

Transferência de oócitos em equinos: revisão de literatura

Equine oocyte transfer: a review

Guilherme R. Couto¹; Guilherme R. Valle²

¹ Graduando do Curso de Medicina Veterinária da PUC Minas em Betim

² Professor do Departamento de Medicina Veterinária da PUC Minas, Rua do Rosário 1.081, Bairro Angola, CEP 32.630-000, Betim, Minas Gerais, Brasil, (31) 3539-6854, guilhermerv@pucminas.br

ABSTRACT: Methods for collection and transfer of equine oocytes have been developed, resulting in new clinical and scientific opportunities. The Oocyte Transfer (OT) is a technique that has been improved since the 1980's. The OT make possible gestation of mares with oviduct and uterine associated problems that can't get pregnant by natural or by other usual reproductive techniques. This technique consists of collecting oocytes from donors and their transfer into the oviducts of the recipient mares, whose are inseminated. In the Gametes Intrafallopian Transfer (GIFT), a variation of the OT technique, the sperm are transferred along with the oocyte to the recipient mares oviducts, combining the use of low quality semen or reduced semen doses. These techniques have different results yet, and their uses are still restricted to scientific research and big equine reproduction centers.

Key words: Equine. Oocyte transfer. GIFT.

RESUMO: Métodos de coleta e transferência de oócitos equinos têm sido desenvolvidos, resultando em novas possibilidades clínicas e científicas. A Transferência de Oócitos (TO) é uma técnica que vem sendo aprimorada desde a década de 1980. Possibilita contornar problemas reprodutivos associados às tubas uterinas e útero, viabilizando gestações em éguas que não seriam obtidas por meios naturais ou por outras técnicas reprodutivas usuais. A técnica consiste em coletar oócitos de doadoras e transferi-los para as tubas uterinas de receptoras, as quais serão inseminadas artificialmente. Na Transferência Intrafalopiana de Gametas (GIFT), variação da TO, os espermatozoides são transferidos juntamente com os oócitos para as tubas uterinas das receptoras, permitindo associar o uso de garanhões com sêmen de baixa qualidade ou doses inseminantes reduzidas. Estas técnicas apresentam resultados diversos, sendo seu uso ainda restrito a pesquisas científicas e a grandes centros de reprodução equina.

Palavras-chave: Equino. Transferência de oócitos. GIFT.

INTRODUÇÃO

A Transferência de Oócitos (TO) tem sido utilizada para a obtenção de gestações de éguas subférteis com várias patologias no trato reprodutivo. A primeira TO em equinos bem sucedida foi descrita há mais de vinte anos, com o nascimento de um potro, no final da década de 1980 (CARNEVALE, 2004). Entretanto, até meados da década de 1990, não se obtinham boas taxas de desenvolvimento embrionário na TO, contudo, Coutinho da Silva et al. (2002) modificaram este panorama, quando obtiveram taxa de 92% de gestação utilizando esta técnica. A TO não foi usada em programas comerciais até o final da década de 1990, apresentando taxas de recuperação de oócitos variáveis de acordo com a experiência do técnico (CARNEVALE, 2004).

A TO também pode auxiliar no uso de garanhões com baixa qualidade de sêmen, através da Transferência Intrafalopiana de Gametas (GIFT), pela qual os espermatozoides são depositados juntamente com o oócito da doadora na ampola ou infundíbulo de uma das tubas uterinas da égua receptora. Além de permitir gestações antes inviáveis, a TO e a GIFT são ferramentas importantes na experimentação científica sobre a maturação e fertilização de oócitos em equinos (CARNEVALE et al., 2000).

Uma limitação ao uso da TO é seu elevado custo. Embora não tenham sido encontradas referências brasileiras, segundo a Colorado State University (2012), o investimento é de aproximadamente sete mil e quatrocentos dólares por oócito transferido, nos Estados Unidos da América.

A TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS

A TO consiste em transferir oócitos coletados de folículos ovarianos de uma égua doadora para as tubas uterinas de éguas receptoras (HINRICHES; PROVOST; TORELLO, 2000; CARNEVALE et al., 2004). Estes oócitos devem estar em um estágio de desenvolvimento adequado, o que pode ser alcançado *in vivo* ou *in vitro*, e então são transferidos para as éguas receptoras, as quais serão inseminadas artificialmente. Assim, os oócitos das doadoras serão fertilizados naturalmente nas tubas uterinas das receptoras, dando origem à gestação (SILVA et al., 2002; CARNEVALE et al., 2004; LANDIM-ALVARENGA, 2011).

McKinnon et al. (1987) sugere que nas éguas subférteis e inférteis as falhas gestacionais ocorram, em parte, decorrentes de problemas entre a fertilização e a chegada do embrião ao útero. Assim, a TO tem sido utilizada para se obter potros de éguas com repetidos resultados insatisfatórios em programas de transferência de embriões (TE) (SILVA et al., 2002; CARNEVALE, 2004; SILVA, 2008; LANDIM-ALVARENGA, 2011).

A TO amplia as possibilidades de utilização de material genético, pois podem ser transferidos oócitos coletados de folículos de éguas vivas, eutanasiadas ou que morreram naturalmente (CARNEVALE, 2004). Os oócitos também podem ser coletados de éguas gestantes que estejam no terço inicial da gestação (MARI et al., 2005), entre o 21º ao 150º dias de gestação (PURCELL et al., 2007).

Em éguas vivas, os oócitos podem ser recuperados de folículos ovarianos pré-ovulatórios dominantes por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou por punção do folículo através de agulha introduzida pelo flanco (BRINSKO et al., 2011a). Também podem ser recuperados de folículos imaturos, neste caso apenas através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia vaginal, por serem estes folículos muito pequenos. Mari et al. (2005) mostraram que em folículos com diâmetro menor que dois milímetros a taxa de recuperação de oócitos foi inferior em relação a coletas feitas em folículos com maior diâmetro (7,6% e 28,6%, respectivamente).

Ao aspirar folículos de éguas gestantes, Purcell et al. (2007) verificaram que com o avançar da gestação o número de oócitos recuperados de folículos pequenos (10-20 mm) não variou, mas o número de recuperados de folículos grandes (>20 mm) sofreu queda entre o 25º e 55º dias de gestação. Sendo ainda imaturos, nestes casos é necessária maturação *in vitro* dos oócitos (BRINSKO et al., 2011a), técnica de baixa eficiência (FERNANDES et al., 2004).

Segundo Brinsko et al. (2011a), a TO pode não ser a técnica de escolha quando se tem um grande número de folículos ovarianos, pois desta forma seria coletada uma grande quantidade de oócitos imaturos. Melhor alternativa a superovulação e coleta dos oócitos antes que a ovulação ocorresse (FARIA; GRADELA, 2010). Apesar de Brück, Synnestvedt e Greve (1997) não terem encontrado diferença na taxa de recuperação de oócitos em éguas tratadas com extrato hipofisário equino (EPE) ou hormônio folículo estimulante (FSH), Squires, McCue e Hudson (2004) relataram que o uso de EPE é mais eficiente, permitindo aumentar o número de folículos pré-ovulatórios disponíveis para a aspiração (BRINSKO et al., 2011a).

Oócitos têm sido coletados de várias maneiras, como por laparotomia, punções pelo flanco ou aspiração guiada por ultrassonografia transvaginal, sendo os dois últimos os métodos mais comumente utilizados (VOGELSSANG et al., 1988; CARNEVALE, 2004; SILVA, 2008). No início dos estudos, McKinnon et al. (1987) e Vogelsang et al. (1988) mostraram que a recuperação de oócitos foi mais eficiente pela incisão da parede abdominal e exposição do ovário do que pela punção pelo flanco. Porém a cicatriz da incisão limitaria o número de procedimentos em uma mesma égua.

A aspiração de oócitos pelo flanco ocorre pela fixação dos ovários por meio de palpação retal e perfuração da parede abdominal utilizando-se um trocarer. O ovário é manipulado de maneira que o folículo fique posicionado próximo à extremidade do trocarer e uma agulha (calibre 12 a 15G) seja introduzida por ele até perfurar o folículo, atingindo seu antro. Procedese a aspiração do líquido folicular e lavagem da cavidade folicular a fim de capturar o oócito, utilizando seringas de grande volume ou bomba de vácuo. Para a lavagem do antro utiliza-se 50-100 mL de meio específico, como solução de *Dulbecco's phosphate-buffered* (DPBS) modificado ou outra solução de lavagem de embrião contendo heparina (10 UI/mL) para prevenir coagulação (MCKINNON et al., 1987; CARNEVALE, 2004).

Para a aspiração transvaginal guiada por ultrassonografia, uma probe linear ou microconvexa é colocada em suporte plástico contendo a agulha para a aspiração dos oócitos. O conjunto é introduzido pela vulva até atingir o fundo da vagina, e por via retal o ovário é manipulado, de modo a posicioná-lo na extremidade da probe do aparelho de ultrassom. A agulha é então forçada para frente até perfurar a parede da vagina e penetrar no folículo. O fluido folicular é então aspirado, utilizando-se uma bomba de vácuo com pressão de 150 mm Hg ou seringas de grande volume. Depois de removido o líquido folicular, o antro folicular pode ser lavado da mesma forma descrita anteriormente (CARNEVALE, 2004).

Segundo Mari et al. (2005), a lavagem do antro folicular em seguida à aspiração faz com que haja maior recuperação de oócitos. Já Brück, Synnestvedt e Greve (1997) ressaltam que o uso de bomba de vácuo ou seringa para aspiração folicular não interfere na taxa de recuperação de oócitos. A aspiração guiada por ultrassonografia tem a vantagem de ser um procedimento menos invasivo, permitindo repetidas aspirações (MARI et al., 2005; PURCELL et al., 2007; SILVA, 2008). Aspirações foliculares repetidas com intervalos pequenos, como de seis dias, apresentam resultados menos satisfatórios na obtenção de oócitos quando comparadas a aquelas com intervalo de 23 dias (BRÜCK; SYNNESTVEDT; GREVE, 1997).

Previamente à aspiração folicular, a doadora é colocada em tronco de contenção, quando é realizado o esvaziamento retal e a higienização perianal (RODRIGUES, 2006). Sedação e analgesia devem ser promovidas utilizando-se, por exemplo, o protocolo anestésico com cloridrato de xilazina intra-venosa (i.v.) a 0,3 mg/kg (CARNEVALE et al., 2004), 0,4 mg/kg (SILVA et al., 2002) ou 200 mg (RODRIGUES, 2006) associada a tartarato de butorfanol i.v. a 0,01 mg/kg (COUTINHO DA SILVA et al., 2002, CARNEVALE et al., 2004) ou 10 mg/animal

(RODRIGUES, 2006). Para que haja relaxamento da musculatura retal, utiliza-se brometo de hioscina associado a dipirona sódica i.v. a 50 mg (RODRIGUES, 2006), ou brometo de propantelene a 0,045 mg/kg i.v. (CARNEVALE *et al.*, 2004) ou a 0,05 mg/kg (SILVA *et al.*, 2002). A anestesia epidural pode ser utilizada aplicando-se 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (RODRIGUES, 2006).

Por serem células únicas, os oócitos são mais sensíveis que embriões a mudança de osmolaridade do meio, danos físicos e mudanças de temperatura. O meio e os equipamentos utilizados para manuseá-los devem, portanto, ser mantidos à temperatura de 38-39°C (SILVA, 2008).

O complexo cumulus-oócito é de fácil identificação por meio de lupa, por ser grande (>1 mm de diâmetro) e translúcido. Geralmente, quando os oócitos são coletados de folículos pré-ovulatórios se encontram na fase de metáfase I ou II (CARNEVALE, 2004). Mantidos em placas de Petri em meio de cultura, as células do cumulus são removidas por micromanipulação com agulhas antes da TO (SCOTT *et al.*, 2001), deixando os oócitos livres.

Éguas doadoras induzidas a ovulação com gonadotrofina coriônica humana (hCG) e que possuam todos os requisitos para adequada indução, isto é, folículo com diâmetro maior que 35 mm, edema uterino e útero e cérvix relaxados (CARNEVALE *et al.*, 2004), normalmente ovulam em até 48 horas (FARIA; GRADELA, 2010). Por isso, oócitos coletados 36 horas após a administração de hCG estão prontos para serem transferidos para a tuba da égua receptora. Já oócitos coletados com 24 horas após a administração do hCG geralmente são cultivados *in vitro* por 12-16 horas antes da transferência. TCM-199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 0,2 mM de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina tem sido um meio de cultura utilizado para maturação dos oócitos à temperatura de 38,2-39,0 °C e atmosfera de 5 ou 6 % de CO₂ (CARNEVALE, 2004). Segundo Coutinho da Silva *et al.* (2002) e Carnevale (2004), os dois tipos de procedimentos apresentam taxas de gestação semelhantes. Já para oócitos coletados durante o diestro, SCOTT *et al.* (2001) indica a maturação *in vitro* em um meio de cultivo contendo TCM-199, 0,2 mM de piruvato, 1 mM de glutamina, 25 mM de bicarbonato, 10% de soro fetal bovino, 15 ηg/mL de FSH, 1 µg/mL de hormônio luteinizante (LH), 1 µg/mL de estradiol 17-β, 50 g/mL de gentamicina e incubação por 36-38 horas à temperatura de 38,5 °C, em atmosfera de 5% de CO₂.

A condição do cumulus determina o período de cultivo *in vitro*. Para Carnevale, Alvarenga e Squires (1999), oócitos com cumulus completamente expandido podem ser transferidos para a receptora após aproximadamente uma hora e meia de cultivo; oócitos com expansão moderada após aproximadamente 12 horas; e oócitos com o cumulus compacto após 25 horas de cultivo antes de serem transferidos para a receptora.

Depois do período de coleta e preparação dos oócitos, deve-se proceder à TO propriamente dita. Para isto, as receptoras são mantidas em tronco de contenção sob sedação e analgesia realizadas de forma semelhante às doadoras (SILVA *et al.*, 2002; CARNEVALE *et al.*, 2004). A técnica é realizada cirurgicamente por laparotomia através do flanco (BRINSKO *et al.*, 2011a). O local de incisão deve ser tricotomizado e feita a antisepsia (CARNEVALE *et al.*, 2004). A incisão vertical da pele deve ser feita entre a última costela e a tuberosidade coxal (SILVA *et al.*, 2004; BRINSKO *et al.*, 2011b) numa extensão aproximada de 15 cm, as camadas musculares devem ser separadas por dissecação romba abrindo espaço para o acesso à cavidade abdominal (SILVA *et al.*, 2002; CARNEVALE *et al.*, 2004). Incisado o peritônio parietal, o ovário e a tuba uterina são exteriorizados sendo identificado o infundíbulo (SILVA *et al.*, 2002; CARNEVALE *et al.*, 2004; BRINSKO *et al.*, 2011a). Um ou mais oócitos são colocados com meio de cultivo em uma pipeta de vidro polido que é introduzida através do infundíbulo por 2 a 3 cm, até atingir a ampola, onde são depositados. Em seguida, o ovário e a tuba são retornados à cavidade abdominal e é suturada a incisão (BRINSKO *et al.*, 2011a).

Duas inseminações artificiais (IAs) intrauterinas são geralmente realizadas, uma 12 horas antes da TO e outra duas horas após (CARNEVALE *et al.*, 2004). Uma única IA antes da

TO foi utilizada no estudo de Scott *et al.* (2001), indicando não ser a segunda necessária se o sêmen estiver dentro dos padrões de normalidade.

Terminada a TO, as receptoras recebem 2 g de fenilbutazona i.v. por três dias consecutivos além de antibioticoterapia (penicilina G procaína, 20.000 UI/kg i.m. 24/24 horas) durante o procedimento e por mais cinco dias (SILVA *et al.*, 2002; 2004). Caso haja acúmulo de líquido ou ar intrauterino após as IAs, pode ser utilizada ocitocina (20 UI i.m.) 12 horas após a TO (SILVA *et al.*, 2002). Se persistir o acúmulo nos próximos três dias, é recomendada lavagem uterina com solução salina isotônica (HINRICHS; PROVOST; TORELLO, 2000).

Ao usar receptoras cíclicas, devem-se sincronizar os folículos em crescimento das doadoras e receptoras de forma a serem responsivos à indução de ovulação no mesmo dia (SILVA *et al.*, 2002; CARNEVALE, 2004). Os oócitos devem ser aspirados de 24 a 35 horas após a administração de hCG ou deslorelina (BRINSKO *et al.*, 2011a). Nas receptoras os folículos dominantes devem ser aspirados antes que ovulem para que não haja fecundação de seus próprios oócitos (HINRICHS; PROVOST; TORELLO, 2000; BRINSKO *et al.*, 2011a). Entretanto, só serão aspiradas e inseminadas se forem obtidos oócitos viáveis da doadora, a fim de se evitar um procedimento desnecessário (BRINSKO *et al.*, 2011a). Haverá formação de corpo lúteo funcional na receptora, desde que os folículos aspirados nela tenham diâmetro maior que 25 mm (HAYNA; MADILL; TROEDSSON, 2004).

Quando não se realiza a aspiração do oócito da receptora este poderá ser fertilizado, o que será evitado com o uso da GIFT na tuba uterina oposta ao seu folículo pré-ovulatório (CARNEVALE *et al.*, 2004). Uma alternativa para se evitar este inconveniente é o uso de receptoras acíclicas (HINRICHS; PROVOST; TORELLO, 2000).

Transferência Intrafalopiana de Gametas (GIFT)

Em situações em que é desejado o uso de ganhões com baixa qualidade de sêmen, pode-se fazer o uso da GIFT, que consiste na realização da TO associada a espermatozoides (SILVA *et al.*, 2002; 2004). Esta técnica faz com que quantidades reduzidas de espermatozoides possam ser usadas, em torno de 200 a 500 mil espermatozoides viáveis (CARNEVALE, 2004; SILVA *et al.*, 2004; BRINSKO *et al.*, 2011a; LANDIM-ALVARENGA, 2011). Em função disso, a GIFT pode ser usada para produção de gestações com ganhões de baixa qualidade seminal e com sêmen congelado ou sexado (CARNEVALE, 2004; SILVA *et al.*, 2004).

O procedimento adotado na GIFT é praticamente o mesmo da TO, porém os espermatozoides são acrescidos ao meio de cultura contendo os oócitos cinco minutos antes da TO. Os espermatozoides, oócitos e o meio de cultura são colocados em conjunto na pipeta que será introduzida pelo infundíbulo da tuba uterina, depositados na ampola (SILVA *et al.*, 2002).

SELEÇÃO DE DOADORAS

Geralmente as éguas doadoras de oócitos são aquelas de elevado valor econômico e zootécnico (SILVA, 2008; LANDIM-ALVARENGA, 2011; ALVARENGA; CARMO, 2012) selecionadas por possuírem histórico reprodutivo insatisfatório em programas de TE, alta incidência de falhas de ovulação e patologias adquiridas nas tubas uterinas, corpo e cornos uterinos e cérvix (CARNEVALE, 2004; SILVA, 2008; BRINSKO *et al.*, 2011a; LANDIM-ALVARENGA, 2011; ALVARENGA; CARMO, 2012).

Éguas com idade avançada, entre 18 e 20 anos, são as principais candidatas a TO, pois seus oócitos apresentam baixo índice de fertilização, sendo de aproximadamente 30% (ALVARENGA; CARMO, 2012). Alguns estudos sugerem que a ovulação pode não ocorrer ou os oócitos não conseguem entrar nas tubas uterinas dessas éguas mais velhas (CARNEVALE, 2007). Brinsko, Ball e Ellington (1995) mostraram que não há diferença entre éguas de idades

diferentes com relação ao número de folículos e de oócitos coletados por ovário.

Animais que vieram a óbito naturalmente ou foram eutanasiados também podem ter seus ovários removidos e realizada a coleta de todos os oócitos existentes (HINRICHS *et al.*, 2002; CARNEVALE, 2004). Segundo Brinsko *et al.* (2011a), usando oócitos coletados de ovários processados com menos de uma hora *post mortem* tem-se melhores resultados quando comparado com ovários processados com 26 horas *post mortem* (36% e 10%, respectivamente).

SELEÇÃO DE RECEPTORAS

Vários fatores são levados em consideração na escolha das éguas receptoras, como idade, histórico reprodutivo, conformação perineal e avaliação da genitália interna, que deve incluir palpação, ultrassonografia, cultura, citologia e biopsia. Fatores como porte físico, temperamento, escore corporal e histórico de parto prévio também são de extrema importância (MCKINNON; SQUIRES, 2007). Nas receptoras será necessário ocorrer: transporte normal dos espermatozoides até as tubas uterinas; recuperação adequada após a endometrite pós-coito; transporte e suporte adequado dos oócitos transferidos; fertilização; transporte embrionário na tuba uterina e útero e; finalmente, desenvolvimento embrionário e fetal adequados até o parto (HINRICHS; PROVOST; TORELLO, 1999).

As receptoras podem ser cíclicas ou acíclicas. As cíclicas devem ter ciclos estrais normais e ter a ovulação sincronizada com a data da coleta da doadora (CARNEVALE *et al.*, 2004). As acíclicas podem estar em anestro ou período de transição (com folículos menores que 25 mm) submetidas a tratamento hormonal com estradiol-17 β (E₂) e progesterona (P₄), semelhante ao utilizado para TE, conforme protocolo descrito por Brinsko *et al.* (2011a). É necessário que o tratamento hormonal possibilite que essas éguas tenham uma concentração plasmática de P₄ mínima de 0,4 η g/mL para manutenção da gestação (HINRICHS; PROVOST; TORELLO, 2000). O primeiro nascimento relatado de um potro proveniente de TO em receptora acíclica ocorreu em 1998 (HINRICHS; PROVOST; TORELLO, 1999). Para Carnevale (2004), as taxas de gestação em programas comerciais de TO são praticamente as mesmas quando se comparam receptoras cíclicas com acíclicas (53 e 39%, respectivamente).

RESULTADOS OBTIDOS E FATORES QUE OS AFETAM

Em 1988 foi relatado o nascimento do primeiro potro proveniente da TO, do total de 15 TOs realizadas (7%). Entretanto, o primeiro relato de taxa de nascimento satisfatória foi em 1995, quando foram transferidos oócitos de doadoras jovens, obtendo-se taxa de 92% de gestação (CARNEVALE, 2004). Em um estudo feito por Carnevale, Alvarenga e Squires (1999), a taxa de recuperação de oócitos por ciclo foi de 85%, porém a taxa de gestação foi de 23%.

No estudo de Carnevale *et al.* (2004) foram obtidos 32 embriões de 44 oócitos transferidos (73%), sendo numa estação reprodutiva obtidas uma ou mais gestações de pelo menos 80% das doadoras de oócitos com histórico reprodutivo ruim por mais de sete anos. No estudo de Coutinho da Silva *et al.* (2002) obteve-se taxa de gestação em 57 e 75% de TOs realizadas com oócitos coletados, respectivamente, 22 e 33 horas após administração de hCG nas doadoras e realizada IA intrauterina nas receptoras 12 horas antes e/ou duas horas depois da TO.

O fator que mais influência na taxa de sucesso da TO parece ser a idade da doadora. As taxas de gestação após a TO de doadoras jovens (6-10 anos) são maiores que as de doadoras velhas (20-26 anos) (BRINSKO; BALL; ELLINGTON, 1995; CARNEVALE; ALVARENGA; SQUIRES, 1999; CARNEVALE, 2004). Suspeita-se que oócitos de éguas com idade superior a 15 anos precisem de um período mais longo para alcançar a metáfase II se comparados aos de

éguas mais jovens. Esse atraso poderia contribuir para uma maior taxa de perda embrionária precoce observada em éguas mais velhas (BRINSKO; BALL; ELLINGTON, 1995), assim como menor taxa de gestação na TO (CARNEVALE, 2004).

Durante a estação de monta, Carnevale *et al.* (2001) relataram que gestações foram conseguidas em três de quatro doadoras com até 16 anos de idade após uma única tentativa. Em contraste, apenas uma gestação foi conseguida de seis doadoras com mais de 20 anos de idade também após uma única tentativa. Para uma das doadoras mais velhas não se obteve resultado positivo mesmo depois de várias tentativas; enquanto nas outras mais velhas precisaram de duas a quatro tentativas até se obter uma gestação. Além da menor taxa de concepção em éguas mais velhas, no estudo de Carnevale *et al.* (2005) observou-se maior taxa de perda embrionária após 16 dias de gestação nessas éguas.

No mesmo estudo de Carnevale *et al.* (2005), no qual se obteve uma taxa de desenvolvimento embrionário em 38% dos oócitos transferidos (207/548) no 16º dia pós TO, verificou-se que o intervalo entre a administração do hCG e a TO afeta a taxa de gestação. Intervalo menor que 32 horas resultou em taxa menor (16%) do que em intervalos maiores (44%). Ainda no mesmo estudo, quando comparadas receptoras que receberam um ou dois oócitos na mesma tuba uterina, não houve diferença nas taxas de gestação (40% e 43%, respectivamente).

Apesar de oócitos maturados *in vitro* ou na tuba uterina terem resultado em taxas de gestação semelhantes, 57% e 43% respectivamente (CARNEVALE *et al.*, 2000), ovócitos oriundos de folículos pré-ovulatórios parecem ser mais eficientes. Scott *et al.* (2001) avaliaram o desenvolvimento embrionário de oócitos em diferentes condições, notando-se que os coletados de folículos pré-ovulatórios foram mais eficientes do que os coletados de folículos de éguas em diestro e maturados *in vitro* ou nas tubas uterinas, e os coletados de ovários provenientes de abatedouros (82%, 7%, 0% e 10%, respectivamente).

Fato interessante foi mostrado por Hinrichs, Provost e Torello (2000). Dos cinco potros nascidos no experimento utilizando receptoras em anestro ou transição tratadas com E₂ e P₄, todos foram machos, e de dois produtos nascidos anteriormente, utilizando receptoras cíclicas, foram um macho e uma fêmea. Segundo os autores, se o mesmo se repetisse, poder-se-ia sugerir que o tratamento hormonal das éguas tivesse afetado a seleção espermática na tuba uterina. Entretanto, não houve relato posterior de fato semelhante.

No estudo de Silva *et al.* (2004) foram testados diferentes tipos de sêmen e técnicas de IA. Houve desenvolvimento embrionário similar quando se utilizou sêmen fresco por via intrauterina (57%) e por via intratubária (82%). Já com o uso do sêmen resfriado, a via intrauterina mostrou melhor resultado (83%) que a via intratubária (25%). Entretanto, quando se utilizou sêmen congelado, a via intrauterina não foi utilizada, mas a via intratubária (GIFT) resultou somente 8% de desenvolvimento embrionário.

Com relação ao tipo de sêmen utilizado, no estudo de Carnevale *et al.* (2005) as taxas de gestação foram similares quando comparado o uso de sêmen fresco, resfriado e congelado (41%, 48% e 22%, respectivamente), bem como quando comparado sêmen fresco com motilidade progressiva maior ou menor que 50% (48% e 44%, respectivamente). Entretanto, na GIFT com sêmen resfriado e congelado obtiveram-se taxas de gestação de 25 e 8%, respectivamente (CARNEVALE, 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da TO e da GIFT serem técnicas em desenvolvimento há mais de 20 anos e mostrarem alguns resultados satisfatórios, ainda se faz necessário maior desenvolvimento das técnicas. Com seu aprimoramento, a utilização dessas técnicas no campo poderá ser intensificada, viabilizando a produção de potros oriundos de animais até então inférteis. Além

disso, a preservação de gametas poderá encontrar, no futuro, a possibilidade de sua utilização com maior segurança na obtenção de filhos de pais já falecidos.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T. **Bioteecnologias em reprodução eqüina**: o que há de novo para o veterinário de campo? Disponível em: <<http://www.hippusgenesis.com.br/bibliotecas/arquivos/4e732ced3463d06de0ca9a15b6153677>>. Acesso em: 30 mar. 2012.

BRINSKO, S. P.; BALL, B. A.; ELLINGTON, J. E. In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. **Theriogenology**, v.44, n.4, p.461-469, 1995.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. et al. Assisted reproductive technology. In: BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. et al. **Manual of equine reproduction**. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011a. p.302-312.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. et al. Reproductive anatomy of the mare. In: BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. et al. **Manual of equine reproduction**. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011b. p.1-9.

BRÜCK, I.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and fsh-treated mares. **Theriogenology**, v.47,n.6, p.1157-1167, 1997.

CARNEVALE, E. M. Collection and transfer of oocytes in mares. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.289-295.

CARNEVALE, E. M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.617-624, July 2004.

CARNEVALE, E. M.; ALVARENGA, M. A.; SQUIRES, E. L. **Use of oocyte transfer in commercial breeding program to obtain pregnancies from mares with reproductive pathologies**. Proceedings of Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 1999. v.45, p.200-202. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/1999/200.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2012.

CARNEVALE, E. M. et al. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. **Theriogenology**, v.54, n.6, p.981-987, Oct. 2000.

CARNEVALE, E. M. et al. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipient for oocyte transfer. **Animal Science Reproduction**, v.68, n.3/4, p.305-314, Dec. 2001.

CARNEVALE, E. M. et al. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. **Reproduction**, v.128, n.5, p.623-628, Nov. 2004.

CARNEVALE, E. M. et al. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.519-527, Aug. 2005.

EQUINE REPRODUCTION LABORATORY. **CSU/ERL oocyte transfer and ICSI agreement 2012 breeding season**. Colorado: Colorado State University, 2012. Disponível em: <http://www.cvmbs.colostate.edu/bms/erl/PDF/OT_contract_2012.pdf> Acesso em: 20 nov. 2012.

- FARIA, D. R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.114-122, abr./jun. 2010.
- FERNANDES, C. B. et al. The use of oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6, 2004. **Proceedings...** Rio de Janeiro: R & W Communications, 2004. p.30-32.
- HAYNA, J. T., MADILL, S., TROEDSSON, M. H. The effect of transvaginal follicular aspiration on corpus luteum formation in mares. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6, 2004. **Proceedings...** Rio de Janeiro: R & W Communications, 2004. p.90-91.
- HINRICHS, K. et al. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation and sperm calcium ionophore treatment and comparison with rates fertilization in vivo after oviductal transfer. **Biology of Reproduction**, v.67, n.1, p.256-262, Jul. 2002.
- HINRICHS, K.; PROVOST, P. J.; TORELLO, E. M. Birth of a foal after oocyte transfer to a nonovulating hormone treated recipient mare. **Theriogenology**, v.51, n.7, p.1251-1258, May 1999.
- HINRICHS, K.; PROVOST, P. J.; TORELLO, E. M. Treatments resulting in pregnancy in nonovulating, hormone-treated oocyte recipient mares. **Theriogenology**, v.54, n.8, p.1285-1293, Nov. 2000.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C. Biotecnologia da reprodução em equinos. In: SIMPÓSIO DE EQUIDECULTURA, 3, 2011. **Anais...** Viçosa: UFV, 2011, p.103-108.
- MARI, G. et al. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v.88, n.3/4, p.299-308, Sept. 2005.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related technologies. In: SAMPER, A. O.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction**. Sant Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.319-334.
- MCKINNON, A. O. et al. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. **Equine Veterinary Science**, v.6, n.6, p.306-309, 1987.
- PURCELL, S. H. et al. Aspiration of oocyte from transitional, cycling and pregnant mares. **Theriogenology**, v.100, n.3/4, p.291-300, Aug. 2007.
- RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultrassom em equinos**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre.
- SCOTT, T. J. et al. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro or within oviducts of mares. **Theriogenology**, v.55, n.3, p.705-715, Feb. 2001.
- SILVA, M. A.C. When should a mare go for assisted reproduction? **Theriogenology**, v.70, n.3, p.441-444, Aug. 2008.
- SILVA, M. A. C. et al. Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. **Journal of Animal Science**, v.80, n.5, p.1275-1279, May 2002.

SILVA, M. A.C. et al. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intaoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v.61, n.4, p.705-713, Feb. 2004.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; HUDSON, J. Advances in equine superovulation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6, 2004. **Proceedings ...** Rio de Janeiro: R & W Communications, 2004. p.71-73.

VOGELSANG, M. M. et al. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v.29, n.5, p.1007-1018, 1988.