

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RAFAELA THOMPSON TORRES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, MATURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS DE
DIFERENTES DIÂMETROS EM ÉGUAS**

UBERLÂNDIA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RAFAELA THOMPSON TORRES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, MATURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS DE
DIFERENTES DIÂMETROS EM ÉGUAS**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária, Curso de Graduação em
Medicina Veterinária, da Universidade
Federal de Uberlândia, como
requisito para aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão
de Curso II (TCC 2, GMV054).**

**Orientadora: Profa. Dra. Elisa
Sant'Anna Monteiro da Silva**

UBERLÂNDIA

2023

RAFAELA THOMPSON TORRES

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE ATRESIA, MATURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS DE
DIFERENTES TAMANHOS EM ÉGUAS**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária, Curso de Graduação em
Medicina Veterinária, da Universidade
Federal de Uberlândia, como
requisito para aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão
de Curso II (TCC 2, GMV054).**

**Prof. Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva
(FAMEV)**

**Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos
(FAMEV)**

**Dra. Midyan Daroz Guastali
(Genetech Reprodução Animal Brasil)**

UBERLÂNDIA

2023

RESUMO

A reprodução equina vem avançando nos últimos anos com o desenvolvimento e aprimoramento de biotécnicas, permitindo aumentar a eficiência reprodutiva de animais com alto valor zootécnico. Em relação à produção *in vitro* de embriões, a espécie equina apresenta uma importante limitação, quando comparada às outras espécies domésticas, principalmente na etapa da fertilização *in vitro* (FIV), onde os resultados são limitados e sua eficiência ainda é testada, sendo a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) a biotecnologia de escolha. Dessa forma, o presente trabalho objetiva formas de aumentar a eficiência da técnica com foco na aspiração folicular. Os oócitos foram separados em grupos conforme tamanho do folículo aspirado (grupo 1: <10mm; grupo 2: 10-20mm; grupo 3: 20-30mm; grupo 4: >30mm) e foram submetidos à todos os processos da ICSI até avaliação embrionária pré transferência. A taxa de recuperação oocitária foi de 68,8% grupo 1, 57,69% para o grupo 2, 66,6% para o grupo 3 e 0 para grupo 4. A melhor taxa de maturação foi do grupo 3 (100%) e o grupo 1 apresentou degenerados e imaturos em maior quantidade (42,5%). A avaliação de clivados e embriões aptos para transferência teve melhores resultados com oócitos do grupo 3 mas o baixo “n” dificultou a precisão dos achados.

Palavras-chave: ICSI, embrião, clivagem.

ABSTRACT

Equine reproduction has been advancing in recent years with the development and improvement of biotechniques, allowing to increase the reproductive efficiency of animals with high zootechnical value. In relation to the in vitro production of embryos, the equine species presents an important limitation, when compared to other domestic species, mainly in the in vitro fertilization (IVF) stage, where the results are limited and its efficiency is still being tested, being the injection intracytoplasmic spermatozoa (ICSI) the biotechnology of choice. Thus, the present work aims at ways to increase the efficiency of the technique with a focus on follicular aspiration. The oocytes were separated into groups according to the size of the aspirated follicle (group 1: <10mm; group 2: 10-20mm; group 3: 20-30mm; group 4: >30mm) and were submitted to all ICSI processes until embryonic evaluation pre transfer. The oocyte recovery rate was 68.8% for group 1, 57.69% for group 2, 66.6% for group 3 and 0 for group 4. The best maturation rate was for group 3 (100%) and group 1 had degenerated and immature in greater quantity (42.5%). The evaluation of cleaved and transferable embryos had better results with oocytes from group 3, but the low "n" hampered the precision of the findings.

Palavras-chave: ICSI; embryo; cleavage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação da relação cortical medular do ovário entre equinos e não equinos.....	11
Figura 2. (A) 10 oócitos maduros e já desnudos; (B) 1 oócito alterado (indicado pela *) e 2 oócitos imaturos.....	23
Figura 3. (A) Blastômero tipo A: presença de 8 ou mais blastômeros, dispostos de forma homogênea e bem definida; (B) Blastômero tipo B: presença de menos de 8 blastômeros, com disposição homogênea ou tamanhos variados; (C) Blastômero tipo C: presença de 4 células ou menos, com blastômeros homogêneos ou não.....	24
Figura 4. Figura 3. embriões classificados como aptos para serem transferidos. (A) e (B) embriões D7 oriundos de folículos menores que 10mm; (C) embrião oriundo de folículo entre 10 e 20mm; (D) embrião oriundo de folículo entre 20 e 30mm.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre diâmetro do folículo, número de folículos aspirados, e oócitos recuperados.....	22
Tabela 2. Avaliação dos oócitos após maturação.....	23
Tabela 3. Avaliação da clivagem e classificação.....	24
Tabela 4. Número de embriões aptos para transferência em relação ao número de oócitos iniciais.....	25
Tabela 5. Número de embriões aptos para transferência em relação à taxa de clivagem tipo A nos grupos 1 e 2 e tipo B no grupo 3, em D4.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Características da espécie equina	11
2.1.1. Anatomia e particularidades ovário	11
2.1.2. Foliculogênese e oogênese	12
2.1.3. Fisiologia reprodutiva	13
2.2. Biotecnologias reprodutivas	14
2.3. ICSI	16
2.3.1. Punção Folicular ovariana (Ovum pick up - OPU)	17
2.3.2. Maturação oocitária	17
3. METODOLOGIA	19
3.1. Obtenção e separação dos oócitos	19
3.2. Maturação oocitária e desnudamento	20
3.3. ICSI e cultivo	21
3.4. Avaliação embrionária	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Obtenção e separação dos oócitos	22
4.2. Maturação oocitária e desnudamento	22
4.3. ICSI e cultivo	23
4.4. Avaliação embrionária	24
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

A fisiologia da reprodução possui variadas particularidades associadas às espécies, seja pelas diferenças anatômicas, processos e/ou substâncias presentes no trato reprodutivo que permitem a ocorrência da fecundação. As biotecnologias reprodutivas buscam mimetizar de forma eficiente os acontecimentos fisiológicos que permitem a produção e desenvolvimento de embriões de diversas formas, porém, mesmo com os avanços, existem algumas limitações, como no caso do uso da fertilização *in vitro* (FIV) em equinos (HINRICHS, 2013).

O motivo da ineficiência da FIV em equinos não está totalmente elucidado, sendo que a principal teoria diz respeito a capacitação *in vitro* inadequada dos espermatozoides equinos, mostrando a necessidade de substâncias ou processos que ocorrem no trato reprodutivo da fêmea que ainda não foram isolados (LEEMANS et al. 2016). Há também vertentes que defendem um endurecimento da zona pelúcida do oócito que impede a penetração do espermatozóide no meio *in vitro*, envolvendo alterações que deixam de acontecer ou processos desencadeados pelo ambiente fora do folículo (HINRICHS et al. 2002; DELL'AQUILA et al. 1999).

Recentemente, Felix e colaboradores (2022) foram capazes de produzir 3 potros a partir da técnica convencional de FIV com adaptações na fase de capacitação espermática, com a pré incubação dos espermatozoides em meio específico por 22 horas antes da coincubação com os oócitos. No entanto, a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), segue sendo a técnica mais utilizada pela sua maior aplicabilidade, principalmente pela possibilidade do uso de semen congelado.

Considerando as dificuldades com a capacitação espermática e particularidades da parede oocitária, a ICSI possibilita a produção de embriões sem a necessidade de um gameta masculino capaz de acessar o oócito, já que a perfuração da zona pelúcida é feita mecanicamente pelo micromanipulador. As etapas da ICSI compreendem desde a aspiração dos folículos da égua com o auxílio de ultrassom (*in vivo*), a maturação oocitária, a injeção do espermatozóide e o cultivo até o desenvolvimento inicial do embrião, o qual é transferido à uma receptora (LAZZARI et al. 2020).

A coleta *in vivo*, atualmente, é realizada principalmente pela aspiração aspiração transvaginal guiada por ultrassom (CARNEVALE, 2004). A avaliação ultrassonográfica ovariana permite a visualização dos folículos a serem aspirados e acompanhamento do processo de aspiração, já que o tamanho folicular parece estar relacionado com a eficiência do procedimento, conforme já descrito (KANITZ et al. 1995; MEINTJES et al. 1995; DUCHAMPS et al. 1995). Hinrichs (1991) encontrou uma relação entre o aumento do tamanho do folículo e sua viabilidade, comparando oócitos oriundos de diferentes tamanhos de folículos, caracterizando-os a partir de suas características morfológicas, no entanto, não houve uma avaliação da fertilidade desses oócitos, avaliando-se maturação ou clivagem.

Com isso, o presente trabalho tem como objetivo comparar diferentes tamanhos de folículos quanto ao desempenho dos oócitos na produção *in vitro* de embriões equinos, buscando analisar a eficiência da aspiração de folículos com diâmetro menor que 10mm, entre 10 e 20mm, entre 20 e 30mm e maiores que 30mm.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características da espécie equina

2.1.1. Anatomia e particularidades ovário

A espécie equina possui como componentes do seu sistema reprodutor: vulva, vagina, cérvix, útero (dividido em corpo e cornos), ovidutos direito e esquerdo (divididos em infundíbulo, ampola e ístmo), ovários direito e esquerdo.

Anatomicamente o ovário equino difere-se das outras espécies pois apresenta uma inversão entre as camadas medular e cortical (Fig.1). A porção parenquimatosa com a presença dos folículos está na região mais interna do ovário, sendo recoberta por uma camada espessa de tecido conectivo intensamente irrigada, a qual dificulta a visualização e o acesso aos folículos na peça anatômica (CURCIO,B.R. et al 2006; CARNEIRO et al. 2001). Além disso, o ovário equino apresenta uma área de depressão, chamada fossa da ovulação, onde ocorre a ruptura do folículo no momento da ovulação.

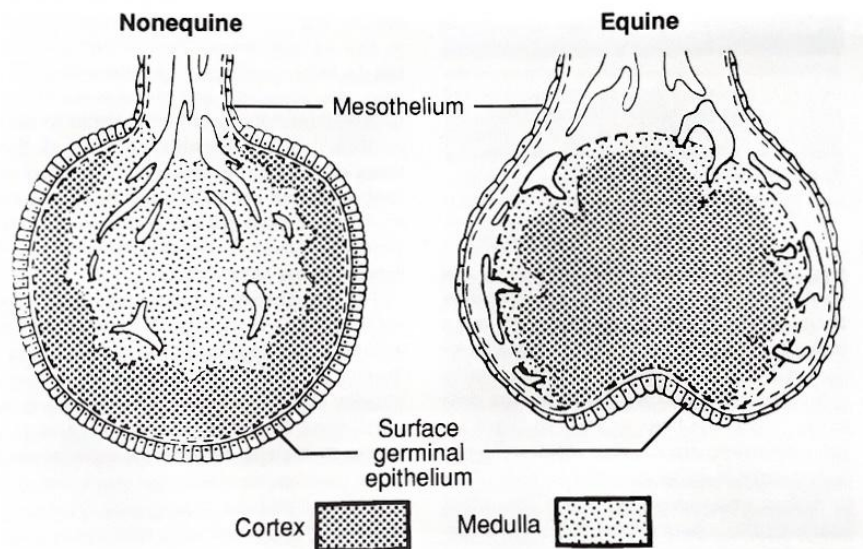


FIGURE 1.13. Diagrammatic comparison of relationships of cortical and medullary areas of ovaries in equine and nonequine farm species. Adapted from (1122).

Figura 1: Ginther, 1992.

2.1.2. Folliculogênese e oôgenese

A formação dos oócitos nos mamíferos ocorre durante a gestação e o seu desenvolvimento finaliza-se ao longo da vida reprodutiva. Esse processo desde a formação do gameta até a sua ovulação é chamado de folliculogênese e engloba os processos de crescimento, maturação e dominância de um folículo. É de extrema importância entender a maneira que o desenvolvimento folicular ocorre para identificar fases do ciclo estral e possibilitar a manipulação conforme as biotecnologias utilizadas.

A unidade funcional do ovário é o folículo, que abriga o oócito e fornece todas as condições ideais para o armazenamento, crescimento e maturação dele ao longo da vida da fêmea, desde antes da puberdade (GORDON, 1994). As éguas, assim como os outros mamíferos, apresentam milhares de folículos ao nascimento, os quais poderão ovular ou entrar em atresia, sendo este o destino da grande maioria (DOWNS, 1993; BECKERS et al. 1996).

A oogênese também possui suas etapas de desenvolvimento que acompanham a folliculogênese, na qual, os folículos inicialmente são constituídos de um oócito primário circundado por uma pequena quantidade de células, são imaturos, não possuem antro e são classificados como pré-antrais (que engloba as fases primária e secundária - PIERSON, 1993). Os oócitos primordiais apresentam uma pequena camada de células da granulosa que, durante o desenvolvimento folicular, aumentam em quantidade e fortalecem suas ligações com o oócito, aumentando a aderência (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Após o aparecimento do antro e o desenvolvimento das camadas da teca e da granulosa, denominamos esse folículo de antral (CURCIO, et al 2006; HAFEZ, 1995). Nessa fase de crescimento ocorre a secreção de uma membrana glicoproteica que engloba o oócito formando uma espécie de revestimento, a zona pelúcida. Além de proteção, essa estrutura também permite a formação de ligações mais fortes com as células da granulosa, formando junções gap entre elas e o oócito, dando origem ao complexo *cumulus-oophorus* (CCO) (SOYAL, et al., 2000; HAFEZ, 1995; ANDERSON & ALBERTINI, 1976).

Durante um ciclo da égua, vários folículos antrais são recrutados, aumentam de tamanho e amadurecem, no entanto, apenas um ou dois irão assumir a dominância, levando o restante à atresia (GASTAL, et al 1997).

Para que seja possível ocorrer o desenvolvimento embrionário, é necessário que o oócito sofra o processo de maturação, onde irá ocorrer alterações nucleares, citoplasmáticas e o retorno da meiose até a fase de metáfase II (LANDIM-ALVARENGA & MAZIERO, 2014). Dentre essas mudanças, há uma redistribuição das organelas celulares, como os grânulos corticais (GC), complexo de golgi, mitocôndrias, retículo endoplasmático (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994) e condensação da cromatina. Além disso, há a formação do primeiro corpúsculo polar, que é um dos critérios para identificar o oócito que maturou da forma correta e atingiu a metáfase II (CURCIO, et. al 2006; GRONDAHL, 1995).

2.1.3. Fisiologia reprodutiva

A sazonalidade reprodutiva nos equinos caracteriza esta espécie como poliéstrica estacional de dias longos, ou seja, a ocorrência de ciclos estrais depende da luminosidade diária (FREEDMAN, et. al 1979). Essa associação ocorre devido a alterações hormonais influenciadas pela captação do estímulo luminoso pela glândula pineal e produção de melatonina, que afeta diretamente o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (ROCHA, et. al 2011).

A melatonina apresenta uma atividade de regulação da produção de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), o qual é responsável por estimular a liberação de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH). Dessa forma, nos períodos do ano em que há maior luminosidade diária (primavera-verão), a produção de melatonina é reduzida e cessa a sua atividade inibitória sobre o GnRH, permitindo que o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal atue, liberando FSH e LH (SISK & FOSTER, 2004; MAULPAUX, et. al 1999). As gonadotrofinas atuam diretamente no ovário, sendo o FSH responsável pelo recrutamento folicular e o LH pelo crescimento final do folículo e sua posterior ovulação (GINTHER, 2004).

Cada onda de crescimento folicular inicia-se com a emergência de diversos folículos pela ação do FSH, que em determinado ponto do ciclo irão divergir. No caso das éguas, predomina a característica de serem monovulatórias, ou seja, ovulam um único folículo por ciclo, o qual possui uma onda de crescimento maior que os demais que irão regredir (GASTAL et. al, 1997). O folículo dominante irá

responder ao LH nesse desenvolvimento final e, por fim, ovular a partir da fossa da ovulação (GINTHER et al., 2007).

O intervalo entre uma ovulação e outra é denominado ciclo estral (BLANCHARD, 2011), é dividido em fases denominadas estro e diestro nos equinos e tem duração de aproximadamente 21 dias durante a estação reprodutiva. Pode haver uma variação nesse tempo durante os períodos de transição, que compreendem início da primavera e do outono, onde há uma irregularidade na ocorrência das fases (AURICH, 2011). O anestro compreende o período em que a égua para de ciclar e ocorre durante outono-inverno (dias curtos).

As fases do ciclo estral caracterizam-se por alterações morfológicas no sistema reprodutivo e diferenças hormonais, predominando progesterona durante o diestro e estrógeno durante o estro. Nesta última há a presença de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento que, por interações de gonadotrofinas, irão dar origem a um folículo dominante (ou mais, com menos frequência) que irá ovular e os outros entrarão em atresia, ou seja, involuem. Após a ovulação inicia-se a fase de diestro com a formação do corpo lúteo produtor de progesterona, hormônio responsável pela manutenção da gestação se houver a fecundação (SATUÉ & GARDON, 2013; BLANCHARD, 2011). Após, aproximadamente, 13-16 dias da ovulação ocorrerá a chamada luteólise se não houver reconhecimento materno-fetal, recomeçando o ciclo (GINTHER, 1998).

2.2. Biotecnologias reprodutivas

O mercado equino cresce cada vez mais e junto com ele a busca por tecnologias que permitam reproduzir animais sem que seja necessário a suspensão da vida atlética ou um maior número de descendentes de uma única égua em um curto espaço de tempo. Biotecnologias como congelamento de sêmen, inseminação artificial e transferência de embriões permitem um aproveitamento melhor de animais que se destacam, mas possui limitações quanto à qualidade do material genético disponível e o melhor aproveitamento das éguas.

A inseminação artificial (IA) é a biotecnologia mais amplamente disseminada na reprodução animal, apresentando inúmeras vantagens (AX et. al, 2000). Essa técnica permite que um único reprodutor seja capaz de reproduzir em larga escala (a quantidade de sêmen produzido permite inseminar mais de uma fêmea por

ejaculado), potencializa o melhoramento animal, reduz riscos de lesões ocasionadas durante a cópula, reduz risco de transmissão de doenças além de permitir o uso de animais já mortos a partir do sêmen congelado (AX, et. al 2004).

Armazenar espermatozoides por tempo indeterminado é a principal vantagem do congelamento de semen, permitindo que indivíduos superiores sejam utilizados na reprodução até em locais de difícil acesso, além de formar bancos genéticos. No entanto, o uso de semen congelado exige técnica do médico veterinário e é limitada pela necessidade do uso de um número mínimo de paletas por haver uma queda na qualidade seminal após o procedimento, limitando o uso desse material após a morte do reprodutor (OLIVEIRA, 2013; OSÓRIO, 2008).

Além dessas biotecnologias descritas, a transferência de embriões é muito utilizada na espécie equina, principalmente pelo fato de a maioria dos animais de interesse reprodutivo serem atletas, e a gestação força a suspensão das atividades no seu período final (HARTMANN, et. al 2011). A produção de embriões pode ser feita *in vivo* ou *in vitro*, sendo que consiste em produzir um ou mais embriões de uma égua doadora e posteriormente transferir para uma receptora que irá gestar e parir o potro (ANDRADE, 1986), sendo necessário a sincronização hormonal desses dois animais (LIRA, 2009).

A produção de embriões, principalmente *in vivo*, ainda é limitada principalmente pela característica monovulatória das éguas, sendo que protocolos de superovulação testados ainda não foram capazes de produzir resultados satisfatórios nessa espécie. O uso de deslorrelina, extrato de pituitária equina (EPE), associações com hCG e FSHe ainda não são consistentes e as limitações anatômicas do ovário equino (como a fossa da ovulação) dificultam a produção de um número maior de embriões durante um programa de TE convencional (BERTOZZO, et al 2012).

Utilizar técnicas *in vitro* permite, principalmente, o uso de fêmeas consideradas problemáticas por não serem capazes de produzir embriões *in vivo*, pela idade avançada ou, mais recentemente, pela possibilidade de utilizar animais sem que afete a atividade atlética, maximizando a eficiência reprodutiva (MCKINNON & SQUIRES, 2007). No entanto, diferentemente da espécie bovina em que a maior parte dos embriões são produzidos via Fertilização In Vitro (FIV) convencional (MARTINS, 2010), os equinos apresentam particularidades que impedem o uso dessa biotécnica.

Apenas dois potros nasceram a partir da técnica de FIV convencional, e a maturação oocitária de ambos foi feita *in vivo* (BEZARD, et. al 1991). A dificuldade de aplicação da FIV em equinos tem como principal teoria a ineficiência da capacitação *in vitro* dos espermatozoides, não sendo possível até o presente momento reproduzir os acontecimentos que ocorrem no trato reprodutivo da fêmea (LEEMANS et al. 2016). Outra teoria diz respeito ao endurecimento da zona pelúcida do oócito durante os processos que acontecem *in vitro*, que impede a penetração do espermatozoide (HINRICHS et al. 2002; DELL'AQUILA et al. 1999). Diante disso, preconiza-se o uso da Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) em equinos para contornar os obstáculos encontrados na FIV.

2.3. ICSI

A ICSI baseia-se na introdução de um único espermatozoide no interior de um oócito. Conforme descrito por Morris (2018), a técnica baseia-se nas seguintes etapas: coleta dos oócitos de uma égua por aspiração folicular (*Ovum Pick Up* - OPU), maturação e desnudação dessas células, processamento e injeção do espermatozoide, cultivo do embrião até a transferência para receptora ou criopreservação/vitrificação.

O uso da ICSI possibilita a fecundação do oócito sem que seja necessário a penetração da zona pelúcida pelo espermatozoide, contornando ambas as dificuldades encontradas na FIV convencional. Além disso, a técnica contorna problemas como quantidades limitadas de sêmen (é necessário apenas um único espermatozoide), sêmen de baixa qualidade, éguas com problemas de ovulação, permite um número maior de embriões produzidos de uma única égua e possui taxas melhores na vitrificação de embrião, o que permite a escolha do melhor momento da receptora (GALLI, et. al 2016; CHOI & HINRICHS, 2017).

2.3.1. Punção folicular ovariana (Ovum pick up - OPU)

Para recuperação dos oócitos *in vivo* que serão utilizados na ICSI, é feita a punção ou aspiração folicular. Essa técnica é descrita desde 1988 em bovinos por Pieterse e colaboradores e em equinos foi descrita por Brück e colaboradores em 1992, os quais demonstraram ser possível aplicar a técnica de lavagem e aspiração folicular guiada por ultrassonografia via transvaginal.

Para realização da coleta, a égua deve estar em estação, devidamente contida, sedada e com fármacos analgésicos corretos para evitar acidentes e desconforto ao animal. Retira-se as fezes da ampola retal do animal e faz a higienização do períneo, para evitar contaminações externas no interior da vagina. Para identificação dos folículos a serem aspirados utiliza-se uma guia composta por um suporte, uma probe ultrassonográfica microconvexa e a agulha de punção, que é colocada através da vulva até o fundo do saco vaginal. O técnico irá posicionar os ovários na direção da probe via palpação transretal e expor a agulha quando o folículo a ser aspirado for visível na imagem ultrassonográfica, introduzindo-a no interior do folículo (CARNEVALE et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006; DA SILVA RUA et al. 2015).

Após a introdução da agulha, é realizada a lavagem. O oócito equino possui fortes aderências na parede do folículo (ADONA, et al 2012), o que torna necessário a realização da escarificação e utilização de pressão na lavagem, principalmente em folículos pequenos (HINRICHS, 1998). Os folículos mais maduros costumam ter um afrouxamento das ligações por possuírem um estágio avançado de maturação e conseqüentemente uma expansão das células do cumulus, facilitando o descolamento do CCO da parede (HAWLEY, et al 1995).

O líquido folicular é despejado no copo coletor durante a aspiração e ao final, é transferido para a placa de petri, onde será feito o rastreamento dos oócitos com o auxílio de uma lupa (DA SILVA RUA et al, 2015).

2.3.2. Maturação oocitária

Após a recuperação dos oócitos, eles são avaliados quanto às características do complexo CCO, sendo que, segundo Curcio (2005) em um oócito viável espera-se encontrar ooplasma homogêneo, com uma coloração marrom,

granulações finas e ao menos uma camada completa de células do cumulus. Após a seleção, eles seguem para a etapa de maturação.

Uma das etapas mais críticas da ICSI é a maturação oocitária, já que os oócitos são recuperados ainda imaturos e os procedimentos que ocorrem *in vivo* são complexos, havendo uma dificuldade de reproduzi-los *in vitro*, principalmente a sincronização entre maturação nuclear e citoplasmática (LANDIM-ALVARENGA & MAZIERO, 2014). A maturação no laboratório ocorre em um meio específico, seja TCM-199 (ZHANG, et. al 1989; SHABPAREH, et. al 1993) ou DMEM/F12 (MERLO, et al 2018), sendo este último mais enriquecido com que glicose, o que pode explicar melhores taxas de clivagem e blastocisto (GALLI, et. al 2007). Os oócitos irão permanecer no interior de uma estufa por 24 a 36 horas (DELL'AQUILA, et al 2003; BERTERO, et. al 2017).

Após a maturação é necessário realizar o desnudamento oocitário, isto é, retirar as células do *cumulus-oophorus* para que seja possível a visualização do primeiro corpúsculo polar. A identificação desta estrutura indica a ocorrência da maturação oocitária (D'ALESSANDRIS, et. al 2001) e auxilia na localização do fuso maior, de forma que o local de injeção não interfira no fuso meiótico. Além disso, a desnudação permite avaliar o formato do oócito, coloração, granulação do citoplasma, regularidade e espessura da zona pelúcida, todos esse fatores são correlacionados com a qualidade e viabilidade embrionária (EBNER et. al, 2006; DE SANTIS, et. al 2005; EBNER et al. 2005).

3. METODOLOGIA

Foram utilizadas 5 éguas mestiças, com a faixa etária entre 7 e 12 anos e peso entre 350 a 450kg. As éguas foram avaliadas anteriormente à aspiração para caracterização dos ovários, definindo presença de corpo lúteo, tamanho folicular e quantidade folicular, sendo que a seleção baseou-se em animais sem corpo lúteo e população folicular maior. As aspirações foram realizadas no Setor de Equinos da Universidade Federal de Uberlândia (Sequi-UFU) e os procedimentos da ICSI no Laboratório da Genetech Reprodução Animal em Campinas-SP. A metodologia foi submetida à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), e aprovada sob o número de protocolo 23117.083343/2022-11.

3.1. Obtenção e separação dos oócitos

Para a obtenção dos oócitos, foi realizada aspiração folicular ovariana (Ovum pick up - OPU). As éguas foram contidas em tronco apropriado, sedadas com detomidina (20mcg/Kg) e utilizou-se butorfanol (Torbugesic®) na dose de 0,1mg/kg e Buscofin® (0,2mg/Kg de butilbrometo de hioscina e 25mg/kg de dipirona) como fármacos analgésicos e antiespasmódicos, a fim de evitar acidentes e desconforto ao animal. Retirou-se as fezes da ampola retal do animal e higienizou o períneo, para evitar contaminações externas no interior da vagina. Para identificação dos folículos a serem aspirados utilizou-se uma guia composta por um suporte, uma probe ultrassonográfica microconvexa e a agulha de punção, que é colocada através da vulva até o fundo do saco vaginal. Posicionou-se os ovários na direção da probe via palpação transretal e expôs-se a agulha quando o folículo a ser aspirado já estava visível na imagem ultrassonográfica. A agulha foi introduzida e iniciou-se a punção folicular.

A lavagem folicular foi feita com 5 jatos de PBS + heparina (variando volume conforme tamanho) no interior de cada folículo associado com a escarificação e pressão média de 65mmHg no puncionamento. Após o fim do procedimento, foi aplicado Agrosil® dose 1ml/20kg PV por 3 dias em todos os animais.

Os diferentes tamanhos de folículos foram separados em garrafas durante a aspiração em 4 grupos:

Grupo 1: diâmetro folicular $\leq 10\text{mm}$

Grupo 2: $10\text{mm} < \text{diâmetro folicular} \leq 20\text{mm}$

Grupo 3: $20\text{mm} < \text{diâmetro folicular} \leq 30\text{mm}$

Grupo 4: diâmetro folicular $> 30\text{mm}$

O conteúdo de cada garrafa foi filtrado e adicionado à uma placa de petri individualmente. Os oócitos foram rastreados com auxílio de lupa e pipeta automática e depositados em criotubos contendo meio específico (ABT Holding®) para transporte. Os oócitos foram acondicionados em transportador próprio (Transportador Versátil para Oócitos e Embriões - WTA), mantidos em temperatura de 22°C , enquanto levados ao laboratório.

3.2. Maturação oocitária e desnudamento

Ao chegar no laboratório, o sobrenadante de cada criotubo foi retirado e colocado na tampa de uma placa de petri 30x15. O conteúdo restante foi levemente movimentado para que os oócitos que estiverem aderidos soltem-se e pudessem sair com maior facilidade. Após o rastreamento, os oócitos recuperados foram transferidos para a placa de maturação e permaneceram nela até o momento da injeção.

Nos oócitos já maduros é necessário realizar o desnudamento oocitário, isto é, retirar as células do cumulus-oophorus para que seja possível a visualização do primeiro corpúsculo polar. A identificação desta estrutura indica a ocorrência da maturação oocitária (D'ALESSANDRIS, et. al 2001) e auxilia na localização do fuso maior, de forma que o local de injeção não interfira no fuso meiótico. Além disso, a desnudação permite avaliar o formato do oócito, coloração, granulação do citoplasma, regularidade e espessura da zona pelúcida, todos esse fatores são correlacionados com a qualidade e viabilidade embrionária (EBNER et. al, 2006; DE SANTIS, et. al 2005; EBNER et al. 2005).

Para o desnudamento, foi utilizada solução contendo hialuronidase, na qual os oócitos permaneceram por 2 minutos antes de sofrerem a denudação mecânica.

3.3. ICSI e cultivo

Com o oócito maduro e desnudado, foi realizada a injeção intracitoplasmática. O semen foi previamente descongelado e mantido em meio tamponado a 38°C, assim como a placa onde os oócitos foram colocados para manipulação.

Para realização da técnica, o oócito foi posicionado com o corpúsculo polar na posição de 12:00 e a injeção de um único espermatozoide é feita lateralmente, na posição de 15:00, para que os fusos meióticos não sejam afetados (DE SANTIS, et. al 2005). Após a injeção, os oócitos foram transferidos para a placa de cultivo, na qual permaneceram no interior da estufa por mais 4 dias, após esse período, avalia-se a clivagem no micromanipulador com aumento de 40x.

No 4º dia de cultivo, os embriões clivados foram avaliados e classificados conforme o número de blastômeros e qual a disposição deles, sendo: (A) Presença de 8 ou mais blastômeros, dispostos de forma homogênea e bem definida; (B) Presença de menos de 8 blastômeros, com disposição homogênea ou tamanhos variados; (C) Presença de 4 células ou menos, com blastômeros homogêneos ou não. Após a avaliação, eles são transferidos para outra placa na qual irão permanecer até o dia da avaliação final.

3.4. Avaliação embrionária

Ao final do experimento, avaliou-se quantos dos oócitos injetados deram origem à blastocistos aptos para a transferência de embriões. Os embriões foram avaliados por 4 dias (D7, D8, D9 e D10), e conforme eles atingiam um desenvolvimento aceitável, eram retirados do cultivo e contabilizados. Apenas embriões bem desenvolvidos foram considerados, ou seja, aqueles que apresentavam zona pelúcida alinhada, células trofoblásticas com contorno aparente e homogeneidade.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e separação dos oócitos

Foram aspirados no total 94 folículos de 5 éguas distribuídos nos 4 grupos, sendo: Grupo 1: 61 folículos com diâmetro menor que 10mm; Grupo 2: 26 folículos com diâmetro entre 10 e 20mm; Grupo 3: 03 folículos com diâmetro entre 20 e 30mm; Grupo 4: 04 folículos com diâmetro maior que 30mm, conforme tabela 1. A taxa de recuperação foi de 63%, resultando em 59 oócitos, sendo: 61 folículos com diâmetro menor que 10mm; 26 folículos com diâmetro entre 10 e 20mm; 03 folículos com diâmetro entre 20 e 30mm; 04 folículos com diâmetro maior que 30mm. A média de recuperação de oócitos por égua foi de 11,8.

Tabela 1. Relação entre diâmetro do folículo, folículos aspirados e oócitos recuperados.

Grupo	Diâmetro do folículo aspirado (mm)	Número de folículos aspirados	Número de oócitos recuperados*
1	<10	61	42 (68,8%)
2	10-20	26	15 (57,69%)
3	20-30	03	2 (66,6%)
4	>30	04	0

*Relação oócitos/folículo

4.2. Maturação oocitária e desnudamento

Durante o rastreamento dos oócitos no laboratório, dois oócitos do grupo A não foram encontrados, resultando em 57 oócitos incubados. Após as 30 horas de maturação em meio específico, os oócitos foram desnudados e todos foram analisados via microscopia óptica para avaliação da maturação, onde identificou-se o corpúsculo polar nos oócitos maduros e descartou-se aqueles alterados ou degenerados (figura 2), com os seguintes resultados: Placa 1: 23 oócitos maduros, 9 imaturos e 8 alterados/degenerados; Placa 2: 11 oócitos maduros, 3 imaturos e 1 degenerado/alterado; Placa 3: 2 oócitos maduros. conforme tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos oócitos após maturação

	Placas			
	<10mm	10-20mm	20-30mm	
Oócitos maduros	23 (57,5%)	11 (73,33%)	2 (100%)	36
Oócitos imaturos	9 (22,5%)	3 (20%)	0	11
Oócitos degenerados ou alterados	8 (20%)	1 (6,66%)	0	9
	40	15	2	

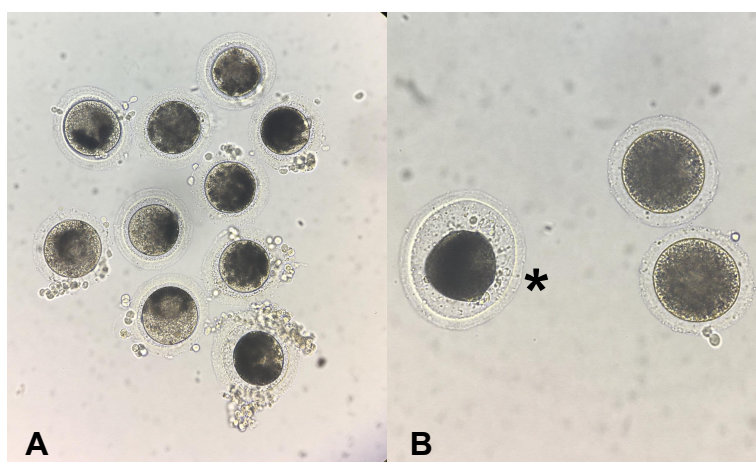


Figura 2: (A) 10 oócitos maduros e já desnudos; (B) 1 oócito alterado (indicado pela *) e 2 oócitos imaturos. Fonte: Genetech Reprodução Animal Brasil.

4.3. ICSI e cultivo

Todos os oócitos maduros (36) foram injetados e cultivados e no quarto dia as classificações foram: Placa 1: 7A, 7B, 6C; Placa 2: 4A, 2B; Placa 3: 2B, conforme tabela 3. A porcentagem de clivados total em relação aos oócitos maduros foi de 50% para o grupo <10mm, 40% para o grupo 10-20mm e 100% para o grupo 20-30mm. O restante dos oócitos injetados (8) não desenvolveu-se

Tabela 3. Avaliação da clivagem e classificação.

Classificação da clivagem*	Placas			
	<10mm	10-20mm	20-30mm	
A	7 (30,43%)	4 (36,36%)	0	11
B	7 (30,43%)	2 (18,18%)	2 (100%)	11
C	6 (26,08%)	0	0	6
	20 (86,95%)	6 (54,54%)	2 (100%)	

*(A) Presença de 8 ou mais blastômeros, dispostos de forma homogênea e bem definida; (B) Presença de menos de 8 blastômeros, com disposição homogênea ou tamanhos variados; (C) Presença de 4 células ou menos, com blastômeros homogêneos ou não.

Os oócitos que não apresentaram desenvolvimento após a injeção foram descartados e o restante foi mantido na incubadora (figura 2).

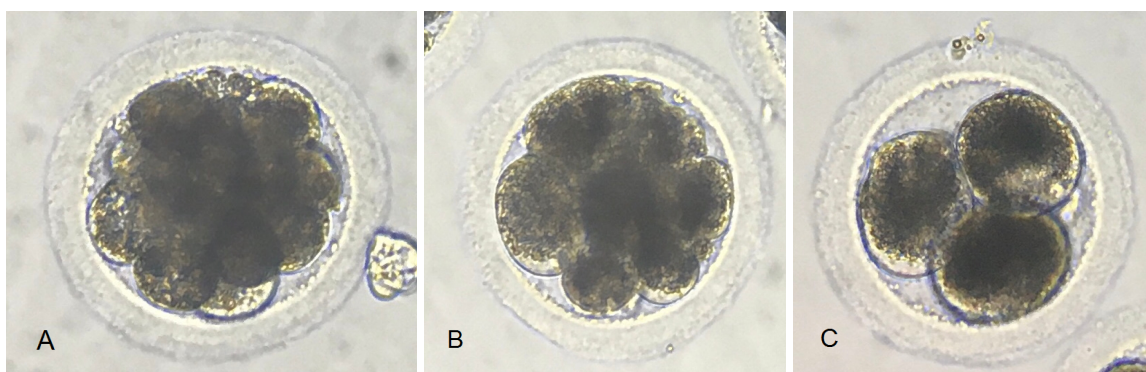


Figura 3. (A) Blastômero tipo A: presença de 8 ou mais blastômeros, dispostos de forma homogênea e bem definida; (B) Blastômero tipo B: presença de menos de 8 blastômeros, com disposição homogênea ou tamanhos variados; (C) Blastômero tipo C: presença de 4 células ou menos, com blastômeros homogêneos ou não. Fonte: Genetech Reprodução Animal Brasil.

4.4. Avaliação embrionária

Ao final do experimento, o grupo 1 (folículos < 10mm) atingiu o padrão em 3 embriões D7, o grupo 2 (folículos entre 10 e 20mm) 1 embrião em D8 e o grupo 3 (folículos entre 20 e 30mm) 1 embrião em D8 (figura 4). O restante dos clivados (23)

não tiveram desenvolvimento até o D10 e foram descartados. A relação entre número de oócitos e número de embriões está expressa na tabela 4 e a relação com os clivados está expressa na tabela 5.

Tabela 4. Número de embriões aptos para transferência em relação ao número de oócitos iniciais.

Grupo	Número de oócitos recuperados	Número de embriões desenvolvidos
<10mm	42	3 (7%)
10-20mm	15	1 (6%)
20-30mm	2	1 (50%)

Tabela 5. Número de embriões aptos para transferência em relação à taxa de clivagem tipo A nos grupos 1 e 2 e tipo B no grupo 3, em D4.

Grupo	Número de clivados tipo A em D4	Número de clivados total em D4	Embriões aptos para transferência
<10mm	7A	20	3 (42,85%* e 15%**)
	7B		
	6C		
10-20mm	4A	6	1 (25%* e 16,6%**)
	2B		
20-30mm	2B	2	1 (- e 50%**)

*Número de embriões aptos para transferência em relação aos clivados tipo A e **em relação aos clivados totais.

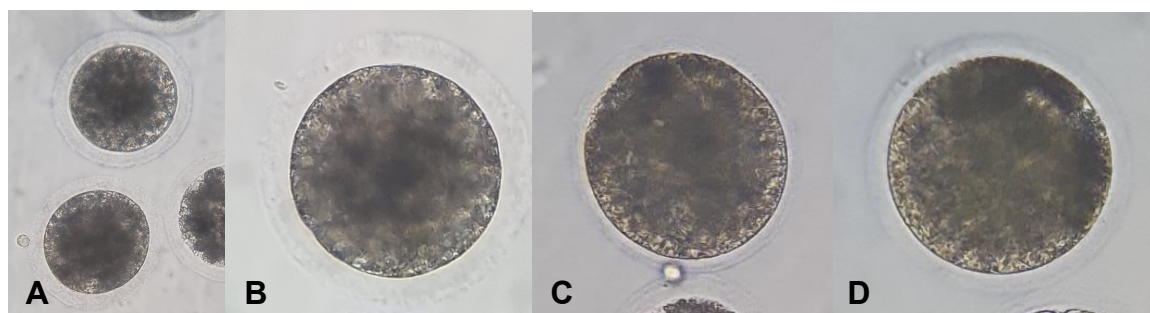


Figura 4. embriões classificados como aptos para serem transferidos. (A) e (B) embriões D7 oriundos de folículos menores que 10mm; (C) embrião oriundo de folículo entre 10 e 20mm; (D) embrião oriundo de folículo entre 20 e 30mm. Fonte: Genetech Reprodução Animal Brasil.

5. DISCUSSÃO

Na literatura, a taxa de recuperação oocitária é bem variada, sendo descrito de 8% a 85% (PYCOCK, 1996; CARNEVALE et al., 2001), sendo que grande parte possui maiores resultados na aspiração de folículos pré-ovulatórios (>30mm) (FRANZ, et al 2001; MEINTJES, et al 1995; BRÜCK, et al 1996). A recuperação oocitária de folículos menores que 30mm (64,36%;<10; 10-20 e 20-30) foi maior que a de folículos maiores que 30mm (0), podendo ser explicadas pela maior área folicular, o que dificulta a escarificação da parede além da experiência do aspirador com folículos de menores diâmetros. A taxa de recuperação de folículos com diâmetros menores que 10mm (68,8%) foi semelhante à relatada por Galli e colaboradores (2007;70%).

Neste estudo não houve a avaliação morfológica dos oócitos anteriormente à incubação pois não há diferenças no desenvolvimento embrionário de oócitos com células do cumulus compactas, expandidas ou desnudos, mesmo que durante a clivagem possam ter divergências (MERLO, et al 2018). Além disso, a reprodução *in vitro* em equinos ainda é limitada por questões técnicas e biológicas se comparada aos bovinos, como a alta aderência folicular do oócito (HAWLEY, et al 1995), sendo necessário o máximo aproveitamento dos oócitos coletados.

A escolha das éguas sem presença de corpo lúteo (CL) ativo foi devido à preferência do profissional por evitar a irrigação sanguínea da estrutura ao manipular o ovário e pelas melhores taxas de maturação relatadas em oócitos provenientes de folículos no período próximo ao desvio folicular, ou seja, final do diestro e/ou início do estro. (WALBORN, et al 2022).

Oócitos provenientes de folículos menores que 10mm apresentaram maiores taxas de imaturos e degenerados após as 30 horas da fase de maturação, resultado parecido com o encontrado por Bruck e colaboradores (1996). Del Campo e colaboradores (1995) relataram que a maior taxa de oócitos degenerados eram provenientes de folículos menores que 10mm (44%), semelhante às taxas do presente estudo (20,51%). No entanto, pela dificuldade de estabelecer protocolos consistentes de superovulação em éguas, a utilização de oócitos provenientes de folículos menores que 10mm, os quais costumam ser os mais abundantes no ovário equino, otimiza o processo. Dessa forma, a produção de embriões com esses oócitos é uma maneira de aproveitar ao máximo cada ciclo, permitindo um maior número de oócitos recuperados por aspiração.

O índice de maturação, avaliado pela presença do corpúsculo polar, foi maior em oócitos provenientes de folículos maiores que 20mm, assim como relatado por Bruck e colaboradores (1996), mas não é possível concluir em relação aos embriões aptos para transferência pelo baixo número a ser avaliado. Além disso, embriões provenientes de folículos com diâmetro menor que 10mm, mesmo que apresentem clivagem significativa na avaliação em D4 geram uma maior taxa de embriões imaturos ou degenerados, podendo ser devido à maior imaturidade dos mesmos.

A avaliação da taxa de clivagem é um indicador útil para avaliação da produção esperada de blastocistos (STOUT, 2020). Meintjes e colaboradores (1995) relataram uma correlação entre oócitos bons após maturação com uma taxa de 65% de clivagem e 38,5% deles geraram blastocistos ou mórulas.

Um ponto extremamente crítico no cultivo *in vitro* de embriões equinos é o desenvolvimento de um embrião apto para a transferência, o qual precisa possuir características morfológicas como homogeneidade da massa embrionária. O crescimento final do embrião, aproximadamente após o 6o dia, é afetado pelo ambiente e aparentemente ainda não possui todas as condições favoráveis que o *in vivo* poderia proporcionar, explicando a taxa de 42,85%, 25% e 50% de embriões oriundos de clivados ao 4o dia. Tremoleda e colaboradores (2003) demonstraram uma falha na formação da cápsula em embriões oriundos de PIV, a qual ocorre após o 6o dia e tem função de proteção e auxílio no reconhecimento materno.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que, apesar do baixo número de folículos aspirados acima de 20mm, os índices de recuperação oocitária foram semelhantes entre os grupos A (<10mm), B (10-20mm) e C (20-30mm). Já no grupo D, de folículos acima de 30mm, nenhum oócito foi recuperado. Na fase de maturação, os oócitos menores que 10mm apresentam maiores taxas de imaturidade ou degeneração e aqueles maiores que 20mm, tanto grupo B quanto C, obtiveram boas taxas de maturação (73,33% e 100%).

A avaliação da clivagem em D4 demonstrou piores resultados em blastocistos oriundos de oócitos menores que 10mm. Além disso, apenas 3 embriões (7%) desse mesmo grupo eram aptos para a transferência, reforçando as piores taxas.

Em síntese, é necessário um maior número de folículos aspirados para avaliações mais conclusivas a respeito da interferência do diâmetro folicular nas taxas de ICSI em equinos.

7. REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R. et al. **Ovogênese e foliculogênese em mamíferos.** Journal of Health Sciences, v. 15, n. 3, 2012.
- ALVES, E. A. & GUIMARÃES A.C.R. **Cultivo celular.** In. MOLINARO, E. M. et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde – Volume 2. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Ensino Joaquim Venâncio, Instituto Oswaldo Cruz, p. 218 – 219, 230 – 231, 2010.
- ANDERSON, E. & ALBERTINI, D.F. **Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary.** J Cell Biol 71:680–686, 1976
- ANDRADE, L.S. **O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino.** Fisiologia e manejo da reprodução eqüina. 2o ed, p.57-63,1986.
- AURICH, C. **Reproductive cycles of horses.** Animal Reproduction Science 124, 220–228, 2011.
- AX .R.L, et al. **Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen.** J Anim Sci, v.78, p.795- 798, 2000.
- AX, R.L. et. al. **Inseminação artificial.** In Hafez, B. Reprodução Animal, 7ed, p 531, 2004.
- BALL G.D., et. al. **Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: Morphology and chemistry.** Mol Cell Endocrinol 28 : 113-122, 1982.
- BECKERS, J.F. et al. **The ovarian follicle in cow: in vivo grow and in vitro culture.** Reprod. Dom. Anim. Berlin., v. 31, p. 543-548, 1996.
- BERTERO, A. et al. **Evaluation of equine oocyte developmental competence using polarized light microscopy.** Reproduction, v. 153, n. 6, p. 775-784, 2017.
- BERTOZZO, B. R., et al. **Estratégias e entraves na superovulação de éguas.** Veterinária em Foco, 10, 26-33, 2012.
- BÉZARD, J. **In vitro fertilization in the mare.** Proceedings International Scientific Conference Biotechnology Horse Reproduction, p.12, 1992.
- BLANCHARD, T.L. et al. **Reproductive anatomy of the mare.** Manual of Equine Reproduction Mosby, Ed. Elsevier, 2011.

BRÜCK, I. et al. **In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season.** Theriogenology, v. 46, n. 1, p. 75-84, 1996.

CARNEIRO, G.F. **Produção in vivo e in vitro de embriões em equinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 40(4), 158-166, 2016.

CARNEIRO, G.F., et. al. **The influence of insulin-like growth factor-i and its interaction with gonadotropins, estradiol and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in Equine Oocytes.** Biol Reprod, v.65, p.899-905, 2001.

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

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

CARNEVALE, E. M., et al. **Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares.** Reproduction, 128, 623-628, 2004.

CHOI, Y.H., HINDRICHS, K. **Vitrification of in vitro produced and in vivo recovered equine blastocysts in a clinical program.** Theriogenology ;87:p. 48-54, 2017.

CURCIO, B.R. **Maturação e vitrificação de ovócitos equinos incubados em meios contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhantes à insulina-I. 75f.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Pelotas: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2005.

CURCIO, B. R. et. al. **Recuperação de oócitos eqüinos com Cumulus oophorus compacto por curetagem da parede folicular.** Ciência Animal Brasileira, v. 7, n. 4, p. 417-422, 2006.

D'ALESSANDRIS, C.et. al. **Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: Plasminogen activator synthesis and matrix degradation.** Endocrinology, 142, 3033–3040, 2001.

DA SILVA RUA, M. A. et al. **Aspiração folicular, maturação in vitro e injeção intracitoplasmática em éguas.** PUBVET, v. 10, p. 190-270, 2015.

DE SANTIS, L. et al. **Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality.** *Reprod Biomed Online.*;11(1):36-42, 2005.

DEL CAMPO, M. R. et al. **Selection of follicles, preculture oocytes evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes.** *Theriogenology*, v. 43, p. 1141-1153, 1995.

DELL'AQUILA, M.E., **Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro.** *Biol. Reprod.* 61, 533-540, 1999.

DELL'AQUILA, M. E.; etl al. **Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulose cell apoptosis.** *Biology and Reproduction*, v. 68, p. 2065-2072, 2003.

DEMEESTERE, I., et al. **Effect of preantral follicle isolation technique on follicular growth, oocyte maturation and fertilization in vitro in the mouse.** *Hum. Reprod.* 15:(Abst. book 1), p.89–90, 2000.

DOWNS, S.M. **Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes.** *Theriogenology*, v. 39, p. 65 – 79, 1993.

DUCHEYNE, K.D. et. al. **In vitro production of horse embryos predisposes to micronucleus formation, whereas time to blastocyst formation affects likelihood of pregnancy.** *Reproduction, Fertility and Development*, 31, 1830–1839, 2019.

EBNER, T., et al. **Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development.** *Fertil Steril.* ;83(6):1635-40,2005.

EBNER, T., et. al. **Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI?** *Reprod Biomed Online.*;12(4):507-12. 2006.

FERNANDES, C. B. **Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio do crescimento eqüino por meio da transferência de ovócito.** 129 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Veterinária, Botucatu, 2004.

FIGUEIREDO, J.R. et. al. **Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries.** *Theriogenology* 1993;40:789–99.

FRANZ, L.C. et al. **Collection and in vitro maturation of equine oocytes from estrus, diestrus and pregnant mares.** Journal of Equine Veterinary Science v. 21, p. 26-32, 2001.

FREEDMAN, L. J. et. al. **Influence of Photoperiod and Ovaries on Seasonal Reproductive Activity in Mares.** Biology of Reproduction, Champaign, Ill.: Society for the Study of Reproduction, v. 20, n. 3, p. 567-574, 1979.

GALLI, C., et al. **Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer.** Animal Reproduction Science, 98, 39-55, 2007.

GALLI, C. et. al. **Male factors affecting the success of equine in vitro embryo production by ovum pickup-intracytoplasmic sperm injection in a clinical setting.** J Equine Vet Sci;43(Supplement):S6e10, 2016.

GASTAL, E.L.,et. al. **Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares.** Biol. Reprod. 57, 1320–1327, 1997.

GINTHER, O.J., **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.** 2nd edition. Cross Plains, Wisconsin, USA: Equiservices Publishing, 1992.

GINTHER, O. J. **Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus.** In: Proc Am Assoc Equine Pract. p. 73-104, 1998.

GINTHER, O.J. **Selection of the dominant follicle in cattle and horses.** Anim. Reprod. Sci., v. 60-61, p.61-79, 2000.

GINTHER, O. J et. al. **Follicle dynamics and selection in mares.** Animal Reproduction, Belo Horizonte, v. 1, n.1, p. 45-63, 2004.

GINTHER, O. J.; et. al. **Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares.** Biology of Reproduction, v. 77, n. 2, p. 202-8, 2007.

GORDON, I. **Recovering the primary oocyte.** In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: Raven Press, 1994. p. 71-82.

GRONDAHL, C. etl al. **In vitro production of equine embryos.** Biol Reprod, v.1, p.299-307, 1995.

HARTMAN, D.L.. **Embryo transfer.** Equine reproduction, Volume 2, No.Ed.2 pp.2871-2879 ref.17, 2011.

HAWLEY, L.R., et. al. **Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle.** Biol Reprod Mono 1:243– 252, 1995.

HINRICHS, K. ***In Vitro* Production of Equine Embryos: State of the Art.** Reprod Dom Anim 45 (Suppl. 2), 3–8, 2010.

HINRICHS, K. **Assisted reproduction techniques in the horse.** Reproduction, Fertility and Development. 25, 80–93, 2013.

HINRICHS, K., et. al. **Effects of holding time on meiotic and developmental competence of horse oocytes.** Theriogenology 58, 675–678, 2002.

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

HINRICHS, K. **The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare.** Theriogenology; 36:157-168, 1991.

KING, W.A. et al. **The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares.** Genome 29:679-682, 1987.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. & MAZIERO, R.R.D. **Control of oocyte maturation.** Anim. Reprod., v.11, n.3, p.150-158, 2014.

LAZZARI, G. et al. **Laboratory Production of Equine Embryos.** Journal of Equine Veterinary Science v. 89, 2020.

LEEMANS, B. et al. **Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization.** Reproduction, v. 152, n. 6, p. R233-R245, 2016

LIRA, R.A., et. al. **Transferência de embrião em equinos: revisão.** Acta Veterinaria Brasilica, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

MAHADEVAN, M. M. & TROUNSON, A.O. **Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization.** Fertility and sterility, v. 43, n. 2, p. 263-267, 1985.

MALPAUX, B.. et. al. **Melatonin and the seasonal control of reproduction.** Reprod Nutr Dev;39:355-366, 1999.

MARTINS, C. F.. **O impacto da transferência de embriões e da fecundação in vitro na produção de bovinos no Brasil.** EMBRAPA, 2010.

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

MERLO, B. et. al. **In vitro developmental competence of horse embryos derived from oocytes with a different corona radiata cumulus-oocyte morphology.** Animal Reproduction Science 198, 233–237, 2018.

MEZZALIRA, A. et al. **Metodologias de desnudamento parcial de oócitos bovinos maturados submetidos à vitrificação.** Archives of Veterinary Science, v. 10, n. 2, 2005.

MORRIS, L. H. A. **The development of in vitro embryo production in the horse.** Equine veterinary journal, v. 50, n. 6, p. 712-720, 2018.

MCKINNON, A.O. & SQUIRES, E.L. **Embryo transfer and related Technologies.** Current Therapy in Equine Reproduction. Philadelphia: W.B. Saunders., cap. 51, p.319-334, 2007.

OLIVEIRA, G.C. de, et al. **Criopreservação do sêmen equino: uma revisão.** Revista Brasileira Reprodução Animal, v. 37, n. 1, p. 23-28, 2013.

OLIVEIRA, V. M. et al. **Colagenases do pescado e suas aplicações industriais.** Pubvet, v. 11, p. 207-312, 2016.

OSÓRIO, J.P. et al. **Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão / UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v. 10, n. 2, p. 15-22, Out. 2008**

PALMER, E. et al. **Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes mares.** Journal of reproduction and fertility: Abstract Series, v. 35, p. 689- 690, 1987.

PALMER, E. et al. **In vitro fertilization in the horse. A retrospective study.** *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44, 375-84, 1991.

PIERSON, R. A. **Folliculogenesis and ovulation.** In: McKinnon AO, Voss JL. (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p.161–171, 1993.

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

RICK, W. **Trypsin**. Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition), Volume 2, 1974

ROCHA, R. M. P., et. al. **Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana**. Acta Veterinaria Brasilica, 5(2), 147-157, 2011.

RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra-som em equinos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006

SATUÉ, K. & GARDÓN, J. C. **A review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare**. Journal of Steroids and Hormonal Science, Los Angeles, v. 4, n. 2, p. 115-123, 2013.

SHABPAREH, V. et al. **Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro**. Theriogenology, v. 40, n. 6, p. 1161-1175, 1993.

SISK, C.L. & FOSTER, D.L. **The neural basis of puberty and adolescence**. Nature Neuroscience. 7: 1040–1047, 2004.

SOYAL, S. M. et. al. **A germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development**. Develop., v. 127, p. 4645-4655, 2000.

STOUT, T. A. E. **Clinical application of in vitro embryo production in the horse**. Journal of equine veterinary science, v. 89, p. 103011, 2020.

TELFER, E.E. & WATSON, E.D. **Method for isolating preantral follicles from mare ovaries**. J Reprod Fertil Suppl;56:447–53, 2000.

TREMOLEDA, J.L., et. al. **Organisation of the cytoskeleton during in vitro maturation of horse oocytes**. Mol. Reprod. Dev. 60, 260-269, 2001.

TREMOLEDA, J. L. et al. **Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation**. Biology of reproduction, v. 69, n. 6, p. 1895-1906, 2003.

TOKIWA, T. et al. **“Mechanism of cell dissociation with trypsin and EDTA.” Acta medica Okayama** 33 1, 1-4, 1979.

VAN DEN HURK, R. & ZHAO, J.. **Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles**. Theriogenology. v. 63. n. 6. p. 1717-1751, 2005.

VOGELSANG, M.M. et al. **Recovery of equine follicular oocytes by surgical and non-surgical techniques.** *Theriogenology*, v. 25, p. 208, 1986.

WALBORNN, S. R. et al. **Effect of day of estrus cycle at time of transvaginal follicle aspiration for oocyte recovery on rates of in vitro maturation and blastocyst production after intracytoplasmic sperm injection.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 260, n. 13, p. 1683-1689, 2022.

WASSARMAN, P.M.& ALBERTINI, D.F. **The mammalian ovum.** In: Knobil E, Neil JD (Eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, p.79-122, 1994.

YOKOO, M. etl al. **Identification of Hyaluronic Acid-Binding Proteins and Their Expressions in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes During In Vitro Maturation.** *Biology of Reproduction*, Volume 67, Issue 4, 1, Pages 1165–1171, 2002.

YUDIN, A. I. et. al. **Structure of the cumulus matrix and zona pellucida in the golden hamster: a new view of sperm interaction with oocyte-associated extracellular matrices.** *Cell Tissue Res*; 251:555–564, 1988.

ZHANG, J.J. et. al. **Recent studies on in vivo fertilization of in vitro matured horse oocytes.** *Equine Vet J*;8(Suppl.):101-104, 1989.