pós-aspiração. Em éguas subférteis ou idosas, esse risco implica em menor preocupação, pois o fato de já possuírem o trato genital comprometido, o procedimento de aspiração folicular seria, possivelmente, a única opção de reprodução desses animais.

REFERÊNCIAS

1. Bennett SJ, Waterstone JJ, Cheng WC, Parsons J. Complications of transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration: a review of 2670 consecutive procedures. J of Reprod and Genetics 1993;10:72-77.

2. Bracher V, Parlevliet J, Fazeli AR, Pieterse MC, Vos PLAM, Dieleman SJ, Taverne MAM, Colenbrander B. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare. *Equine Vet J* 1993;15(Suppl):75-78.
3. Brück I, Raun K, Synnestvedt B, Greve T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound - guided technique. *Equine Vet J* 1992;24:58-59.
4. Carnevale EM, Ginther OJ. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer oocytes in the mare. *J of Equine Vet Sci* 1993;13:331-333.
5. Cook NL, Squires EL, Jasko DJ. Repeated transvaginal follicular aspiration in cyclic mares. *Theriogenology* 1993;39(Abstr):204.
6. Dicker D, Ashkenazi J, Feldberg D, Levy T, Dekel A, Ben-Rafael Z. Severe abdominal complications after transvaginal ultrasonographically guided retrieval of oocytes for *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil and Steril* 1993;59:1313-1315.
7. Dippert KD, Ray BS, Squires EL. Aspiration of the dominant follicle in mares and its effect on subsequent follicular development. *Anim Reprod Sci* 1995;40:77-88.
8. Goudet G, Belin F, Bézard J, Gérard 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* 1999;60:1120-1127.
9. Hinrichs K, Rand WM, Palmer E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. *Biol Reprod* 1991;44:292-298.
10. Mari G, Barbara M, Eleonora I, Stefano B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Anim Reprod Sci* 2005;88:299-308.
11. SAS: Statistical Analysis User's guide, (Version 6.12). Cary, NC: SAS Inst Inc 1998.

12. Silva CAM, Klug E, Martin J. Manipulation of mare's estral cycle with $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogous. *Rev Turf Fomento* 1979;19:488-489.
13. Silva CAM, Barros,SS, Esquerre RA, Silva JHS. Endometrial biopsy in the evaluation of fertility in the mare. *Pesq Vet Bras.* 1987;7:131-133.
14. Snel-Oliveira MV, Tury E, Pereira DC, Malagoli JrD, Nascimento NV, Santos ES, Rumpf R. Histopathological ovum pick-up (OPU) in Nelore prepubertal calves. *Theriogenology* 2002;57(Abstr):687.
15. Tureck RW, Garcia CR, Blasco L, Mastroianni LJr. Perioperative complications arising after transvaginal oocyte retrieval. *Obstet Gynecol* 1993;81:590-593.
16. Vanderwall DK & Woods GL. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal intrasound-guided follicle aspiration in a mare. *J of Equine Vet Sci* 2002;22:84-86.
17. Vanderwall DK, Hyde KJ, Woods GL. Effect of repeated performance of transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration on subsequent fertility in reproductively sound mares. *Theriogenology* 2005;64(Abstr):785.
18. Wingfield-Digby NJ. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. *Equine Vet J* 1978;4:167.
19. Weber JA, Causey RC, Emmans EE. Induction of luteolysis in mares by ultrasound-guided intraluteal treatment with $\text{PGF}_{2\alpha}$. *Theriogenology* 2001;55:1769-1776.

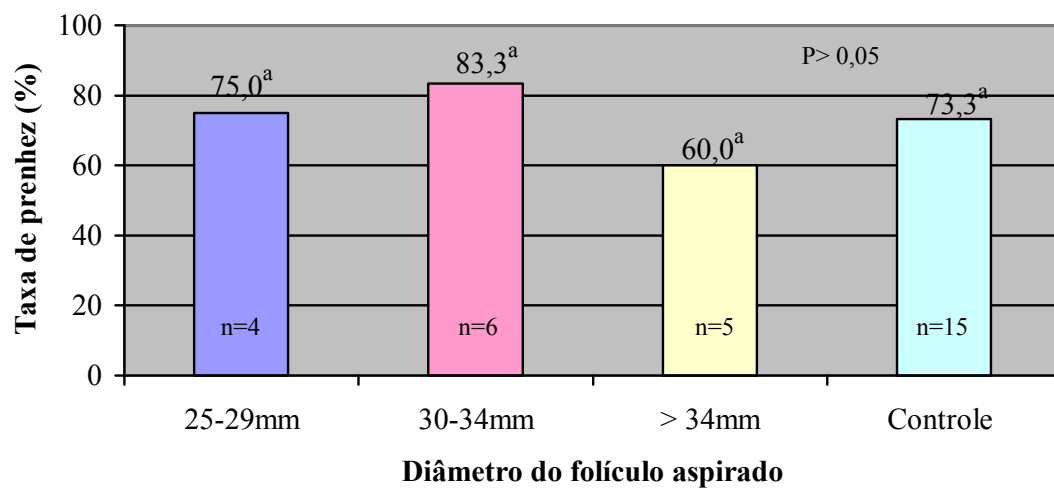


Figura 1. Efeito da aspiração folicular durante o estro sobre a fertilidade de éguas Crioulas, na estação reprodutiva de 2004.

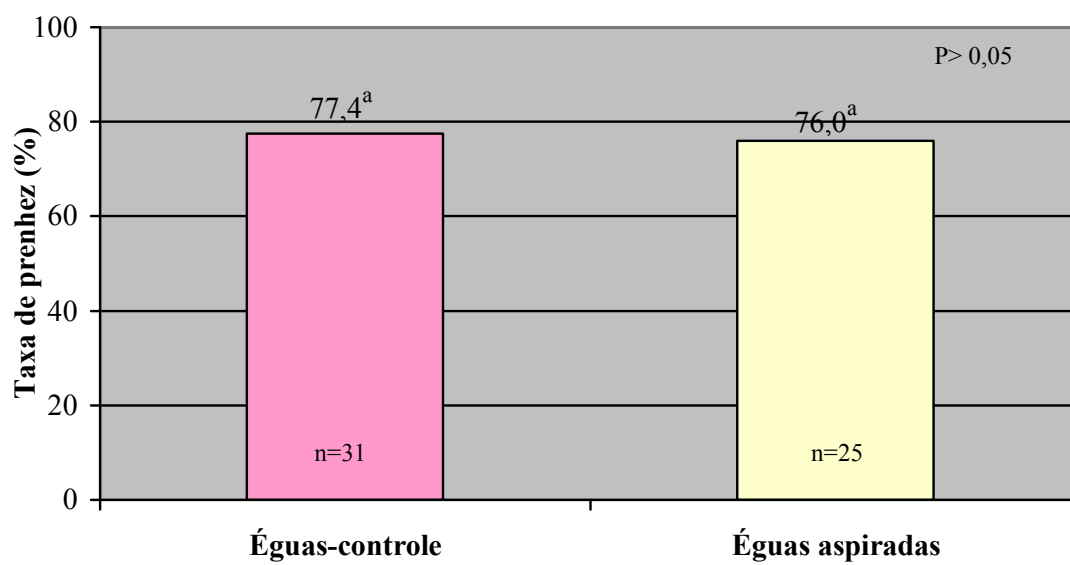


Figura 2. Fertilidade de éguas Crioulas não aspiradas (controle) e aspiradas durante o diestro, na estação reprodutiva de 2005.

Tabela 1. Éguas Crioulas cuja ovulação ocorreu no ovário *ipsis lateralis* ao folículo dominante aspirado.

Diâmetro dos folículos aspirados	Lado do folículo aspirado = Lado do folículo ovulado (%)
25 a 29mm (Grupo 1)*	3/4 (75,0)
30 a 34mm (Grupo 2)	5/6 (83,3)
≥ 35mm (Grupo 3)	3/5 (60,0)

*Uma égua deste grupo possuía um folículo de 17mm no ovário oposto ao aspirado, sendo este o que ovulou.

Tabela 2. Fertilidade de éguas Crioulas após aspiração folicular e média em dias da administração de Prostaglandina F₂ α (1mL, Lutalyse[®]) até a próxima ovulação.

Diâmetro dos folículos aspirados	Média em dias até a ovulação	Taxa de prenhez n (%)
25 a 29mm	15,5	3/4 (75,0) ^a
30 a 34mm (Grupo 2)	13,0	5/6 (83,3) ^a
≥ 35mm (Grupo 3)	8,0	3/5 (60,0) ^a
Controle (não aspirado)	-	11/15 (73,3) ^a

^aTaxa de prenhez entre os grupos não foi significativa (P>0,05).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENNETT, S.J., et al. Complications of transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration: a review of 2670 consecutive procedures. **Journal of Reproduction and Genetics**, v.10, n.1, p.72-77, 1993.

BRACHER, V., et al. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare. **Equine Veterinary Journal** (Suppl.), v.15, p.75-78, 1993.

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

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

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer oocytes in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, n.6, p.331-333, 1993.

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

DICKER, D., et al. Severe abdominal complications after transvaginal ultrasonographically guided retrieval of oocytes for *in vitro* fertilization and embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v.59, n.6, p.1313-1315, 1993.

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

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

KANITZ, W., et al. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biology of Reproduction**, v.1, p.255-231, 1995.

KENNEY, R.M. Aspiration of oocyte from mature and immature preovulatory follicles. **Theriogenology**, v.34, p.107-112, 1990.

MARI, G., et al. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v.88, n.3-4, p.299-308, 2005.

McKINNON, A.O., et al. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. **Equine Veterinary Science**, v.6, p.306-309, 1986.

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

NIELSEN, J.M. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v.64, p.510-518, 2005.

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

SILVA, C.A.M, et al. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.4, p.131-133, 1987.

SNEL-OLIVEIRA, M.V., et al. Histopathological ovum pick-up (OPU) in Nelore prepubertal calves. **Theriogenology**, v.57, p.687, 2002 (Abstract).

SQUIRES, E.L., McCUE, P.M., VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.91-104, 1999.

TURECK, R.W., et al. Perioperative complications arising after transvaginal oocyte retrieval. **Obstetric Gynecology**, v.81, n.4, p.590-593, 1993.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.22, n.2, p.84-86, 2002.

VANDERWALL, D.K., HYDE, K.J., WOODS, G.L. Effect of repeated performance of transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration on subsequent fertility in reproductively sound mares. **Theriogenology**, v.64, p.785, 2005 (Abstract).

VOGELSANG, M.M., KREIDER, J.L., BOWEN, M.J. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v.29, p.1007-1018.

WATSON, E.D., SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.201, p.438-440, 1992.

WEBER, J.A., CAUSEY, R.C., EMMANS, E.E. Induction of luteolysis in mares by ultrasound-guided intraluteal treatment with PGF₂ α . **Theriogenology**, v.55, p.1769-1776, 2001.