

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR NA ÉGUA PARA
INDUÇÃO DA FUNÇÃO LÚTEA**

TESE DE DOUTORADO

Fabício Desconsi Mozzaquatro

Santa Maria, RS, Brasil

2008

ASPIRAÇÃO FOLICULAR NA ÉGUA PARA INDUÇÃO DA FUNÇÃO LÚTEA

por

Fabrício Desconsi Mozzaquatro

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof^a. Mara Iolanda Batistella Rubin
Co-orientador: Prof. Carlos Antonio Mondino Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2008

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

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova Tese de Doutorado

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR NA ÉGUA PARA
INDUÇÃO DA FUNÇÃO LÚTEA**

elaborada por

Fabício Desconsi Mozzaquatro

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mara Iolanda Batistlla Rubin, Dra.
(Presidente/Orientador)

Carlos Antônio Mondino Silva, Dr. (UFMS)

Rodrigo Costa Mattos, Dr. (UFRGS)

Flávio Desessards de La Corte, PhD (UFMS)

Sérgio da Silva Fialho, Dr. (UFMS)

Santa Maria, 18 de junho de 2008.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre guiou meus passos me dando força, coragem e perseverança para vencer os obstáculos enfrentados.

Aos meus pais, Gilberto e Vera, e minha irmã Carol pelo carinho, amor e amizade dispensados a mim em todas as etapas de minha vida. Eles sempre estiveram presentes me apoiando, incentivando e torcendo pelo meu êxito. Não mediram esforços para que eu pudesse realizar este sonho. Esta conquista é dedicada a eles.

À Vivian por toda dedicação, carinho, companheirismo e imensurável ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Mara Rubin pela incansável busca do conhecimento, sempre disposta a orientar-me e aconselhar-me.

Ao Prof. Dr. Carlos Antônio Mondino Silva pelos conselhos e ensinamentos e por acreditar em mim e no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio De La Corte, Prof^a. Dr^a Karen Brass e a todos os professores do PPGMV pelos valorosos ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Henrique Souza da Silva pelo imenso auxílio na conclusão deste trabalho.

À Estância Itapitocai, Cabanha Santo Ângelo e Brigada Militar de Santa Maria pela calorosa acolhida e empréstimo dos animais necessários para a realização dos experimentos.

À empresa Hertape-Calier pelo fornecimento dos hormônios utilizados neste trabalho.

Aos Méd. Vet. Marcelo Napoleão, Fernando Vello e Carlos Krebs e aos funcionários da Estância Itapitocai, Cabanha Santo Ângelo e setor de veterinária da Brigada Militar de Santa Maria pela acolhida e imensurável apoio para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo ao longo do curso.

Aos atuais colegas do Embryolab e também àqueles que já concluíram suas atividades no laboratório, agradeço pela troca de experiências e companheirismo.

"Cada minuto de nossa vida
deve ser vivido e aproveitado ao máximo
de forma única e consciente,
pois o tempo não pára,
as coisas mudam e o momento atual
nunca será igual ao anterior. "

(Autor desconhecido)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ASPIRAÇÃO FOLICULAR NA ÉGUA PARA INDUÇÃO DA FUNÇÃO LÚTEA

AUTOR: FABRÍCIO DESCONSI MOZZAQUATRO
ORIENTADORA: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN
CO-ORIENTADOR: CARLOS ANTÔNIO MONDINO SILVA
Santa Maria, 18 de junho de 2008.

A aspiração folicular tem sido aplicada na pesquisa com diferentes finalidades. Atualmente a técnica está sendo utilizada para conhecer a natureza da dinâmica e emergência da onda folicular e sincronização da ovulação entre os animais. Nesta pesquisa a técnica foi empregada para identificar o grupo folicular que resulta em melhores índices de luteinização e para avaliar a formação estrutural e funcional do *Corpus luteum* (CL). Para isto foram conduzidos dois experimentos. No experimento I as éguas mestiças foram distribuídas em grupos conforme o diâmetro folicular (\emptyset) aspirado: 25-29mm (n=10); 30-35mm (n=14) e >35mm (n=17). Éguas com ovulação natural serviram como Controle (n=18). A produção de progesterona (P_4) das éguas com a ovulação natural foi maior ($P<0,0001$) quando comparada as éguas aspiradas. A análise de regressão linear estabeleceu que a concentração de P_4 diminuiu 0,365ng/mL/dia ($P=0,0065$) do dia da aspiração (D0) até D8 no grupo de éguas aspiradas com diâmetro folicular entre 25-29mm. No entanto, a P_4 aumentou 0,258ng/mL/dia ($P=0,001$) nas éguas com diâmetro folicular entre 30-35mm; 0,481ng/mL/dia ($P<0,0001$) nas éguas com folículos >35mm e 1,236ng/mL/dia ($P<0,0001$) nas éguas com ovulação natural. Das 25 éguas aspiradas que luteinizaram ($P_4>1$ ng/mL), em 23 (92%) a concentração sérica de P_4 foi >2ng/mL. Destas, 75% (3/4), 90% (9/10) e 100% (11/11) das éguas, pertenciam aos grupos com diâmetro folicular de 25-29mm, 30-35mm, >35mm, respectivamente. No Experimento II (n=26), comparou-se a aparência ultra-sonográfica do *Corpus luteum* com a produção de P_4 sérica. Para isto um critério de avaliação subjetivo foi

elaborado para definir a forma, a aparência e a ecogenicidade do *Corpus luteum*: CL 1 – *Corpus luteum* não visualizado após aspiração; CL 2 – aparência de estrutura lútea formada, porém pouco evidente e com baixa ecogenicidade; CL 3 – Imagem compatível com *Corpus luteum*, aparência de estrutura lútea formada e com evidente ecogenicidade. A taxa de luteinização ($P > 0,05$) dos folículos aspirados foi de 57,14% (4/7; Ø entre 25-30mm), 75% (6/8; Ø entre 30-35mm) e 72,73% (8/11; Ø > 35mm). Os critérios ecográficos aqui definidos corresponderam significativamente ($P < 0,0001$) aos teores séricos de P_4 produzidos. Das 18 éguas aspiradas que apresentaram luteinização (n=26) confirmada pela avaliação sérica ($P_4 > 1\text{ng/mL}$), 94,44% (n = 17) apresentaram aparência de corpo lúteo de acordo com o critério ecográfico estabelecido ($P = 0,0372$). Destas, em 16 animais a concentração sérica de P_4 foi superior a 2ng/mL no dia 8 pós-aspiração. A concentração sérica de P_4 foi compatível em 100% (n=15; $P = 0,0056$) dos CL avaliados visualmente como escore 3, sendo superior a 2ng/mL em 93,33% (14/15) das éguas (Experimento II). Estes resultados sugerem que um *Corpus luteum* funcional pode ser induzido em éguas pela técnica de aspiração. No entanto, para que a produção de progesterona seja compatível com a de um *Corpus luteum* produzido através de ovulação natural é necessário que o folículo a ser aspirado tenha no mínimo 35mm de diâmetro. O escore ecográfico atribuído apresentou-se como um método de seleção prático e eficaz para estimar a luteinização e foi adequado para o preparo de éguas receptoras para transferência de embriões.

Palavras-chave: éguas, progesterona, *Corpus luteum*, ultra-sonografia, sincronização.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
Seleção doadora e receptora.....	13
Coleta de embriões.....	14
Sincronização doadora/receptora.....	15
Importância da P ₄ na manutenção inicial da gestação.....	17
Aspiração Folicular.....	19
Indução CL pela aspiração folicular.....	20
Indução da função lútea na égua pela aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som.....	25
Delineamento experimental	26
Características ecográfica do <i>Corpus luteum</i> após aspiração folicular em éguas	27
Delineamento experimental.....	28
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

INTRODUÇÃO

O uso da transferência de embriões (TE) e o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida em eqüinos têm aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas (ALLEN, 2005; COLLEONI et al., 2007).

A transferência de embriões é a principal biotecnologia utilizada na criação de cavalos. Esta técnica é utilizada para produção de potros durante competições, para aumentar o número de produtos nascidos de éguas de alto valor genético, para criopreservação de embriões e recuperação reprodutiva de éguas inférteis. Os fatores que limitam a aplicação da transferência de embriões incluem protocolos ineficazes de superovulação, a alta sensibilidade dos embriões à criopreservação e baixos resultados em éguas com idade avançada e com endometrite (CARNEVALE; GINTHER, 1992; BALL, 1993; SQUIRES et al., 2003; CARNEVALE et al., 2000).

Em um programa de TE comercial é importante o desenvolvimento de técnicas que melhorem as taxas de recuperação de embriões, diminuam o tempo e os custos envolvidos nos procedimentos de coleta e transferência de embriões eqüinos.

Os componentes primários de um programa de transferência de embriões incluem a doadora, receptora, o embrião e a técnica de coleta e inovulação de embriões utilizada. As taxas de prenhez nos programas de TE são influenciadas pela variabilidade entre estes componentes, tais como o método de transferência, o tamanho, a idade e a morfologia do embrião, a estação do ano, a sincronia entre doadora e receptora, os procedimentos de cultivo, a estocagem de embriões e o histórico reprodutivo associado com a idade da doadora de embriões (SQUIRES et al., 1982a; SQUIRES et al., 1982b; CARNEY et al., 1991).

Embora a coleta e transferência de embriões seja uma tecnologia comumente utilizada em eqüinos, outras técnicas tais como, superovulação, criopreservação de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), transferência de oócitos, transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e aspiração folicular, podem ser utilizadas, porém os resultados ainda necessitam ser melhorados.

Várias equipes que utilizam a técnica de aspiração folicular (HINRICHS et al., 1991; BRACHER et al., 1993; GOUDET et al., 1997; MEINTJES et al., 1997; BOGH et al., 2000; HAYNA et al., 2004) sugerem que tecido luteal pode ser formado após o procedimento de aspiração, entretanto ainda é necessário identificar qual categoria

de folículos, após aspiração, pode sofrer formação lútea com produção satisfatória de progesterona (P_4).

As pesquisas com aspiração folicular conduzidas até o momento são contraditórias e algumas ainda devem ser corroboradas. Embora muitos trabalhos relatem que a aspiração de folículos dominantes em éguas possa promover a formação de um CL morfo e biologicamente ativo, ainda persistem muitas dúvidas sobre o processo de luteinização pós-aspiração. Necessita-se estabelecer qual categoria folicular e qual estágio do ciclo estral é o mais indicado para que o processo de luteinização ocorra. Porque folículos de um mesmo diâmetro folicular apresentam luteinização e produção de P_4 tão distintas? Supõe-se que a quantidade de progesterona produzida por estes folículos aspirados poderia manter uma gestação, mas ainda nenhum protocolo de TE foi desenvolvido onde a receptora de embriões seja sincronizada por aspiração folicular e tenha como única fonte de progesterona a estrutura folicular aspirada.

Este estudo teve como objetivos:

1. Definir qual categoria folicular poderia fornecer um CL funcional e apresentar melhores índices de luteinização quando submetidos ao procedimento de aspiração folicular;
2. Estabelecer quais características ultra-sonográficas podem ser vinculadas ao folículo pós-aspiração;
3. Definir a curva de produção de progesterona para cada categoria folicular aspirada.

REVISÃO DE LITERATURA

Seleção da doadora e receptora

Para que um programa de coleta e transferência de embriões tenha êxito, o primeiro passo a ser realizado é a avaliação da égua doadora de embriões. O exame ginecológico completo da égua doadora é indicado para avaliar a viabilidade de seu uso em um programa de TE. Se anormalidades como endometrite bacteriana forem identificadas, e justifiquem o tratamento com antibioticoterapia, o mesmo deverá ser realizado antes de o programa ser iniciado. O manejo de cobertura da doadora envolve a rufiação para monitorar o comportamento reprodutivo e o uso do exame uterino e ovariano por palpação e ultra-sonografia transretal para monitorar a atividade folicular ovariana no ciclo estral. Quando em cio, a doadora é examinada diariamente para monitorar o crescimento folicular, para predizer o momento mais adequado da IA.

A incidência de morte embrionária é um importante fator que diminui o desempenho reprodutivo na égua e o sucesso na transferência de embriões. Embora doenças endometriais sejam geralmente consideradas como a maior causa de mortalidade embrionária em éguas, fatores maternos, externos e embrionários também são responsáveis por estas perdas. Estes fatores incluem idade da doadora, condição corporal e nutricional, ganhão, anormalidades cromossômicas, deficiências hormonais, estresse, fatores imunes e falhas no reconhecimento materno da gestação (BALL, 1993; CARNEVALE et al., 2000).

O apropriado manejo e seleção das éguas receptoras também são fatores que interferem no sucesso de um programa de transferência de embriões eqüinos. Os critérios de seleção das éguas incluem peso (400 a 550 kg), idade (3 a 10 anos), posição vulvar vertical adequada e glândula mamária funcional. As receptoras necessitam ter um ciclo estral regular e serem livres de alterações uterinas e ovarianas tais como líquido uterino, cistos uterinos, ar e debris no útero, tumores ovarianos ou outras patologias ovarianas (SQUIRES et al., 1999). Além disso, resultados de vários estudos indicam que a fertilidade na égua diminui com o aumento da idade (CARNEVALE; GINTHER, 1992; BALL, 1993). Isto sugere que a idade é uma importante consideração na seleção das éguas receptoras.

Em um estudo retrospectivo realizado por Carnevale et al. (2000), ficou evidenciado que o tônus cervical e uterino são fatores que devem ser criteriosamente avaliados na seleção de receptoras. Na referida pesquisa, as receptoras foram examinadas 4 ou 5 dias pós-ovulação, com auxílio da ultrasonografia, para verificar a presença de *Corpus luteum*, das dobras endometriais e ausência de líquido uterino. Adicionalmente, o trato reprodutivo foi avaliado através de palpação retal para verificar o tônus cervical e uterino. As receptoras foram classificadas como “aceitáveis” quando apresentaram um CL bem definido e tônus cervical e uterino bom para excelente. As mesmas foram consideradas como “marginalmente aceitáveis” quando apresentaram imagem de CL pouco evidente e tônus uterino fraco para regular. Éguas com tônus excelente resultaram em maiores taxas de prenhez quando comparadas com as receptoras com tônus cervical e uterino marginal. As concentrações de P₄ circulantes foram maiores em éguas que foram classificadas como boas receptoras do que aquelas que falharam (CARNEVALE et al., 2000). Além disso, baixas concentrações circulantes de P₄ parecem estar relacionadas com reduzido tônus cervical e uterino (McCUE et al., 1999).

Coleta de embriões

O procedimento de recuperação de embriões foi descrito mundialmente por várias equipes (DAVIES et al., 1985; HINRICHS et al., 1985; FLEURY; ALVARENGA, 1999; JASKO, 2002) e permanece relativamente inalterado nos últimos 15 anos. Durante o cio, as mudanças no útero e o desenvolvimento folicular no ovário são monitorados diariamente por ultra-sonografia. As éguas geralmente são inseminadas com sêmen fresco, resfriado ou congelado. A recuperação dos embriões é usualmente programada para 7, 8 ou 9 dias após a ovulação (D0). O procedimento de recuperação de embriões consiste em introduzir o catéter através da cérvix até o corpo uterino, inflar o balão fixando-o e efetuar repetidas lavagens do útero com solução salina fosfatada (PBS) ou Ringer lactato (FLEURY, 1991)¹. O líquido é recuperado em filtro coletor com capacidade para 150mL (Millipore®) e seu conteúdo é transferido para uma placa de Petri 100x15mm para identificação e avaliação das estruturas recuperadas.

¹ Comunicação pessoal ao Dr. Carlos Antônio Mondino Silva.

A taxa de recuperação de embriões pode ser afetada pelo dia da coleta, número de ovulações, idade da égua doadora e qualidade do sêmen. A média de recuperação de embriões por ciclo para éguas com ovulação simples em programas de TE é bastante variável dependendo da equipe que esta trabalhando e é de aproximadamente 50% (FLEURY; ALVARENGA, 1999; FOSS et al., 1999; VANDERWALL, 2000; FOSS; CRANE, 2004; HUDSON; McCUE, 2004). Ainda, o sucesso da transferência não-cirúrgica de embriões eqüinos é dependente de muitos fatores. As taxas de prenhez podem ser afetadas pela experiência do técnico, método de transferência, sincronia da receptora com a doadora, qualidade do embrião e pelo manejo e saúde reprodutiva tanto da doadora quanto da receptora (FLEURY; ALVARENGA, 1999; FOSS et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; VANDERWALL, 2000; FOSS; CRANE, 2004).

Sincronização doadora/receptora

A sincronização da ovulação entre doadora e receptora é fundamental para o sucesso da TE. As pesquisas desenvolvidas até o momento indicam que uma égua para servir como receptora pode ovular um dia antes, no mesmo dia, ou até três dias após a égua doadora (OGURI; TSUTSUMI, 1974; IMEL et al., 1981; VOGELSANG et al., 1985; SQUIRES et al., 2003).

Várias associações de esteróides (progestágenos e estrógenos), $\text{PGF}_{2\alpha}$, hCG e GnRH têm sido usados para controlar o desenvolvimento folicular e o tempo da ovulação durante o período de transição, ciclo estral e período pós-parto nas éguas (HINRICHS et al., 1985; McKINNON et al., 1988; POOL-ANDERSON et al., 1988; LAGNEAUX; PALMER, 1993; VANDERWALL et al., 2003; ROCHA FILHO et al., 2004; RAZ et al., 2005; KANITZ et al., 2007; VANDERWALL et al., 2007). Os objetivos destes protocolos são coordenar o tempo esperado de ovulação com inseminação e aproximar a ovulação na égua receptora com a égua doadora para transferência de embriões. Os protocolos mais utilizados são aqueles que contêm progestágenos e $\text{PGF}_{2\alpha}$. Estes hormônios são usados associados ou não, porém têm limitado controle no desenvolvimento folicular, sendo comumente usados para inibir ou retardar a ovulação (McKINNON; VOSS, 1993; BERGFELT, 1999).

Prostaglandinas e seus análogos, quando administradas, são valiosas ferramentas para indução da regressão do CL e subsequente retorno ao cio. As prostaglandinas são efetivas somente quando um CL maduro esta presente e a

égua retorna ao cio 1 a 3 dias mais tarde. Este intervalo na resposta da $PGF_{2\alpha}$ é um problema quando a ovulação da receptora e doadora necessita ser sincronizada para TE (RAZ et al., 2005; BERGFELT et al., 2006).

A utilização de protocolos eficazes com progestágenos, para sincronização de receptoras de embriões em programas comerciais são extremamente importantes. Receptoras tratadas hormonalmente não necessitam ser rufiadas e nem ter a ovulação sincronizada com a doadora, requerendo assim menor manejo.

Hinrichs et al. (1985) propuseram um protocolo de sincronização para receptoras administrando 300mg de P_4 diariamente, durante 5 dias antes da TE. Com isso, foram obtidas 3 gestações das 7 éguas inovuladas. Em um estudo subsequente (HINRICHIS et al., 1986) com éguas ovariectomizadas, outros protocolos de sincronização foram testados com 22mg de altrenogest / 5 dias, p.o.; 66mg altrenogest / 6 dias p.o.; ou 300mg de P_4 injetável / 5 dias antes da TE. Receptoras intactas foram sincronizadas e serviram de controle. As taxas de prenhez obtidas foram 1/6, 2/6, 2/5 e 13/19, respectivamente. Contudo, McKinnon et al. (1988) obtiveram taxas de prenhez semelhantes em éguas intactas ou ovariectomizadas quando utilizaram protocolo com 300mg P_4 .

A maioria das receptoras utilizadas em programas de TE são éguas não castradas, todavia éguas ovariectomizadas, bem como éguas acíclicas tratadas com progesterona exógena, podem ser utilizadas como receptoras de embriões. LAGNEAUX; PALMER (1993) verificaram significativa desvantagem no uso de éguas receptoras ovariectomizadas quando as compararam com éguas em anestro. Tais desvantagens referem-se a cirurgia irreversível (com riscos associados), realizada pelo menos 3 semanas antes de serem usadas como receptoras. Além disso, nas éguas em anestro, ainda é possível reduzir o período do tratamento com altrenogest sem prejuízo nas taxas de prenhez (LAGNEAUX; PALMER, 1993), enquanto que nas éguas ovariectomizadas este tratamento deve ser contínuo até o 100º dia de gestação (McKINNON et al., 1988).

Carnevale et al. (2000) comparando receptoras cíclicas e transitórias tratadas com altrenogest (0,044mg/Kg, p.o.; 5 a 7 dias antes da TE; n=18) não observaram diferença entre as taxas de prenhez e mortalidade embrionária (67,8 vs 55,6% e 14,5 vs 30%, respectivamente).

Diferentes preparações de P_4 são oferecidas comercialmente e administradas em eqüinos. McKinnon et al. (2000) compararam a habilidade de diferentes

progestágenos (Medroxyprogesterone, hydroxyprogesterone hexanoate, altrenogest, norgestomed e megestrol acetate) em manter a prenhez em éguas após a indução da luteólise (dia 18 do ciclo). As éguas que receberam altrenogest permaneceram prenhes e todas as éguas que receberam os outros progestágenos perderam suas gestações 2 a 8 dias depois da administração de PGF_{2α}.

Bringel et al. (2003) relataram que a concentração circulante de progesterona foi compatível com os níveis da fase lútea após a aplicação de 1500mg de P₄LA a cada 7 dias em éguas com nenhuma fonte endógena de P₄.

Rocha Filho et al. (2004) elaboraram um protocolo para receptoras anovulatórias utilizando duas administrações de cipionato de estradiol (10mg/dia, i.m.; ECP; Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan, USA) e após isso uma aplicação de 1500mg i.m. de P₄ (P₄ LA 150, BET Laboratories, Lexington, USA) a cada 7 dias. Os resultados mostraram que o protocolo utilizado apresentou taxas de prenhez similares ao controle, permitindo que a aplicação de P₄ seja realizada 5 a 8 dias antes da TE.

Embora efetivos, tratamentos esteroidais diários consomem muito tempo e são muito trabalhosos. Além disso, repetidas injeções intramusculares ou subcutâneas aumentam o risco de inflamações no local da aplicação, e como consequência, algumas éguas tornam-se imediata ou futuramente intolerantes a aplicações hormonais ou de outros produtos (BERGFELT et al., 2007).

Vanderwall et al. (2007) verificaram um gradual declínio nas concentrações de progesterona para aproximadamente 2ng/mL nas éguas tratadas com P₄LA (1500mg/mL P₄ LA 150, BET Laboratories, Lexington, USA) com intervalo de 7 dias entre as aplicações, sendo claramente compatível com a manutenção da prenhez durante o período de estudo. Estes achados são similares a relatos prévios com receptoras ovariectomizadas que mantiveram a prenhez inicial quando receberam suplementação de P₄ exógena (McKINNON et al., 1988).

Em virtude disso, o programa de sincronização e a manutenção das éguas receptoras representam os maiores custos nos programas de transferência de embriões eqüinos.

Importância da P₄ na manutenção inicial da gestação

A contínua secreção de P₄ é essencial para o início e manutenção da prenhez na égua. A secreção de proteínas útero-específicas importantes para a nutrição e

desenvolvimento do embrião tem demonstrado ser progesterona-dependentes (SHARP; McDOWELL, 1985). A rápida perda destas proteínas ocorre com a luteólise (ZAVY et al., 1979). Nas éguas, os ovários e a placenta têm um importante papel na produção de progesterona e, conseqüentemente, na manutenção da prenhez. O CL primário, formado a partir da ovulação, persiste além do seu tempo fisiológico de vida ativa (15 a 16 dias), devido à ação do fator de reconhecimento materno da gestação, secretado pelo concepto, que ainda é esférico e móvel (GINTHER, 1983).

O *Corpus luteum* eqüino persiste no ovário materno, assim como em outras espécies, mas a produção de progesterona declina gradualmente de 12 a 20ng/mL ao redor do 5^o ao 10^o dia após a ovulação para 3-5ng/mL no 35^o dia (ALLEN, 2001). A partir deste momento, a produção de progesterona é incrementada pela formação de CLs acessórios, os quais se desenvolvem nos ovários da mãe como resultado da ação de gonadotrofinas como o FSH pituitário (hormônio folículo estimulante) e da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG). Estas (eCG) são secretadas pelos cálices endometriais como resultado da transformação funcional e estrutural de células invasivas do trofoblasto do cinturão coriônico que assim se desenvolvem no endométrio (ALLEN et al., 1973; DAELS et al., 1991; ALLEN, 2001).

Shideler et al. (1982) utilizando éguas ovariectomizadas e um protocolo com progesterona injetável e um progestágeno sintético (altrenogest) mantiveram a prenhez nos dias 34 e 35 de gestação. As éguas com concentração de progesterona inferior a 2ng/mL foram mais propensas ao aborto comparadas as éguas que tiveram concentração de progesterona superior a 2ng/mL.

Douglas et al. (1985) comparando concentrações plasmáticas de progesterona de éguas nos dias 5, 8 e 12 de gestação, com aquelas que falharam, observaram que as éguas com concentração de progesterona inferior a 2,5ng/mL tiveram menor chance de gestar. Os autores também sugerem que neste período, éguas com concentração de progesterona inferior a 2,5ng/mL, apresentam disfunção lútea.

McKinnon et al. (1988) observaram que aproximadamente 2,5ng/mL foram suficientes para manter a gestação, nível este obtido 24h após aplicação de 200mg de progesterona.

Aspiração Folicular

A aspiração de folículos antrais, foi inicialmente desenvolvida como um procedimento não-cirúrgico e de fácil repetibilidade para coleta de oócitos de eqüinos e bovinos (PIETERSE et al., 1988; BRUCK et al., 1992) sendo também utilizada em outras espécies domésticas e selvagens (BERG; ASHER, 2003) com uma proposta similar. Através da recuperação de oócitos *in vivo* e posterior produção *in vitro* de embriões (PIV) procura-se incrementar o número de produtos fêmea/ano. Diferentes técnicas são descritas para coleta *in vivo* de oócitos: aspiração folicular depois da exteriorização do ovário (McKINNON et al., 1986), aspiração transcutânea pelo flanco (HINRICHS et al., 1991) e transvaginal guiada por ultra-som (BRUCK et al., 1992). Contudo, o uso desta técnica não se restringe somente ao procedimento de recuperação de oócitos. Várias equipes de pesquisadores demonstraram que a técnica é importante para o estudo do ciclo estral e para o entendimento da fisiologia reprodutiva nos animais (HINRICHS et al., 1991; GASTAL et al., 1997; BOGH et al., 2000).

A aspiração folicular tem sido usada extensivamente como uma abordagem não-esteroidal para estudar a natureza da dinâmica folicular nos eqüinos e nos bovinos, sem a potencial interferência de esteróides exógenos (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2003a), tanto na indução da emergência da onda folicular quanto na sincronização da ovulação entre os animais (BERGFELT et al., 1994; BERGFELT et al., 1997; AMIRIDIS et al., 2006; LIMA et al., 2007).

Bogh et al. (2000) descreveram que a técnica de aspiração folicular é rápida, de fácil repetibilidade, não causando traumas substanciais ou desconfortos óbvios para as éguas. Observaram ainda que a evacuação de grandes folículos pré-ovulatórios pode causar vigorosa hemorragia intra-folicular. Todavia, esta hemorragia diminui quando a cavidade folicular é preenchida de sangue, provavelmente a pressão intra-folicular termine com a hemorragia. Cook et al. (1993) observaram que a técnica de aspiração folicular durante o diestro requer um maior período de tempo e depois de vários folículos serem aspirados no ovário o procedimento pareceu tornar-se um tanto doloroso. Alguns autores sugerem que, em alguns casos, após o procedimento de aspiração folicular, ocorre formação de tecido luteal (HINRICHS et al., 1991; BOGH et al., 2000; HAYNA et al., 2004).

Indução do CL pela aspiração folicular

O principal sistema de regulação endócrino da foliculogênese envolve as gonadotrofinas, mas vários outros hormônios produzidos localmente e fatores de crescimento estão também envolvidos na sua regulação (FORTUNE et al., 2004). Antes do início da divergência, eventos bioquímicos intrafoliculares asseguram que o futuro folículo dominante seja o folículo selecionado (BEG; GINTHER, 2006). O mecanismo que leva a esses eventos bioquímicos ainda não está claro, mas ele ocorre durante o progressivo declínio nas concentrações circulantes de FSH e o aumento inicial do LH (GINTHER et al., 2003b). Os fatores intrafoliculares, até o momento implicados para a ativação da divergência incluem aqueles relacionados ao sistema IGF (*insulin-like growth factor*), esteróides, peptídeos inibina A/ativina A, receptores para gonadotrofinas, fatores angiogênicos e vários outros fatores intrafoliculares (GINTHER, 2000; BERISHA et al., 2003; IRELAND et al., 2004).

A secreção de LH pré-ovulatório desenvolve-se progressivamente até aproximadamente uma semana, começando próxima a divergência folicular e estendendo-se em média até um dia depois da ovulação. O LH então diminui as suas concentrações a níveis basais até o próximo surgimento pré-ovulatório (GINTHER et al., 2006). Este fator pode ser importante no desenvolvimento e funcionalidade do CL inicial eqüino. Contudo, durante o período em que a concentração de progesterona está elevada, os níveis de LH estão diminuídos. Em contrapartida, a progesterona tem pouco ou nenhum efeito na secreção de FSH (SQUIRES, 1993; GINTHER et al., 2006).

Os dois hormônios esteróides, estrógeno e progesterona, são os maiores responsáveis pelos sistemas de *feedback* positivo e negativo que controlam a liberação de vários hormônios pituitários, incluindo prolactina, FSH e LH (SQUIRES, 1993).

As concentrações de LH e FSH estão relacionadas durante o ciclo estral. O papel do FSH e do LH no desenvolvimento e crescimento de folículos antrais são os seguintes: folículos pré-antrais adquirem receptores de LH na membrana das células da teca e para o FSH na membrana das células da granulosa. As células da teca produzem andrógenos sob a influência do LH, que atravessam a membrana basal dentro do próprio folículo, e sua aromatização em estrógenos ocorre sob a influência do FSH dentro das células da granulosa (MOON et al., 1975).

Ambos FSH e LH são requeridos para a produção de folículos aptos a ovular. Estrógenos induzem a formação de receptores de LH nas células da granulosa, preparando os folículos a tornarem-se responsivos ao aumento pré-ovulatório das gonadotrofinas que ocorre na fase final do ciclo (MOOR; SEAMARK, 1986; PIERSON, 1993).

Concentrações elevadas de E_2 e grandes quantidades de receptores de LH nas células da granulosa e tecal no dia 14 do ciclo estral tem previamente sido apontadas como características para os folículos serem selecionados e tornarem-se pré-ovulatórios. O tamanho grande do presumível folículo ovulatório foi uma característica adicional no primeiro dia de comportamento de cio (FAY; DOUGLAS, 1987).

O folículo pré-ovulatório tem uma maior rede de capilares do que os outros folículos (GINTHER et al., 2007). Esta considerável vascularidade existente ao redor do folículo dominante pode permitir um acúmulo maior de gonadotrofinas circulantes e garantir a sua sobrevivência enquanto os outros folículos entram em atresia (angiogênese ovariana, BERISHA, SCHAMS, 2005).

Algumas mudanças características ocorrem com os folículos eqüinos com a aproximação da ovulação. O número de receptores de LH diminui acompanhado pelo aumento nas concentrações de progesterona, testosterona e prostaglandinas no líquido folicular. As concentrações de estradiol tendem a diminuir (WATSON; HINRICHS, 1988). Em vacas, têm sido observados padrões similares nas concentrações de esteróides de folículos pré-ovulatórios (DIELEMAN et al., 1983) e isto se deve ao efeito da exposição de elevadas concentrações pré-ovulatórias de LH no plasma resultantes da inibição da capacidade aromatizante das células da granulosa. Isto causa uma depleção de substrato para síntese de estrógeno (DIELEMAN et al., 1983; DIELEMAN; BLANKENSTEIN, 1984), no qual as células da granulosa se diferenciam em células luteínicas.

No experimento de Watson & Sertich (1990) onde se aplicou hCG (0, 12, 24 ou 36h) antes da aspiração, verificou-se que nos folículos aspirados do grupo (0h), onde a aspiração do folículo pré-ovulatório foi realizada antes do tratamento com hCG, as células da granulosa foram ainda capazes de aromatização e não tiveram completo desenvolvimento de sua capacidade para produção de P4.

O trabalho de Fay & Douglas (1987) demonstrou que provavelmente um adequado número de receptores de LH está presente em folículos com diâmetro de

35mm.

McNatty (1979) estabeleceu que para um folículo formar um CL completamente funcional ao menos 2 critérios devem ser satisfeitos: apresentar número adequado de células da granulosa e quantidade suficiente de receptores de LH.

Bogh et al. (2000) observaram um significativo efeito do tamanho folicular nas concentrações de E₂ quando as éguas foram aspiradas no dia 14 e dia 18 do ciclo. Meinecke et al. (1987) estabeleceram uma correlação negativa do diâmetro do folículo para a concentração de P₄ folicular em éguas em cio. Isto ainda conflitua com os achados de Sirois et al. (1991) que demonstraram que durante o cultivo de partes da parede folicular, a secreção de P₄ não foi diferente para folículos pré-ovulatórios coletados durante o final do diestro, início do cio e final do cio. Por outro lado, tratamentos com gonadotrofina exógena durante o estro induzem um aumento intrafolicular de P₄ (WATSON; HINRICHS, 1988; BOGH et al., 2000). Estes estudos sugerem que este aumento na P₄ de folículos grandes, é presumivelmente devido ao começo da luteinização dos folículos pré-ovulatórios (WATSON; HINRICHS, 1988; BOGH et al., 2000).

A progesterona é o produto primário de secreção do CL. Ainda não se conhece como a maturidade do folículo no momento da aspiração folicular pode afetar a subsequente formação do corpo lúteo. Adequada função lútea é importante na doadora no procedimento de coleta e mais tarde, para assegurar o retorno normal ao cio. Na receptora, um corpo lúteo funcionando normalmente é necessário para manter a prenhez.

A aspiração de folículos pré-ovulatórios tem sido associada com subsequente disfunção luteal em humanos e primatas (KREITMANN et al., 1981); e baixas concentrações de progesterona luteal materna estão implicadas em falhas na fertilização *in vitro* e transferência de embriões em humanos (KREITMANN et al., 1981).

Hinrichs et al. (1991) através da aspiração de folículos maiores que 30mm em éguas, observaram que em todos os folículos aspirados ocorreu uma luteinização inicial demonstrada pelos elevados valores de progesterona sanguínea. A função do *Corpus luteum*, determinada pela duração na produção de progesterona (> 1 ng/mL) e picos na concentração da mesma, não foi afetada pela aspiração em nenhum estágio do desenvolvimento folicular. O exame ultra-sonográfico ainda indicou que, um *Corpus luteum* de morfologia normal foi formado depois da aspiração.

Observaram ainda que quando comparados, os efeitos da aspiração e ovulação, fica evidente que a remoção do líquido folicular, não mimetiza inteiramente uma ovulação. Os efeitos da aspiração e ovulação nos valores de FSH foram similares, provavelmente refletindo a perda na supressão da pituitária pela inibina ou estrógeno em ambos os casos. Os valores de progesterona, todavia, elevaram-se mais rapidamente depois da ovulação do que depois da aspiração. Isso é devido a luteinização pré-ovulatória da parede do folículo. Os valores de LH permaneceram altos nos grupos de éguas aspirados, mas declinou no grupo ovulação, provavelmente este resultado seja reflexo da rápida produção de progesterona com resultante supressão da liberação de LH pela pituitária.

Bracher et al. (1993), aspirando éguas no cio e no diestro prolongado (fase luteal) observaram que ocorreu luteinização dos folículos 1 a 6 dias após a aspiração, verificado pelos padrões de P_4 no plasma ($P_4 > 1 \text{ ng/mL}$) quando comparados a aquelas éguas que tiveram ovulação com um ciclo estral normal. A aspiração de todos os folículos ($> 10 \text{ mm}$) em éguas no período de transição quando o maior folículo alcançou 30mm em diâmetro resultou em luteinização em 3/8 éguas (38%) (ALVARENGA et al., 1999).

Hayna et al. (2004), aspirando folículos maiores que 25mm, observaram aumento das concentrações sanguíneas de progesterona maiores que 1ng/mL em 88% dos folículos aspirados entre 26-30mm e 100% nos folículos de diâmetro 31-34mm, sugerindo que houve formação de tecido luteal.

Bogh et al. (2000), verificaram que aspiração folicular de éguas nos dias 6 e 14 do ciclo estral, não afetaram as concentrações circulantes de P_4 , sendo similar a de éguas cíclicas normais. Além disso, o tamanho médio do ciclo depois da aspiração folicular no dia 6 (22,6 dias) e no dia 14 (25,3 dias) foi comparável ao tamanho do ciclo de éguas controle não-aspiradas durante a estação de monta (22,6 dias). Desta forma, os autores concluíram que a aspiração de folículos dominantes durante o diestro não resulta em subsequente luteinização. Por outro lado, a aspiração de folículos no dia 18 prolonga o ciclo normal por aproximadamente o tamanho de um ciclo inteiro. Essas informações associadas a mudanças ultrasonográficas observadas, fornecem evidências que há luteinização depois da aspiração de um folículo dominante (dia 18 do ciclo) formando um *Corpus luteum* (BOGH et al., 2000). É interessante notar que a concentração média de P_4 plasmática, seis dias depois da aspiração no dia 18, foi ao redor de 1ng/mL. Isto

indica que um CL desenvolveu, e esta produção de P₄ luteal pode ter sido retardada pela aspiração do folículo pré-ovulatório. A hemorragia intra-folicular pode ser uma das causas para essa demora na luteinização, porém estes resultados são baseados em apenas 3 amostras e necessitam confirmação.

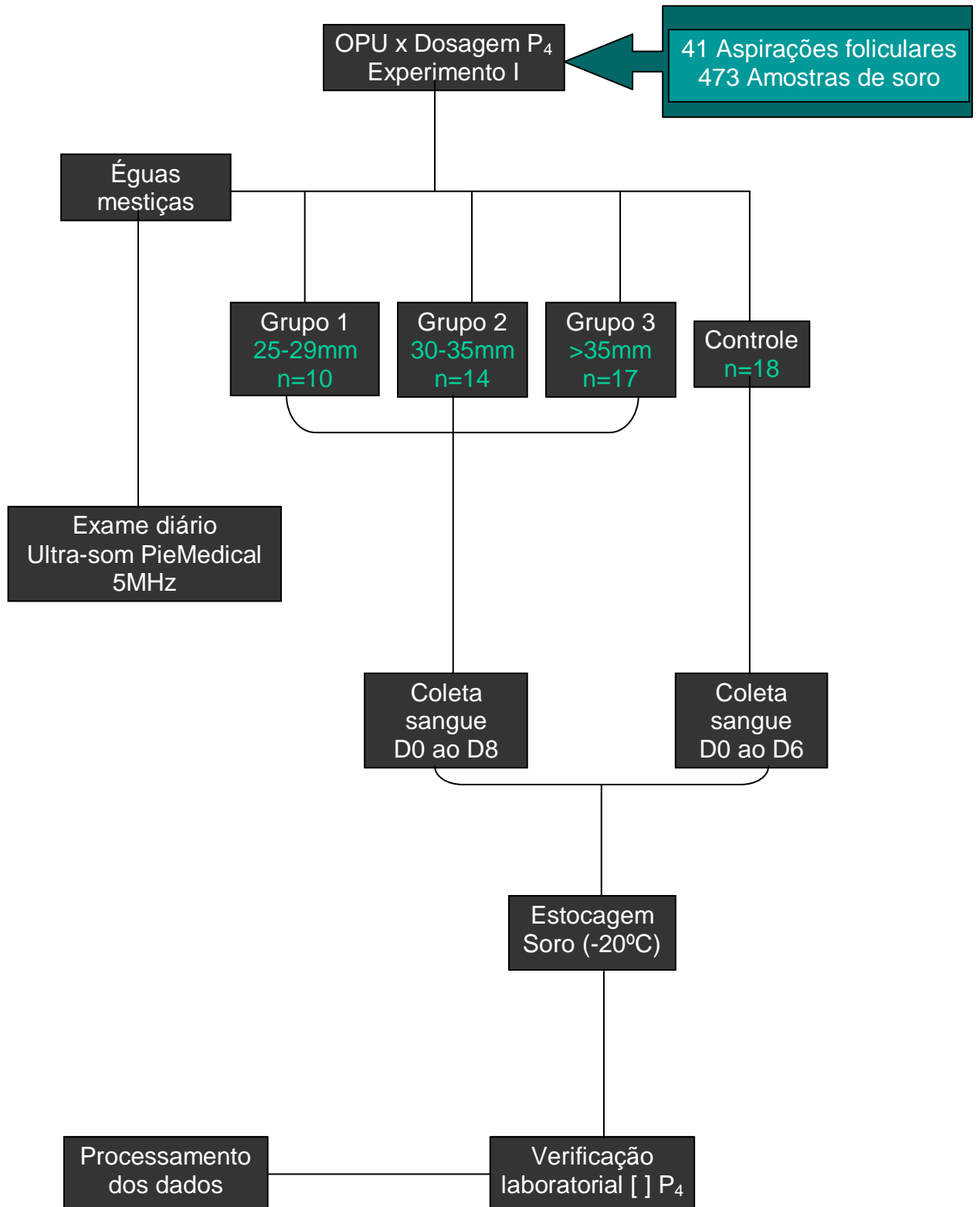
**Indução da função lútea na égua pela aspiração folicular
transvaginal guiada por ultra-som**

Luteal function induced by transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in mares

Mozzaquatro FD^a, Verstegan JP^b, Douglas RH^c, Troedsson MHT^b, Silva CAM^a, Rubin MIB.^a

^aEmbryolab – Laboratório de Embriologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brasil; ^bCollege of Veterinary Medicine, University of Flórida, Gainesville, FL 32618, USA; ^cB.E.T. Laboratories University of Kentucky Coldstream Research Campus 1501 Lexington, KY, USA.

Delineamento experimental



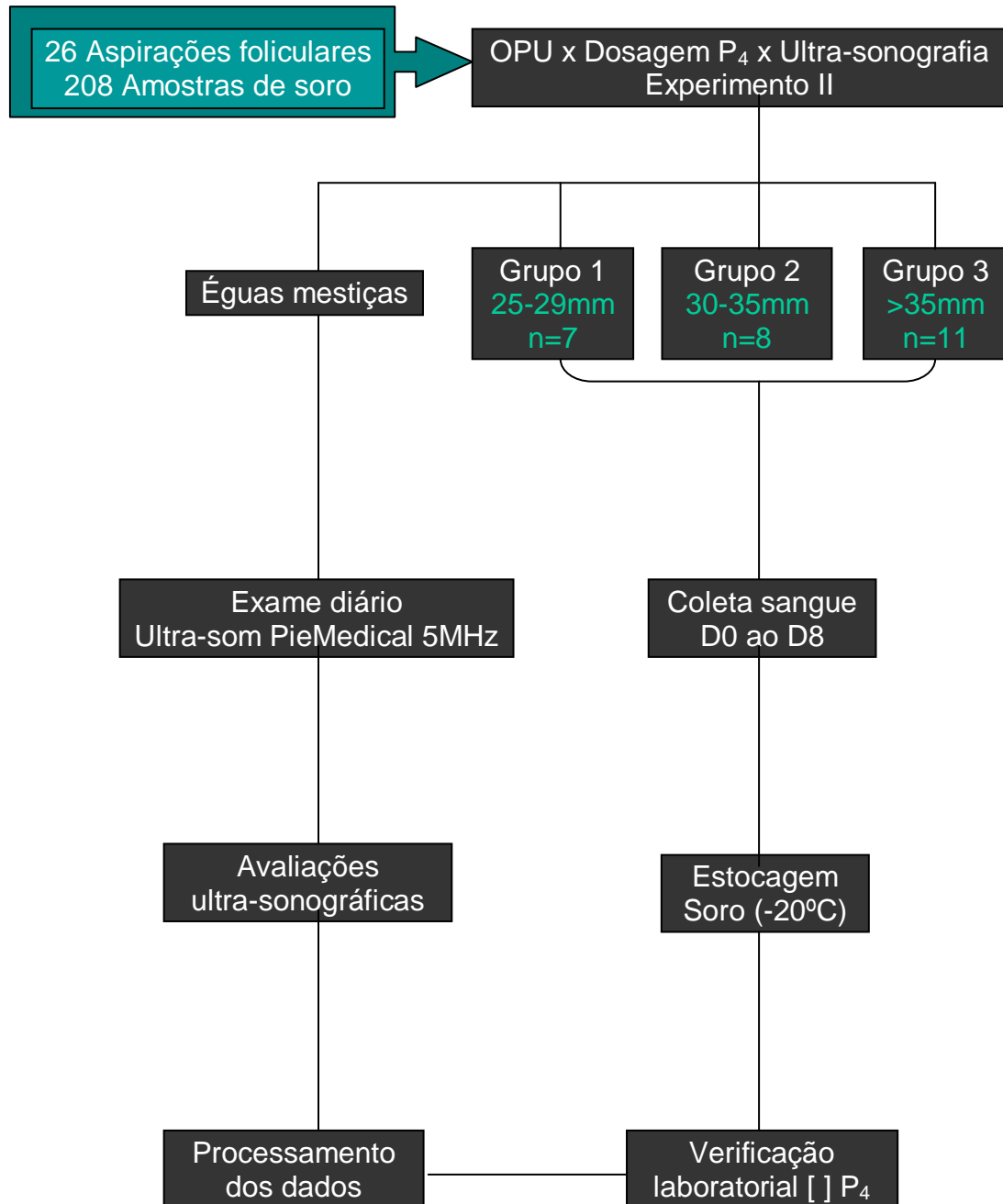
**Características ecográfica do *Corpus luteum* após
aspiração folicular em éguas**

Ecographic characteristics of *Corpus luteum* after follicular aspiration in mares

Mozzaquatro FD^a, Verstegan JP^b, Douglas RH^c, Troedsson MHT^b,
Rubin MIB^a, Silva CAM^a

^aEmbryolab – Laboratório de Embriologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brasil; ^bCollege of Veterinary Medicine, University of Flórida, Gainesville, FL 32618, USA; ^cB.E.T. Laboratories University of Kentucky Coldstream Research Campus 1501 Lexington, KY, USA.

Delimitação Experimental



DISCUSSÃO

A ocorrência da luteinização inicial em folículos pré-ovulatórios obtidos pela aspiração folicular nos eqüinos foi descrita por várias equipes (HINRICHS et al., 1991; BRACHER et al., 1993; BOGH et al., 2000; HAYNA et al., 2004), porém em fêmeas em diestro (BOGH et al., 2000) e no período transicional (ALVARENGA et al., 1999) é pouco freqüente. No presente estudo, pôde-se perceber que a quantidade de folículos que luteinizaram variou entre os grupos foliculares aspirados ($P < 0,05$). Alguns autores descrevem que este fato pode ocorrer devido à remoção de considerável número de células da granulosa durante o procedimento de aspiração folicular (McKINNON et al., 1988; BRACHER et al., 1993). No presente estudo, acreditamos que isto não tenha ocorrido, visto que a escarificação do folículo é maior quando se realiza repetidas lavagens da cavidade folicular para recuperar oócitos. Tal procedimento não foi conduzido nesta pesquisa e a aspiração foi concluída quando houve o completo colapamento do folículo, sendo que em nenhum momento observou-se quantidade significativa de sangue no líquido folicular. Ressalta-se também que 9 éguas das 15 aspiradas dos diferentes grupos foliculares (\varnothing de 25-29mm; 30-35mm e >35mm) não luteinizadas detectou-se elevada concentração de P_4 ($P > 2\text{ng/mL}$) sérica no D0 (Dia da aspiração). Na espécie eqüina, os níveis de LH permanecem altos até um dia após da ovulação (GINTHER et al., 2006), o que pode ser importante no desenvolvimento e funcionalidade do CL inicial eqüino. Contudo, durante o período em que a concentração de progesterona está alta, os níveis de LH estão diminuídos (SQUIRES, 1993; GINTHER et al., 2006). Os hormônios esteróidais, estrógeno e progesterona são os principais responsáveis pelo *feedback* positivo e negativo que controla a liberação de hormônios pituitários, incluindo prolactina, FSH e LH (SQUIRES, 1993). Ambos FSH e LH são necessários para o desenvolvimento de folículos ovulatórios. Os estrógenos induzem a formação de receptores de LH nas células da granulosa, preparando os folículos a tornarem-se responsivos ao aumento pré-ovulatório das gonadotrofinas, que ocorre na fase final do ciclo (MOOR; SEAMARK, 1986;

PIERSON, 1993). No entanto, no presente estudo, as concentrações de LH, FSH e estradiol não foram mensuradas. Portanto, não foi possível verificar se a variação nos índices de luteinização detectada nas éguas aspiradas ocorreu pela imaturidade do folículo, ou se a incapacidade de luteinização foi consequência do bloqueio da progesterona.

A técnica de aspiração folicular resultou em 62% (25/40; Experimento I) e 69% (18/26; Experimento II) de folículos luteinizados, corroborado pela produção sérica de $P_4 > 1\text{ng/mL}$.

No Experimento I, a concentração de P_4 das éguas aspiradas com folículos $>35\text{mm}$ não diferiu ($P>0.05$) das éguas ovuladas no 6º dia após a aspiração. O perfil da P_4 sérica em éguas aspiradas com diâmetro folicular entre 30-35mm e $>35\text{mm}$ foi similar, porém a secreção de P_4 das éguas com folículos entre 30-35mm de diâmetro foi diferente daquelas éguas com ovulação natural. A concentração de P_4 elevou-se rapidamente nas éguas após a ovulação, comparada às éguas aspiradas ($P<0,0001$). Este fato se deve provavelmente ao início da luteinização dos folículos pré-ovulatórios (WATSON; HINRICHS, 1988; BOGH et al., 2000).

No Experimento II, o critério de avaliação da imagem ecográfica atribuída ao CL, provou ser um método eficiente para a seleção das éguas receptoras de embriões. Isto vem de encontro com as pesquisas já desenvolvidas na área da ultra-sonografia. O diâmetro, a área e as graduações na escala cinza (ecogenicidade do tecido luteal) do *Corpus luteum* já foram objeto de estudo para caracterizar subjetivamente o desenvolvimento da glândula luteal quanto as concentrações circulantes de progesterona durante o ciclo estral e início da prenhez em éguas (GINTHER, 1986; SEVINGA et al., 1999; BOLLWEIN et al., 2002; BERGFELT et al., 2006; GINTHER et al., 2007; SIMÕES et al., 2007).

No Experimento I, 23 éguas (25 luteinizadas) produziram concentrações de P_4 acima de 2ng/mL . Já no Experimento II, a avaliação ecográfica da estrutura formada após a aspiração folicular revelou que 93% das éguas que tiveram a estrutura lútea classificada como CL 3 no 4º dia após aspiração, apresentaram P_4 sérica superior a 2ng/mL . Este fato permite indicar que somente éguas com CL 3 podem ser selecionadas como receptoras de embriões por apresentarem um *Corpus luteum* similar ao CL funcional induzido pela ovulação natural.

CONCLUSÕES

1. A aspiração folicular promoveu luteinização dos folículos aspirados, sendo que 92 a 94% das éguas a produção de progesterona foi superior a 2ng/mL (Experimento I e II, respectivamente).

2. Cem por cento das éguas aspiradas com folículos >35mm que luteinizaram, apresentaram P_4 > de 2ng/mL tanto no Experimento I quanto no Experimento II.

3. O critério ecográfico CL1, CL2 e CL3 atribuído para avaliar a imagem ultra-sonográfica da estrutura formada após a aspiração folicular foi um método prático e eficaz para estimar se houve ou não luteinização.

4. Éguas com folículo >35mm de diâmetro e que ao serem aspiradas produzam *Corpus luteum* classificados pela ultra-sonografia como "CL3" produzem concentrações de progesterona acima de 2ng/mL.

5. A aspiração folicular associada com a classificação ecográfica aqui apresentada, é um método alternativo para sincronização e seleção de éguas receptoras de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W. R., HAMILTON, D. W., MOOR, R. M. The origin of equine endometrial cups. II Invasion of the endometrium by trophoblast. **The Anatomical Record**, v. 117, p. 475-501, 1973.

ALLEN, W. R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction Domestic Animal**, v. 36, p. 121-131, 2001.

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 40, p. 310-29, 2005.

ALVARENGA, M. A., et al. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 431, 1999.

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

BALL, B. A. Embryonic death in mares. In: McKinnon, A. O.; Voss, J. L. (eds), **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, cap. 61, p. 523-524.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, p. 365-377, 2006. Disponível em: www.reproduction-online.org.

BERG, D. K.; ASHER, G. W. New developments reproductive technologies in deer. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 189-205, 2003.

BERGFELT, D. R., et al. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 895-907, 1994.

BERGFELT, D. R., et al. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1997.

BERGFELT, D. R. Estrous synchronization. In: Samper, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 165-77, 1999.

BERGFELT, D. R., et al. Regression and resurgence of the CL following PGF_{2α} treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology**, v. 65, p. 1605-1619, 2006.

BERGFELT, D. R., et al. Ovulation synchronization following commercial application of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 1183-1191, 2007.

BERISHA, B., et al. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 162-171, 2003.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 305-317, 2005.

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

BOLLWEIN, H., et al. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 2043-2051, 2002.

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

BRINGEL, B. A., et al. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 498-500, 2003.

BRUCK, I., et al. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p. 58-9, 1992.

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

CARNEVALE, E. M., et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 965-979, 2000.

CARNEY, N. J., et al. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v. 36, p. 23-32, 1991.

COLLEONI, S., et al. Application of Ovum Pick-Up, Intracytoplasmic Sperm Injection and Embryo Culture in Equine Practice. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 53., 2007 - Orlando (www.ivis.org), Last updated: 5-Dec-2007.

COOK, N. L., et al. Repeated transvaginal follicular aspiration in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 39, p. 204, 1993.

DAELS, P. F., et al. The *Corpus luteum*: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 501-508, 1991, (Supplement).

DAVIES, C. J., ANTCZAK, D. F., ALLEN, W. R. Reproduction in mules: Embryo transfer using sterile recipients. **Equine Veterinary Journal**, p. 63-67, 1985,

(Supplement 3).

DIELEMAN, S. J., et al. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 31-42, 1983.

DIELEMAN, S. J.; BLANKENSTEIN, D. M. Changes in oestrogen-synthesizing ability of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 487-94, 1984.

DOUGLAS, R. H., BURNS, P. J., HERSHMAN, L. Physiological and commercial parameters for producing progeny from subfertile mares by embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 111-114, 1985, (Supplement).

FAY, J. E.; DOUGLAS, R. H. Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 169-81, 1987, (supplement).

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 51, p. 261, 1999.

FORTUNE, J. E., et al. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FOSS, R., et al. Nonsurgical embryo transfer in a private practice (1998). AEEP PROCEEDINGS, 45., p. 210-212, 1999, CD-ROM.

FOSS, R.; CRANE, A. Serum progesterone changes in embryo transfer recipients. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 50., 2004 - Denver, (www.ivis.org), 4-Dec-2004.

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

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, p. 603-611, 1983.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1986, p.378.

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., et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003a.

GINTHER, O. J., et al. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. **Reproduction**, v. 126, p. 653-60, 2003b.

GINTHER, O. J., et al. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 1-2, p. 144-150, 2006 (Short communication).

GINTHER, O. J., et al. Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and development *Corpus Luteum*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 1, p. 20-27, 2007.

GOUDET, G., et al. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 232-245, 1997.

HAYNA, J. T., MADILL, S., TROEDSSON, M. H. T. The effect of transvaginal follicular aspiration on *Corpus luteum* formation in mares. **Havemeyer Foundation Workshop**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER. 6., RJ, Brazil, p. 35, 2004.

HINRICHIS, K., et al. Pregnancy in ovariectomised mares achieved by embryo transfer: A preliminary study. **Equine Veterinary Journal**, p. 74-75, 1985, (Supplement 3).

HINRICHIS, K., et al. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 26, p. 455-460, 1986.

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

HUDSON, J. J. & McCUE, P. How to increase embryo recovery rates and transfer success. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 50., 2004 – Denver (www.ivis.org), 4-Dec-2004.

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

IRELAND, J. L. H., et al. Evidence for autocrine and paracrine roles of α 2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicle. **Endocrinology**, v. 145, p. 2784-94, 2004.

JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryo using various transfer devices. **Theriogenology**, v. 58, p.

713-715, 2002, (Abstract).

KANITZ, W., et al. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 55-62, 2007.

KREITMANN, O., et al. Induced corpus luteum dysfunction after aspiration of the preovulatory follicle in monkeys. **Fertility and Sterility**, v. 35, n. 6, p. 671-5, 1981.

LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. **Equine Veterinary Journal**, Embryo transfer III, v. 15, p. 107-110, 1993 (Supplement).

LIMA, W. M., et al. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 100, p. 364-70, 2007.

McCUE, P. M., et al., Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 267, 1999.

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

McKINNON, A. O., et al. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1055-1063, 1988.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Lea & Febiger: Pennsylvania, 1993, p.1137.

McKINNON, A. O., et al. The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 83-85, 2000.

McNATTY, K. P. Follicular determinants of corpus luteum function in the human ovary. In: CHANNING, C. P., MARSCH, J. M., SADLER, W. A. (ed), **Ovarian Follicular and Corpus Luteum Function**. Plenum Press: New York, 1979, p. 465-477.

MEINTJES, M., et al. Effects of follicular aspiration and flushing, and the genotype of the fetus on circulating progesterone levels during pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 25-32, 1997 (supplement).

MIENIECKE, B., et al. Progestagen, androgen and oestrogen levels in plasma and ovarian follicular fluid during oestrous cycle of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 255-265, 1987.

MOON, Y. S., et al. Stimulation action of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. **Endocrinology**, v. 97, p. 244-7, 1975.

MOOR, R. M.; SEAMARK, R. F. Cell signaling, permeability, and microvascular changes during follicle development in mammals. **Journal Dairy Science**, v. 69, p. 927-43, 1986.

OGURI N., TSUTSUMI, Y. Non-surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, n. 2, p. 313-320, 1974.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKINNON, A. O., VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, cap. 17, p. 161-71.

POOL-ANDERSON, K., et al. Estradiol and progesterone concentrations resulting from the administration of an exogenous hormone regimen in diestrous embryo transfer recipients. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 125-129, 1988.

PIETERSE, M. C., et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 751-62, 1988.

RAZ, T., et al. Effect of prostaglandin in early diestrus or progesterone and estradiol administration on equine FSH-treated donor mare embryo recovery and recipient pregnancy rate. AAEP PROCEEDINGS, 2005, v. 51, CD-ROM.

ROCHA FILHO, A. N., et al. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004.

SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide**: Statistical Analysis System, Release 6.12-1998.

SEVINGA, M., et al. Relationship between ultrasonic characteristics of the *Corpus luteum*, plasma progesterone concentration and early pregnancy diagnosis in Friesian mares. **Theriogenology**, v. 52, p. 585-592, 1999.

SHARP, D.C.; McDOWELL, K.J. Critical events surrounding the maternal recognition of pregnancy in mares. **Equine Veterinary Journal**, p. 19-22, 1985, (supplement 3).

SHIDELER, R. K., et al. Progestogen therapy of ovariectomized pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 459-464, 1982, (Supplement).

SIMÕES, J., et al. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of *Corpora Lutea* in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 36-46, 2007.

SIROIS, J., et al. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 128, p. 1159-66, 1991.

SQUIRES, E. L., JULIANO, M. F., SHIDELER, R. K. Factors affecting success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 35-41, 1982a, (Supplement).

SQUIRES, E. L., et al. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 409-414, 1982b, (Supplement).

SQUIRES, E. L. Progesterone. In: McKINNON, A. O., VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, cap. 6, p. 57-64.

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

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

VANDERWALL, D. K. Current equine embryo transfer techniques. In: **Recent Advances in Equine Theriogenology**, B.A. Ball (ed.), Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 6-apr-2000.

VANDERWALL, D. K., WILLIAMS, J. L., WOODS, G. L. Use of a compounded proprietary long-acting progesterone formulation for pregnancy maintenance in mares. In: PROCEEDINGS, SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, Columbus, p.8, 2003.

VANDERWALL, D. K., et al. Use of a compounded long-acting progesterone formulation for equine pregnancy maintenance. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 2, p. 62-66, 2007.

WATSON, E. D.; HINRICHS, K. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mare after administration of hCG. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 557-61, 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. 1263-8, 1990.

VOGELSANG, S. G., BONDIOLE, K. R., MASSEY, J. M. Commercial application of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 89-91, 1985.

ZAVY, M. T., et al. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 403-411, 1979, (supplement).