

## TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS EM ÉGUAS

Bruna Marcelle Martins de Oliveira<sup>1</sup>  
Carina de Fátima Guimarães<sup>1</sup>  
Juliana Nascimento Bittar<sup>2</sup>  
Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1</sup>  
Claudia Barbosa Fernandes<sup>1</sup>

### RESUMO

Os progressos das biotécnicas da reprodução nos equinos são lentos quando comparados a outras espécies. Isso se deve primariamente ao grande número de particularidades anatomofuncionais inerentes à espécie e também à escassa disponibilidade de material para pesquisa. Produtos advindos de fêmeas de elevado padrão genético, por meio da conservação dos ovários, tornaram-se possíveis, determinando a continuidade do material genético em técnicas de Maturação *in vitro* (MIV) e Transferência de Oócitos (TO). As potenciais candidatas a doadoras de ovócitos são as fêmeas acometidas por afecções ovarianas, uterinas e cervicais, éguas que não apresentam bons resultados na Monta Natural (MN), Inseminação Artificial (IA) e/ou Transferência de Embriões (TE), sem causa definida, ou animais com anormalidades adquiridas durante a vida reprodutiva. Para a obtenção de oócitos em boas condições para transferência, alguns protocolos hormonais são utilizados com o objetivo de acelerar a maturação folicular e oocitária. Atualmente, a colheita dos oócitos é feita por meio de aspiração e lavagem dos folículos via transvaginal, guiada por ultrassonografia (TVA), no entanto, punções pelo flanco ou laparotomia com exposição dos ovários e aspiração dos folículos foram relatadas com sucesso. Os ovários de éguas abatidas em matadouro são as fontes mais abundantes de gametas, são excelentes modelos experimentais e material de treinamento. O sucesso da TO depende de vários fatores, um dos mais importantes tange a origem do oócito e a dificuldade de maturá-los *in vitro*, resultando em baixas taxas de desenvolvimento embrionário. Oócitos originários de folículos pré ovulatórios, maturados *in vivo*, apresentam taxas mais elevadas que as de oócitos maturados *in vitro*. A qualidade e o tipo de conservação do sêmen também interferem nos resultados, assim como a idade da doadora e da receptora determinam fator importante no sucesso da concepção por meio de TO. Assim, por se tratar de uma biotecnologia com grandes perspectivas e de uso ainda restrito, pela ausência de conhecimentos consolidados no assunto, o objetivo desta revisão é abordar os pontos relevantes para a compreensão e desenvolvimento da técnica de transferência de oócitos na espécie equina.

**Palavras-chave:** maturação *in vitro*, biotecnologia da reprodução, equinos, ovócitos.

### OOCYTE TRANSFER IN MARES

#### ABSTRACT

The progress of reproduction biotechnologies in horses are slow compared to other species. This is due to the large number of anatomical peculiarities inherent to the species and also by the limited availability of research material. Products from females of high genetic pattern, through the ovary conservation became possible, determining the continuity of genetic material through techniques like Oocytes in Vitro Maturation (IVM) and Oocyte Transfer

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - Cidade Universitária - São Paulo, SP CEP 05508-270. fernandescb@usp.br

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

(OT). Potential candidates to oocyte donors are older females and / or affected by ovarian, uterine, cervical disorders, and mares that have not had good results in Natural Mating (NM), Artificial Insemination (AI) and / or TE (Embryo Transfer) without apparent or acquired causes during their reproductive life. To obtain oocytes for transferring in good conditions, some hormonal protocols are used in order to accelerate follicular and oocyte maturations. Nowadays, collection of oocytes is made by aspiration and washing of the follicles guided by transvaginal ultrasound (TVA), however, punches through the flank or laparotomy with ovarian follicles exposure and aspiration have been reported with success. The ovarian oocytes from slaughterhouse are the most abundant gametes sources, excellent experimental models and training materials for valuable mares that may die. TO's success depends on several factors: one of the most important is related to the oocyte origin and in vitro maturation difficulty, resulting in embryonic development low rates. Oocytes from pre-ovulatory follicles, matured in vivo are higher than the ones matured in vitro. The quality and type of semen conservation also interfere in the results, as well as the donor and recipient age, determining success ful factor. Thus, it is a great prospects biotechnology with use still restricted because there are littler knowledge. The aim of this review is to address the relevant points for understanding and oocytes transfer technique development in mares.

**Keywords:** in vitro maturation, reproduction biotechnology, equine specie, oocytes

## TRANSFERENCIA DE OVOCITOS EN YEGUAS

### RESUMEN

Los avances en la biotecnología reproductiva de equinos son lentos en comparación con otras especies, esto se debe principalmente al gran número de particularidades anatomofuncionales inherentes a la especie y también a la escasa disponibilidad de material para investigación. La conservación de ovarios hizo posible la generación de productos procedentes de hembras de elevado potencial genético mediante el uso de técnicas de maduración in vitro (MIV) y transferencia de ovocitos (TO). Las hembras con potencial para ser donadoras de ovocitos son las hembras más viejas y/o afectadas por disturbios ováricos, uterinos o cervicales, así como yeguas que no presentan buenos resultados con monta natural, inseminación artificial o transferencia de embriones, sean estos resultados de origen idiopático o adquirido durante la vida reproductiva. Para obtener ovocitos en buenas condiciones para la transferencia, son utilizados algunos protocolos hormonales, con el objetivo de madurar el folículo y el ovocito. Actualmente la colecta de ovocitos es realizada por medio de aspiración y lavado de los folículos vía transvaginal guiada por ultrasonografía (TVA), sin embargo, las punciones por el flanco o laparotomía con exposición de los ovarios y aspiración de folículos han sido reportadas con éxito. Los ovarios de yeguas sacrificadas en mataderos son las fuentes más grandes de gametos, son excelentes modelos experimentales y material de entrenamiento para el aprovechamiento de los ovocitos de yeguas valiosas que van a morir. El éxito de la TO depende de varios factores, uno de los más importantes relacionado con el origen de los ovocitos y la dificultad de su maduración in vitro, lo que resulta en tasas bajas de desarrollo embrionario. La calidad y tipo de conservación del semen, así como la edad de la donadora y receptora son factores determinantes para el éxito de la concepción por medio de TO. El objetivo de esta revisión es abordar los puntos relevantes para la comprensión y desarrollo de la técnica de transferencia de ovocitos en yeguas.

**Palabras clave:** maduración in vitro, biotecnología de la reproducción.

## INTRODUÇÃO

A equinocultura é um setor crescente no Brasil, desempenhando papel importante como atividade na economia do país, por gerar cerca de 3,2 milhões de empregos diretos ou indiretos (1). Atualmente, o cavalo tem grande importância nos esportes como corrida, hipismo, pólo, provas funcionais, enduro equestre, entre outros, além de ser utilizado como ferramenta de lazer, trabalho e transporte. Com esse intuito, os criadores, cada vez mais, demonstram interesse na transferência da genética de animais com alto valor zootécnico, ou seja, existe a necessidade de que algumas características hereditárias sejam transmitidas aos descendentes, para que o melhoramento genético e consequente melhora no desempenho dos equinos sejam alcançados (2).

A implantação de biotécnicas da reprodução tem como principal objetivo melhorar os índices reprodutivos, favorecendo a produção de animais geneticamente superiores, maximizar a utilização reprodutiva de fêmeas e machos que apresentem características hereditárias desejáveis e permitir que animais portadores de alterações adquiridas não compatíveis com a reprodução natural, não interrompam a atividade (3).

Com isso, a geração de potros resultantes da reprodução assistida na espécie equina, é uma realidade atual. Produtos advindos de fêmeas, de elevado padrão genéticos, por meio da conservação dos ovários, tornaram-se possíveis, determinando a continuidade do material genético com as técnicas de Maturação *in vitro* (MIV) e Transferência de Oócitos (TO) (4, 5).

A TO trata-se de uma biotecnologia que auxilia no incremento dos índices reprodutivos, além de permitir a rápida multiplicação de linhagens genéticas, favorecer os estudos com relação à biologia, manipulação e maturação dos oócitos e aperfeiçoar técnicas básicas para tecnologias mais avançadas como a produção *in vitro* (PIV) de embriões e a clonagem (6).

A técnica de transferência de oócitos consiste na deposição do gameta feminino, advindo de uma égua doadora, já maturo (*in vivo* ou *in vitro*), no oviduto de uma receptora, a qual foi previamente inseminada. A fertilização e o desenvolvimento embrionário acontecem no trato reprodutivo da receptora de maneira natural, após a transferência artificial do gameta. A primeira TO que obteve sucesso foi realizada por McKinnon e colaboradores em 1988, contudo, apenas em 1993, Carnevale e Ginther obtiveram sucesso, com o nascimento do primeiro potro gerado por meio da técnica.

No que diz respeito ao local de deposição dos gametas, se o espermatozóide for depositado diretamente no oviduto, juntamente com o oócito, o procedimento é denominado transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) (7), que possibilita a utilização do número reduzido de espermatozóides, viabilizando a utilização de sêmen de qualidade inferior, sêmen congelado, sexado e de garanhões subfêrteis (4, 6).

A aplicação dessas técnicas exige investimento em equipamentos e treinamento de profissionais, sendo indispensável o conhecimento técnico com relação à morfologia, desenvolvimento e maturação dos oócitos, domínio da técnica de inseminação artificial e principalmente da técnica de transferência dos gametas (6).

Dessa forma, o objetivo desta revisão é abordar os pontos relevantes para a compreensão e desenvolvimento da técnica de transferência de oócitos em equinos.

### Fêmeas doadoras de oócitos

As potenciais candidatas a doadoras de ovócitos são as fêmeas acometidas por afecções ovarianas, uterinas, cervicais e éguas que não apresentam bons resultados na MN, IA e/ou TE sem causa definida (8). As condições fisiológicas da doadora como: escore corporal, idade, raça e variação comportamental individual são aspectos biológicos que interferem nas taxas de prenhez. Animais subnutridos ou submetidos a situações de estresse são doadores de oócitos com menor capacidade de desenvolvimento (9).

Na maioria das vezes, as fêmeas que necessitam do auxílio da biotécnica de TO para produzir prenhez viável são as de idade mais avançada devido, principalmente, às alterações adquiridas durante a vida reprodutiva. A senilidade reduz a qualidade e a competência oocitária pela permanência destes gametas estacionados na fase de diplóteno, da prófase I da meiose até o momento do recrutamento (4). Assim, índices razoáveis de prenhez são possíveis, contudo o número de transferências necessárias para se obter produto de uma doadora idosa é maior quando comparado a uma doadora jovem (10).

### **Recuperação de oócitos *in vivo***

A recuperação de oócitos pode ser influenciada por terapias gonadotróficas, frequência da realização de técnicas, fase do ciclo estral; tamanho do folículo e experiência do profissional que realiza o procedimento (11).

Oócitos provenientes de folículos em desenvolvimento resultam em baixos índices de recuperação (7, 12). Isso acontece porque na fêmea equina, o folículo apresenta uma camada de células da teca logo abaixo da junção com o *cumulus*, fazendo com que o oócito fique mais aderido à parede folicular (10). Com o desenvolvimento do folículo, o índice de recuperação oocitária torna-se maior devido ao afrouxamento das junções entre as células do *cumulus* e a parede folicular. Isso ocorre em decorrência do aumento da concentração de LH em folículos pré ovulatórios ou com a aplicação exógena de hormônios (11). Outra vantagem da recuperação de oócitos proveniente de folículos pré-ovulatórios é a minimização da necessidade do cultivo e maturação *in vitro* (10).

Para a obtenção de oócitos em boas condições para transferência, alguns protocolos hormonais são utilizados com o objetivo de acelerar a maturação folicular e oocitária. Os hormônios utilizados com maior frequência para essa finalidade são hCG (gonadotrofina coriônica humana), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e LH (hormônio luteinizante) (13).

A hCG vem sendo utilizada há muitos anos para auxiliar a maturação folicular, diminuindo o período de estro e acelerando a ovulação. Quando os folículos com diâmetro de aproximadamente 35 mm são detectados, a administração de hCG promove a ovulação em até 48 horas. Contudo, por se tratar de uma molécula glicoprotéica de elevado peso molecular, se for utilizada por repetidas vezes em uma mesma estação reprodutiva, pode induzir ação antigênica por parte do sistema imunológico. Assim, o GnRH e o LH têm sido utilizados como alternativa na sincronização e indução da ovulação em éguas (14).

Atualmente, a colheita dos oócitos é feita por meio de aspiração e lavagem dos folículos via transvaginal, guiada por ultrassonografia (TVA) (15), no entanto, punções pelo flanco ou laparotomia com exposição dos ovários e aspiração dos folículos foram relatadas com sucesso (10).

A punção dos folículos pelo flanco pode ser realizada com ou sem auxílio de ultrassonografia. Com a égua em estação, por meio da palpação transretal, o ovário é localizado e colocado próximo à parede abdominal, de modo que o folículo pré ovulatório possa ser alcançado pela agulha, que atravessará a musculatura do abdômen e a parede do folículo (16). Apesar de ser pouco utilizada nos dias de hoje, a punção pelo flanco apresenta bons resultados e tem como vantagem o fato de minimizar a necessidade de equipamentos sofisticados (17).

Outra técnica possível para obtenção de oócitos de éguas *in vivo* é a laparotomia, técnica que consiste na realização de uma incisão no flanco, exposição dos ovários e localização dos folículos. Com auxílio de agulhas e seringas ou bombas de vácuo, o fluido folicular é aspirado e, em seguida, lava-se o folículo. Depois de realizada a aspiração, o ovário é reposicionado e a sutura da parede abdominal é realizada (18).

A laparotomia pode ser utilizada em equinos, principalmente na falta de recursos para a realização de outros meios de recuperação de oócitos. Porém, por tratar-se de um procedimento cirúrgico, é um método invasivo, que pode trazer complicações posteriores (10).

Para a TVA, a fêmea é contida em estação, realiza-se o esvaziamento retal, higienização do períneo e sedação do animal. Por palpação transretal os ovários são manipulados e posicionados para que a imagem ultrassonográfica do ovário e dos folículos possa ser obtida, por meio de uma probe ultrassonográfica linear, convexa ou setorial, acoplada a um suporte e a uma agulha de aspiração (2, 10). A agulha normalmente utilizada para aspiração tem lúmen de 14 G (19) a 16 G (20), que pode ser simples ou duplo (2). A agulha de lúmen duplo tende a aumentar a taxa de recuperação de ovócitos devido à possibilidade de lavar o folículo, puncionado com solução de recuperação, o que faz com que o oócito se desprenda da parede do folículo com mais facilidade. Quando os ovários estão devidamente posicionados, e a imagem do folículo a ser aspirado é encontrada, a agulha é impulsionada suavemente para que atravesse a parede do fundo da vagina e do folículo, aspirando o fluido folicular, que é armazenado no copo coletor. Os níveis de pressão negativa utilizados na aspiração podem variar, havendo relatos de utilização de pressões de 90mmHg, 150mmHg, 230mmHg, 300mmHg e 400mmHg. A utilização de níveis de pressão muito altos pode causar lesões e desnudamento dos oócitos (2). Concomitante à aspiração, o folículo é lavado com 100 mL de solução tamponada e 10 UI/mL de heparina a 37°C para evitar coagulação do material aspirado (21). A aspiração transvaginal tem a vantagem de ser um procedimento não cirúrgico, e se realizada com cautela, pode ser repetida várias vezes, sem que a fertilidade da égua seja afetada (22).

A TVA é uma metodologia simples e eficiente na obtenção de oócitos de éguas subférteis, com doenças reprodutivas adquiridas e histórico de insucesso nos programas de transferência de embriões (TE) (11, 23).

Após a aspiração, realiza-se a busca e a classificação do(s) oócito(s) em estereomicroscópio binocular na solução de aspiração. Quando localizados, os gametas são transferidos para os meios de cultura, onde recebem condições para serem imediatamente transferidos, maturados *in vitro* ou até mesmo criopreservados (7).

### **Recuperação de ovócitos *post-mortem***

Em animais abatidos em matadouro ou animais valiosos que vieram a óbito, a recuperação dos oócitos pode ser realizada por meio de punção folicular, curetagem da parede folicular (scraping) e fatiamento do ovário (slicing) ou até mesmo pela combinação destas técnicas (24).

Os ovários de éguas abatidas em matadouro são as fontes mais abundantes de gametas, porém, nem sempre é possível conhecer a fêmea doadora, por isso a qualidade dos oócitos e a genética a ser transmitida não são garantidas (10), no entanto, são excelentes modelos experimentais, e material de treinamento para que éguas valiosas que venham a óbito tenham os oócitos utilizados.

É importante salientar que a temperatura e o tempo transcorrido durante o transporte dos ovários influenciam na competência meiótica dos oócitos e a taxa de desenvolvimento embrionário (17). A temperatura pode diminuir a viabilidade do oócito por interferir na estrutura da membrana oocitária (23, 25), assim como, quanto maior o período de transporte dos ovários até o laboratório, menor a taxa de maturação dos oócitos e, conseqüentemente, do desenvolvimento embrionário (26). Uma alternativa para aumentar a viabilidade dos oócitos *post-mortem* é a aspiração ou curetagem dos folículos no próprio local de abate, com transporte dos oócitos até o laboratório em meio de maturação e em incubadoras portáteis, podendo, assim, favorecer as taxas de concepção (17).

Nos casos em que os oócitos provenientes de ovários conservados post-mortem são a última possibilidade de obter descendentes de uma fêmea morta, o transporte e a recuperação dos gametas devem ser realizados de forma cautelosa, a fim de maximizar a taxa de recuperação. Os oócitos são coletados em diversas fases do ciclo, o que gera a necessidade de serem maturados *in vitro* até atingirem a fase meiótica ideal para transferência (25).

Para a coleta dos oócitos, as túnicas vaginal e albugínea são retiradas, os ovários são lavados em solução tamponada para remover o sangue e debris celulares (11). No laboratório, os folículos em vários estágios de desenvolvimento são identificados e aspirados. Independente da técnica de coleta selecionada é importante associar a curetagem da parede folicular para que o oócito possa ser recuperado, respeitando a anatomia da fêmea equina (26). A curetagem da parede folicular permite ótimos índices de recuperação, com pouca ocorrência de lesões no complexo *cumulus oophorus*, porém trata-se de uma atividade laboriosa, que consome muito tempo para sua realização (24).

O líquido resultante dos procedimentos de lavagem folicular é mantido aquecido a 37°C em béquer por 20 minutos, quando o sobrenadante é desprezado e o sedimento é examinado para a identificação dos oócitos sob estereó-microscopia (9).

Outra técnica descrita é o fatiamento ovariano, que consiste no corte dos ovários em partes de aproximadamente cinco milímetros de espessura. As fatias são lavadas com solução tamponada, acrescida de 10 UI/mL e a 37°C. O líquido resultante da lavagem é deixado em descanso por 20 minutos, para que ocorra a sedimentação dos oócitos (27). A técnica de fatiamento ovariano demonstra ser uma técnica prática e rápida, porém não se pode determinar o tamanho dos folículos utilizados, resultando em populações heterogêneas de oócitos (28).

Apesar da variabilidade de opções, o sucesso da técnica ainda não é satisfatório. No ano de 2003 Carnevale e seus colaboradores reportaram o nascimento do primeiro potro proveniente de TO, advindo de ovários de abatedouro. Desde então, as taxas de obtenções de oócitos e de desenvolvimento embrionário, a partir de TO maturados *in vitro*, recuperados de éguas mortas, permanecem ao redor de 15 % e 12, 8% de sucesso respectivamente (25, 28). Deleuze et al. (12) obtiveram cerca de 40% de sucesso na obtenção de embriões, a partir de oócitos maturados *in vitro*. Todavia, mesmo nessa relação com taxas de maturação *in vivo* em torno de 70%, o rendimento permanece menor quando comparados às taxas de produção de embriões e gestações obtidas com a utilização de oócitos provenientes de folículos pré ovulatórios.

### **Avaliação e classificação morfológica de oócitos recuperados**

Após a recuperação dos oócitos, os mesmos devem ser avaliados e classificados para o cultivo *in vitro* ou para a transferência direta à receptora (25).

O oócito equino pode ter seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário, estimado pelas características do complexo *cumulus oophorus*. Oócitos com maior viabilidade, em geral, apresentam ooplasma homogêneo, de coloração marrom, granulações finas e devem estar completamente envolvidos ao menos por uma camada completa de células do *cumulus* (24).

### **Fêmeas receptoras de oócitos**

Para que haja melhor resultado com esta biotécnica, é recomendado que as fêmeas utilizadas como receptoras sejam jovens, saudáveis, férteis, com habilidade materna e não apresentem histórico de distocias (7). Preferencialmente são selecionadas fêmeas entre três e dez anos de idade, consideradas aptas em exame ginecológico (8). O aparelho reprodutivo das

receptoras deve fornecer as condições necessárias para ocorrer fertilização, desenvolvimento embrionário e fetal (10).

A utilização de éguas receptoras em atividade cíclica favorece o transporte espermático, a capacitação dos gametas e a fertilização. Éguas não cíclicas devem ser tratadas hormonalmente para que apresentem as características cíclicas do período folicular, desta forma apresentem trato reprodutivo, apto a receber os gametas, fornecendo as condições necessárias para que ocorra a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário. A fim de evitar a fecundação dos oócitos, quando se opta pela utilização de fêmea cíclica, faz-se necessário realizar aspiração folicular antes da transferência oocitária, evitando assim a fertilização do oócito da própria receptora (15).

### **A transferência do oócito**

O período de competência para fertilização após a TO é o período em que os gametas estão aptos à fertilização para o desenvolvimento embrionário normal. O transporte de gametas está altamente relacionado com a taxa de concepção. Nos sistemas de monta natural, os espermatozoides são depositados no trato reprodutivo da fêmea entre dez e doze horas antes da ovulação (29). Por este motivo, em protocolos de TO, a inseminação artificial deve ser realizada entre doze horas antes e duas horas após a transferência do oócito. No entanto, o momento ideal da inseminação depende da qualidade e do tipo de conservação do sêmen utilizado (2).

Se a inseminação for realizada tardiamente, existe o risco de haver a degeneração dos oócitos, sendo o período crítico nas fêmeas equinas entre seis e oito horas. Oócitos degenerados ou envelhecidos têm viabilidade alterada, perdendo a capacidade de serem fertilizados, ou quando fertilizados, favorecendo a formação do zigoto com número incorreto de cromossomos, podendo resultar em morte embrionária precoce (24). Os procedimentos cirúrgicos para GIFT e para TO podem ser realizados com o animal em estação, por meio da laparotomia pelo flanco, utilizando sedação e anestesia local. Assim, após a higienização da área cirúrgica, é realizada a incisão de aproximadamente 15 cm de extensão no flanco, na linha média entre a última costela e a tuberosidade coxal. Os músculos são afastados para que o ovário seja localizado na cavidade abdominal. Após a localização, ovário e oviduto são expostos, e o infundíbulo é localizado. Oócito, ou oócitos e espermatozoides (no caso da GIFT) são transferidos em aproximadamente 0,2 ml de meio de cultivo com auxílio de pipeta de vidro de ponta fina e arredondada, introduzida 2 a 3 cm dentro do infundíbulo. Após a realização da transferência, o ovário é reposicionado, e os planos musculares e pele são suturados (21).

No pós operatório, as receptoras são tratadas com antibiótico e antiinflamatório durante cinco dias após a TO (22). Adicionalmente, são administrados 200mg/dia de progesterona na receptora para garantir a manutenção da gestação, até a confirmação do diagnóstico de prenhez nos dias 15 e 90 após a transferência (8).

### **Taxas de concepção**

O sucesso da TO depende de vários fatores. Um dos mais importantes tange a origem do oócito e a dificuldade de maturá-los *in vitro*, resultando em taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos, originários de folículos pré ovulatórios, maturados *in vivo*, mais elevadas que as taxas de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro* (13). Estudos realizados por Scott et al. (9) resultaram em 92% de vesículas embrionárias após a transferência de oócitos provenientes de folículos pré ovulatórios e, somente 7%, quando provenientes de folículos imaturos que necessitaram da maturação *in vitro*.

A qualidade e o tipo de conservação do sêmen também interferem nos resultados. Sêmen de garanhões férteis, com boa motilidade e concentração, resultaram em índices mais satisfatórios de prenhez quando comparados a sêmen de garanhões com menor qualidade. Assim, tanto na TO quanto na GIFT, o sêmen fresco resulta em maior desenvolvimento de vesículas embrionárias quando comparado ao sêmen refrigerado ou congelado (13).

As idades das doadoras e receptoras determinam fator importante no sucesso da concepção por meio de TO. Oócitos de doadoras jovens transferidos para receptoras também jovens podem apresentar taxas de fertilidade superiores a 92%. O índice cai para 31% quando oócitos provenientes de doadoras velhas são transferidos para receptoras jovens (13).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os progressos das biotécnicas da reprodução nos equinos são lentos quando comparados a outras espécies, isso se deve primariamente ao grande número de particularidades anatomofuncionais inerentes à espécie e também pela escassa disponibilidade de material para pesquisa, o que resulta em aspectos da fisiologia ainda sem repetibilidade no laboratório. Assim, para que a eficiência da TO aumente é necessária a realização de mais estudos no que diz respeito à maturação *in vitro*, conservação dos ovários *post-mortem* e superovulação, como importantes ferramentas para aumentar o número e competência dos oócitos recuperados, promovendo que biotécnicas, como a TO, possam ter todo o potencial explorado.

## REFERÊNCIAS

1. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Brasília: CNA; 2004. [Coletânea Estudos Gleba, n.39].
2. Rodrigues R. Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra-som em equinos [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
3. Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas a reprodução Animal. São Paulo: Livraria Varela; 2001.
4. Carnevale EM, Frank-Guest BL, Stokes JE. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci.* 2010;121:S258-9.
5. Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2008;108:171-9.
6. Silva MAC. When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology.* 2008;70:441-4.
7. Carnevale EM, Maclellan MA, Silva MAC, Checure CM, Scoggin CF, Squires EL. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:305-14.
8. Carnevale EM, Silva MAC, Panzani D, Stokes JE, Squires EL. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology.* 2005;64:519-27.

9. Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires EL. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology*. 2001;55:705-15.
10. Carnevale EM, Silva MAC, Maclellan LJ, Seidel Junior GE, Squires EL. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. *Reproduction*. 2004;128:623-8.
11. Fernandes CB, Peres KR, Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC. The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. *J Equine Vet Sci*. 2006;26:4.
12. Deleuze S, Goudet G, Caillaud M, Lahuec C, Duchamp G. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. *Theriogenology*. 2009;72:203-9.
13. Squires EL, Carnevale EM, Mccue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*. 2003;59:151-70.
14. Imboden I, Janett F, Burger D, Crowe MA, Hässig M, Thun R. Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology*. 2006;66:1866-75.
15. Bruck I, Raun K, Synnestvedt B, Greve T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Vet J*. 1992;24:58-9.
16. Hinrichs K, Kenney RM. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. *Theriogenology*. 1987;27:237.
17. Carnevale EM, Maclellan LJ. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2006;22:843-56.
18. Vogelsang MM, Kreider JL, Bowen MJ, Potter GD, Forrest DW, Kraemer DC. Methods for collecting follicular from mares. *Theriogenology*. 1988;29:1007-8.
19. Hinrichs K, Kenney DF, Kenney RM. Aspiration of oocyte from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*. 1990;27:237.
20. Mari G, Barbara M, Eleonora I, Stefano B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound- guided aspirations. *Anim Reprod Sci*. 2005;88:299-308.
21. McKinnon AO, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis KA, Seidel Jr GE. Heterogenous and xenogenous fertilization of in vitro matured equine oocyte. *J Equine Vet Sci*. 1988;8:143-7.
22. Silva MAC, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis KA, Seidel Junior GE, Squires EL. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. *Theriogenology*. 2004;61:705-13.

23. Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA. Structural aspects of equine oocytes matured in vivo and in vitro. *Braz J Morphol Sci.* 2006;23:513-24.
24. Curcio BR. Maturação e vitrificação de ovócitos equinos incubados em meios contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhantes à insulina-I [dissertação]. Pelotas: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; 2005.
25. Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, et al. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 degrees C. *Theriogenology.* 2004;61:1215-23.
26. Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2008;108:171-9.
27. Choi YH, Hoshi S, Braun J, Sato K, Oguri N. In vitro maturation of equine oocyte collected by follicle aspiration and by slicing of ovaries. *Theriogenology.* 1993;40:959-66.
28. Fernandes CB. Maturação in vitro de ovócitos equinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH equino e do hormônio de crescimento equino, utilizando a transferência de ovócitos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2004.
29. Souza FA. Taxa de concepção de éguas cobertas 12 ou 24 horas após a ovulação [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

**Recebido em: 22/09/11**

**Aceito em: 14/08/12**