

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SINCRONIZAÇÃO DA ONDA OVULATÓRIA POR MEIO DE ASPIRAÇÃO  
FOLICULAR E TRATAMENTO COM O GnRH**

**Autora: Juliana Torriani Maciel**

**Porto Alegre**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SINCRONIZAÇÃO DA ONDA OVULATÓRIA POR MEIO DE ASPIRAÇÃO  
FOLICULAR E TRATAMENTO COM O GnRH**

**Autora: Juliana Torriani Maciel**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na área de  
Embriologia e Biotécnicas da Reprodução  
Animal.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini**

**Porto Alegre**

**2020**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

#### CIP - Catalogação na Publicação

Torriani Maciel, Juliana  
SINCRONIZAÇÃO DA ONDA OVULATÓRIA POR MEIO DE  
ASPIRAÇÃO FOLICULAR E TRATAMENTO COM O GnRH / Juliana  
Torriani Maciel. -- 2020.  
95 f.  
Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Ablação folicular. 2. Acetato de deslorelina. 3.  
Sincronização da onda folicular. 4. Superestimulação  
Ovariana. I. Bertolini, Marcelo, orient. II. Título.

JULIANA TORRIANI MACIEL

**SINCRONIZAÇÃO DA ONDA OVULATÓRIA POR MEIO DE ASPIRAÇÃO  
FOLICULAR E TRATAMENTO COM O GnRH**

Defesa em 12 de junho de 2020, às 13:30 h.

COMISSÃO AVALIADORA:

---

Prof. Dr. Marcelo Bertolini, UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo L. Gastal, Southern Illinois University, Carbondale, EUA

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Gustavo F. Carneiro, UFRPE, Brasil

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky, ULBRA, Brasil

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Júlio César**, grande responsável pelo amor aos cavalos, e **Mayde**, meu exemplo de força e dedicação, pelo amor e apoio incondicionais, me garantindo conforto e carinho por todos estes anos de estudo.

Ao professor **Marcelo Bertolini**, pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial em projetos audaciosos quando nem eu mesma acreditava.

Ao professor **José Luis Rodrigues** pela coorientação e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Embriologia **Higor, Eduardo, Louise, Verônica, Thomaz, Favorino e Bruno**, pelas risadas, companheirismo e aprendizado conjunto durante todo o período de mestrado.

Ao médico veterinário **Frederico Schmidt**, pelo auxílio nas aspirações foliculares, ensinamentos, contribuições e companheirismo.

Ao biólogo **Marc Maserati** pela contribuição significativa para o enriquecimento de minha pesquisa durante as atividades no laboratório.

À toda equipe do 3º Regimento de Cavalaria de Guarda pela receptividade e oportunidade. Às Tenentes **Luisa, Luciana e Laura**, ao Capitão **Alex** e, principalmente, ao Major **Rafael Rodrigues** e Comandante **Jader Roger Delmorá** por colocarem animais, espaço e equipe à disposição para a realização deste estudo. Serei eternamente grata a vocês!

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudos.

## **EPIGRAFE**

the part must be studied

as a part of the whole;

the whole must be studied

as being made up of parts

one may not, in studying a part,

neglect its place and function

in the whole, nor in looking

at the whole forget that it is

an assemblage, an ensemble

of working parts.

the system is a system

and operates as a system,

but it only operates properly

if every part performs

in good working order.

(Robert Law, 1915 – 2000)

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar um protocolo de manipulação do desenvolvimento folicular ovariano em equinos, pela sincronização física da onda folicular e indução hormonal de codominância folicular, para aplicação em biotécnicas da reprodução em equinos. No Experimento 1, após a sincronização do ciclo estral e a determinação da ovulação, buscou-se caracterizar por ultrassonografia transretal a dinâmica folicular ovariana de nove éguas cíclicas após ablação folicular, realizada por ultrassonografia transvaginal entre os dias 9 e 12 pós-ovulação, com a avaliação da taxa de sincronização da onda folicular ovariana pós-ablação. No Experimento 2, repetiu-se o protocolo experimental do Experimento 1, com a determinação do efeito da administração sequencial de análogo sintético de GnRH (acetato de deslorelina) após a sincronização da onda folicular pós-ablação folicular no diestro sobre as taxas de desenvolvimento folicular e a dinâmica folicular ovariana de 16 éguas cíclicas. No Experimento 1, após análise quantitativa e qualitativa da população ovariana de folículos >5 mm e posterior ablação folicular (d0), a dinâmica folicular revelou um padrão coletivo repetível da onda de desenvolvimento folicular entre as fêmeas, com períodos previsíveis de emergência/recrutamento (d3), divergência folicular (d6-d7), dominância folicular (d9-d11) e ovulação (d11-d13), com o restabelecimento de uma nova onda folicular a partir do d12. No Experimento 2, após as ablações foliculares (d0), as éguas foram distribuídas em três grupos experimentais, sendo o grupo Controle (n=6), sem tratamento hormonal, e grupos tratamento GnRH 3-6 e GnRH 2-6, com fêmeas submetidas a duas doses diárias de 125 µg de GnRH do d3 ao d6 (GnRH 3-6, n=5) ou do d2 ao d6 (GnRH 2-6, n=4) pós-ablação (d0). Um grupo de fêmeas dos grupos Controle e GnRH 3-6 foram submetidas à OPU no d6 para a produção *in vitro* de embriões por partenogênese, não havendo diferenças entre os grupos quanto às taxas de recuperação e viabilidade oocitárias, e maturação *in vitro* e clivagem embrionária, com o desenvolvimento *in vitro* de um blastocisto no grupo Controle. O padrão de desenvolvimento e dinâmica folicular observado no Experimento 1 se mostrou repetível e previsível no grupo Controle do Experimento 2. Também pôde-se observar que o tratamento com GnRH após a ablação determinou um atraso no crescimento folicular nos grupos GnRH 3-6 e GnRH 2-6, com aumento na proporção de folículos de tamanhos intermediários (até 23 mm) relativos ao Controle até o d6, havendo maior atraso no crescimento diário no grupo GnRH 2-6 a partir do d4 pós-ablação. Possivelmente, o tratamento com GnRH determinou a ocorrência do fenômeno de *downregulation* de FSH, atrasando o recrutamento de uma nova onda folicular. Em resumo, a ablação folicular em éguas determinou uma sincronização previsível de uma nova onda folicular até a ovulação, podendo ser útil como ferramenta na aplicação em biotécnicas da reprodução em equinos. Já a utilização de doses repetidas de GnRH na fase de emergência folicular após a ablação folicular determinou um retardo na progressão da nova onda folicular. Entretanto, houve uma maior proporção de folículos com maior potencial de recuperação e competência oocitária após a OPU em fêmeas tratadas com GnRH, o que pode favorecer a eficiência da PIV de embriões em equinos.

**Palavras-chave:** Ablação folicular; sincronização da onda folicular; superestimulação ovariana; acetato de deslorelina; equinos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate a protocol for manipulating ovarian follicular development in mares, by physical synchronization of follicular wave and hormonal induction of follicular codominance, for application in reproductive technologies in horses. In Experiment 1, after synchronization of the estrous cycle and determination of ovulation, the ovarian follicular dynamics of nine cyclic mares was characterized by transretal ultrasonography after ovarian follicular ablation, performed transvaginally by ultrasonography between days 9 and 12 after ovulation, with the evaluation of the synchronization rate of the ovarian follicular wave post-ablation. In Experiment 2, the experimental protocol of Experiment 1 was repeated, with the determination of the effect of sequential administration of a synthetic GnRH analog (deslorelin acetate) after synchronization of the ovarian follicular wave by follicular ablation, on the rates of follicular development and ovarian follicular dynamics in 16 cyclic mares. In Experiment 1, after quantitative and qualitative analysis of the >5 mm ovarian follicle population after follicular ablation (d0), the follicular dynamics revealed a repeatable pattern of follicular waves between females, with predictable periods of emergence/recruitment (d3), follicular divergence (d6-d7), follicular dominance (d9-d11) and ovulation (d11-d13), with the reestablishment of a new follicular wave after d12. In Experiment 2, after follicular ablation (d0), mares were segregated into three experimental groups: Control group (n=6), with no exogenous hormone treatment; and GnRH 3-6 and GnRH 2-6 treatment groups, with females subjected to two 125- $\mu$ g daily doses of GnRH from d3 to d6 (GnRH 3-6, n=5) or from d2 to d6 (GnRH 2-6, n=4) post-ablation (d0). A group of females from Control and GnRH 3-6 groups were submitted to OPU procedures on d6 for the *in vitro* production of embryos by parthenogenesis, with no differences between groups regarding oocyte recovery and viability rates, and *in vitro* maturation and cleavage rates, with the *in vitro* development of a blastocyst stage embryo in the Control group. The pattern of follicular development and dynamics observed in Experiment 1 was repeatable and predictable in the Control group of the Experiment 2. In addition, the GnRH treatment after ablation determined a delay in follicular growth in both the GnRH 3-6 and GnRH 2-6 groups, with an increase in the proportion of follicles of intermediate sizes (up to 23 mm) relative to controls until d6, with a greater delay in daily growth in the GnRH 2-6 group from d4 post-ablation. Possibly, the GnRH treatment determined the occurrence of the phenomenon known as FSH downregulation, as already reported, causing a delay in the recruitment of a new follicular wave. In summary, follicular ablation in mares determined a predictable synchronization of a new follicular wave through ovulation, which can be a useful tool for the application in reproductive technologies in horses. Also, the use of repeated doses of GnRH in the follicular emergency phase after follicular ablation determined a delay in the progression of the new follicular wave. However, the higher proportion of follicles with greater potential for oocyte recovery and competence after OPU in GnRH-treated females may favor the efficiency of IVP procedures in horses.

**Keywords:** Follicular ablation; follicular wave synchronization; ovarian superstimulation; deslorelin acetate; horses.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ilustração esquemática do modelo de dois folículos (primeiro e segundo maior) em equinos.....	20
<b>Figura 2.</b>	Médias das concentrações de FSH, LH, estradiol e inibina circulantes em equinos, normalizadas de acordo com o dia de ocorrência da divergência folicular.....	22
<b>Figura 3.</b>	Representação cronológica das atividades e do delineamento experimental realizados no Experimento 1.....	41
<b>Figura 4.</b>	Representação cronológica das atividades e do delineamento experimental realizados no Experimento 2, conforme os grupos experimentais (Controle; GnRH 3-6; GnRH 2-6).....	44
<b>Figura 5.</b>	Distribuição (%) do diâmetro dos folículos ovarianos em éguas (mm), agrupados em intervalos por tamanho, nos dias (a) 3, 6 e 7; (b) 9, 10 e 11; (c) 12 e 13; e (d) 14 e 18 pós-ablação.....	52
<b>Figura 6.</b>	Média ( $\pm$ SEM) do diâmetro dos quatro maiores folículos ovarianos e folículos ovarianos codominantes (mm) avaliados durante nove IIOs normalizados em escala de dias a partir do dia da ovulação.....	54
<b>Figura 7.</b>	Distribuição (%) do diâmetro dos folículos ovarianos em éguas (mm) entre os grupos experimentais, em intervalos por tamanho, nos dias (a) d1, (b) d2, (c) d3, (d) d4, (e) d5 e (f) d6 pós-ablação.....	60
<b>Figura 8.</b>	Média ( $\pm$ SEM) do número geral de folículos ovarianos em éguas nos grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6 do d1 pós-ablação até a OPU no d6.....	62
<b>Figura 9.</b>	Distribuição do número médio de folículos ovarianos em éguas nos grupos (a) Controle, (b) GnRH 3-6 e (c) GnRH 2-6 para os intervalos de 5 a 10 mm, 10,1 a 15 mm, 15,1 a 20 mm, 20,1 a 25 e >25 mm.....	63
<b>Figura 10.</b>	Distribuição do número médio de folículos ovarianos em éguas nos grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6 para os diferentes intervalos de (a) 5 a 10 mm, (b) 10,1 a 15 mm, (c) 15,1 a 20 mm, e (d) 20,1 a 25 e >25 mm. Em cada grupo, do d1 pós-ablação até a OPU no d6....	64

<b>Figura 11.</b> Distribuição da população folicular ovariana em éguas nos grupos Controle (C), GnRH 3-6 e GnRH 2-6 para os intervalos de 5 a 13 mm, 14 a 23 mm, 24 a 35 mm e >35 mm do d1 até o dia da última ovulação.....	66
<b>Figura 12.</b> Médias ( $\pm$ SEM) da (a) área, (b) diâmetro e (c) crescimento diário dos dois maiores folículos ao longo dos seis dias de avaliação ultrassonográfica pós-ablação nos grupos Controle, Tratamento GnRH 3-6 e Tratamento GnRH 2-6.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Média ( $\pm$ SEM), mediana e variação no número de folículos e diâmetro folicular por égua em cada dia de avaliação ultrassonográfica pós-ablação folicular (n=9) .....	51
<b>Tabela 2.</b>	Média ( $\pm$ SEM), mediana e variação no número de folículos e diâmetro folicular por égua do Dia 1 ao Dia 12 pós-ablação folicular nos grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6.....	58
<b>Tabela 3.</b>	Média ( $\pm$ SEM) da área, do diâmetro e do crescimento diário folicular independente dos diferentes grupos do dia 1 ao dia 6 de avaliação ultrassonográfica pós-ablação folicular (LSM $\pm$ SEM).....	69
<b>Tabela 4.</b>	Média ( $\pm$ SEM) de folículos por fêmea e folículos por ovário entre os grupos controle e tratamento com GnRH (3-6 e 2-6) do d1 ao d6 de avaliação ultrassonográficas pós-ablação folicular.....	72
<b>Tabela 5.</b>	Média ( $\pm$ SEM) da área, do diâmetro e do crescimento diário folicular dos grupos controle, e tratamento com GnRH (3-6 e 2-6) do dia 1 ao dia 6 de avaliações ultrassonográficas.....	73
<b>Tabela 6.</b>	Médias ( $\pm$ SEM) dos parâmetros de desenvolvimento diário em éguas dos dois folículos maiores no decorrer dos seis dias de avaliação ultrassonográfica pós-ablação para os três grupos experimentais (Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6).....	74
<b>Tabela 7.</b>	Taxas de recuperação oocitária após a OPU e classificação morfológica de CCOs equinos recuperados nos grupos Controle e GnRH 3-6.....	77
<b>Tabela 8.</b>	Taxas de maturação <i>in vitro</i> , clivagem e de blastocistos em equinos nos grupos Controle e Tratamento 1.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCO(s)	Complexo(s) <i>cumulus</i> -oócito
CGP	Células germinativas primordiais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo lúteo
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EPE	Extrato de pituitária equina
eFSH	Hormônio folículo estimulante equino parcialmente purificado
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GIFT	Transferência intra-tubárica de gametas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HAF	Folículo hemorrágico anovulatório ( <i>Hemorragicum anovulatory follicle</i> )
IA	Inseminação Artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IFOT	Transferência intrafolicular de oócito
IIO	Intervalo inter-ovulatório
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OPU	Punção folicular ovariana ( <i>Ovum pick up</i> )
OT	Transferência intra-tubárica de oócito
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PGF <sub>2α</sub>	Análogo de prostaglandina sintética
PIV	Produção <i>in vitro</i>
SFB	Soro fetal bovino
SSE	Soro sanguíneo equino
TN	Transferência nuclear
ZIFT	Transferência intra-tubárica de zigoto
ZP	Zona pelúcida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Hipóteses</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>3.1</b>	<b>Ciclo estral e dinâmica folicular da égua</b> .....	18
3.1.1	<i>Ciclo estral</i> .....	18
3.1.2	<i>Características da dinâmica folicular ovariana</i> .....	19
3.1.3	<i>Mecanismo neuroendócrino da dinâmica folicular</i> .....	21
<b>3.2</b>	<b>Efeito da estimulação hormonal exógena no desenvolvimento folicular na égua</b> .....	24
<b>3.3</b>	<b>Influência da aspiração folicular sobre a dinâmica folicular na égua</b> .....	25
<b>3.4</b>	<b>Métodos de obtenção de complexos <i>cumulus</i>-oócito (CCO)</b> .....	28
<b>3.5</b>	<b>Desenvolvimento folicular e maturação oocitária</b> .....	31
<b>3.6</b>	<b>Competência oocitária</b> .....	34
<b>3.7</b>	<b>A égua como modelo experimental na fisiologia ovariana</b> .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
<b>4.1</b>	<b>Local, animais, e manejo geral e nutricional</b> .....	39
<b>4.2</b>	<b>Experimento 1 – Caracterização da dinâmica folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular</b> .....	40
4.2.1	<i>Seleção dos animais, manipulação do ciclo estral e monitoramento ultrassonográfico do trato reprodutivo equino</i> .....	40
4.2.2	<i>Ablação folicular guiada por ultrassonografia transvaginal</i> .....	41
4.2.3	<i>Caracterização da dinâmica folicular pós-ablação</i> .....	41
<b>4.3</b>	<b>Experimento 2 – Indução da codominância folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular e desenvolvimento embrionário após a OPU</b> .....	42
4.3.1	<i>Seleção dos animais, manipulação do ciclo estral e monitoramento ultrassonográfico do trato reprodutivo equino</i> .....	42
4.3.2	<i>Ablação folicular guiada por ultrassonografia transvaginal</i> .....	43
4.3.3	<i>Caracterização da dinâmica folicular pós-ablação e após administração exógena de análogo do GnRH</i> .....	44
<b>4.4</b>	<b>Aspiração folicular ovariana por ultrassonografia transvaginal para a ablação folicular ou para a coleta de complexos <i>cumulus</i>-oócito (CCOs) pela OPU</b> .....	45
<b>4.5</b>	<b>Recuperação dos CCOs e produção <i>in vitro</i> de embriões equinos por partenogênese</b> .....	47
4.5.1	<i>Recuperação e transporte dos CCOs equinos</i> .....	47
4.5.2	<i>Maturação <i>in vitro</i> (MIV)</i> .....	47

4.5.3	<i>Ativação partenogênética e desenvolvimento embrionário após cultivo in vitro.....</i>	48
4.6	<b>Análise estatística.....</b>	48
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	50
5.1	<b>Experimento 1.....</b>	50
5.1.1	<i>Caracterização da dinâmica folicular ovariana antes e após a ablação folicular.....</i>	50
5.2	<b>Experimento 2.....</b>	56
5.2.1	<i>Indução da codominância folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular e desenvolvimento embrionário após a OPU.....</i>	56
5.2.2	<i>Resposta ovariana pós-ablação: Características gerais do d1 ao d6.....</i>	57
5.2.3	<i>Resposta ovariana pós-ablação entre os grupos experimentais.....</i>	59
5.2.4	<i>Comparação da área folicular, do diâmetro folicular, do crescimento diário e do número de foliculos por fêmea e por ovário entre os grupos experimentais.....</i>	68
5.2.5	<i>Recuperação dos CCOs e produção in vitro de embriões equinos por partenogênese.....</i>	76
5.3	<b>Visão geral de codominância espontânea durante os Experimentos 1 e 2.....</b>	78
6	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	82
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	84
8	<b>BIOGRAFIA DA AUTORA.....</b>	90
	<b>ANEXOS.....</b>	91
	<b>Anexo A – Dados suplementares – Experimento 1.....</b>	91
	Figura Suplementar 1.....	92
	<b>Anexo B – Dados suplementares – Experimento 2.....</b>	93
	Figura Suplementar 2.....	94

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade técnica do controle dos processos reprodutivos em animais aliados à demanda econômica impulsionou ganho significativo de conhecimento na área da reprodução animal no último século, desencadeando o desenvolvimento gradual de várias biotecnologias da reprodução, incluindo principalmente a inseminação artificial (IA), a produção *in vivo*, e a produção *in vitro* (PIV) de embriões. A aplicação comercial destas biotécnicas da reprodução se tornou importante na produção e no melhoramento genético animal de bovinos e equinos, por exemplo. Tais tecnologias estão intimamente entrelaçadas e proporcionam o aumento da produção animal por meio da aplicação mais proeminente da seleção da genética desejada, reduzindo intervalos entre gerações, auxiliando no controle de doenças e na redução de custos de produção, não limitada às capacidades de reprodução natural de machos e fêmeas. Ainda, quando associadas a outras tecnologias, como a criopreservação, a ultrassonografia, e a ferramentas moleculares atualmente disponíveis, pode-se incrementar ainda mais os avanços zootécnicos, preservacionistas e técnico-científicos, de acordo com a espécie animal de interesse.

Quando comparado a outros animais domésticos, o uso de biotécnicas reprodutivas em equinos é mais recente, tendo havido um grande crescimento nas últimas três décadas (LEEMANS *et al.*, 2016). A seleção desses animais frequentemente é baseada nos atributos de desempenho em detrimento da fertilidade, sendo possível impactar negativamente o sucesso do emprego dessas biotecnologias. Um aspecto com relevância se refere às particularidades anatômicas e fisiológicas dos equinos, que podem tornar os procedimentos técnicos mais complexos, e os resultados limitados, quando comparados a outras espécies, como a bovina (DELL'AQUILA *et al.*, 2001; HINRICHS, 2010; LEEMANS *et al.*, 2016).

A PIV de embriões pode ser realizada principalmente por procedimentos de fecundação *in vitro* (FIV), clonagem por transferência nuclear (TN) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Mesmo em espécies nas quais o emprego destas biotécnicas está mais desenvolvido, ainda há desafios biológicos e técnicos que limitam sua eficiência. Na espécie equina, ainda há barreiras biológicas que impedem a aplicação plena da gama disponível de biotecnologias. Desta forma, o desenvolvimento de procedimentos refinados visa a adequação das atividades conforme as particularidades e/ou barreiras celulares, anatômicas ou fisiológicas, que caracterizam esta espécie animal. Por exemplo, a PIV de embriões equinos pela FIV ainda não encontra sucesso, presumivelmente por questões associadas a procedimentos inadequados de capacitação *in vitro* do espermatozoide e/ou aspectos relacionados à zona pelúcida (ZP) de oócitos maduros, como a rigidez da ZP (*zona hardening*; ZHANG *et al.*, 1991). Esta barreira na espécie equina estimulou na década de 1990 o desenvolvimento de processos que a sobreassem, sendo a ICSI, ou mesmo a clonagem por TN, as técnicas de maior destaque no mercado equestre atual.

Para tanto, há a necessidade da obtenção de oócitos competentes que deem suporte ao desenvolvimento embrionário e que cheguem a termo para a geração de uma cria saudável. O conhecimento de aspectos relacionados à maturação e competência oocitária, em adição a exigências no desenvolvimento inicial de embriões equinos, propiciaram a evolução e uso de condições específicas que permitem hoje taxas de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário após cultivo *in vitro* (CIV) que cada vez mais se aproximam dos resultados observados na espécie bovina (HINRICHS, 2010). Entretanto, ainda há várias lacunas de conhecimento por serem desvendadas que permitam estratégias de modulação da foliculogênese e da dinâmica folicular em equinos que propiciem aumento nas taxas de recuperação de CCOs com maior competência oocitária.



O crescimento da população equestre de significativo valor econômico, somado ao interesse dos criadores no emprego das biotécnicas de reprodução, criou um bom cenário no âmbito acadêmico para a realização de experimentos que esclareçam mecanismos fisiológicos reprodutivos, permitindo alavancar a eficiência do emprego das biotécnicas da reprodução em equinos.

## **2. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **2.1 Hipóteses**

- a) A ablação folicular ovariana permite a sincronização de uma onda de desenvolvimento folicular de forma temporal repetível e previsível na população selecionada de éguas cíclicas.
- b) A utilização de hormônios exógenos com efeito folículo-estimulante na emergência de nova onda folicular, após a sincronização da onda folicular de éguas cíclicas, induz à codominância folicular subsequente.

### **2.2 Objetivos gerais**

- a) Desenvolver protocolo eficaz de manipulação do desenvolvimento folicular ovariano em equinos, pela sincronização física da onda folicular e indução hormonal de codominância folicular, para aplicação em biotécnicas da reprodução em equinos.

### **2.3 Objetivos específicos**

- a) Caracterizar a dinâmica folicular ovariana de éguas cíclicas mestiças de salto e da raça Brasileiro de Hipismo pertencentes ao 3º Regimento da Cavalaria da Guarda de Porto Alegre do Exército Brasileiro.
- b) Determinar a taxa de sincronização da onda folicular ovariana em éguas cíclicas após a aspiração (ablação) folicular por ultrassonografia transvaginal durante o diestro.
- c) Determinar o efeito da administração sequencial de GnRH após a sincronização física da onda folicular ovariana sobre o desenvolvimento e dinâmica folicular de éguas cíclicas.
- d) Observar o efeito da administração sequencial de GnRH após a sincronização física da onda folicular ovariana sobre a qualidade e competência oocitária através da avaliação morfológica e ativação partenogénica de CCOs obtidos por aspiração folicular (OPU) *in vivo* e submetidos à maturação (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ciclo estral e dinâmica folicular da égua

##### 3.1.1 *Ciclo estral*

A atividade reprodutiva da égua é caracterizada por ser predominantemente monovulatória, de incidência variável entre indivíduos e raças (GINTHER *et al.*, 2008), e por ser influenciada pela incidência solar, sendo esta considerada poliéstrica estacional de fotoperíodo positivo. Sendo assim, quando há maior incidência solar no hemisfério em que o animal se encontra, este apresenta ciclos ovulatórios sucessivos dentro de período médio de 22 dias (GINTHER, 1992).

O ciclo reprodutivo no equino pode ser dividido em fase anovulatória e ovulatória. A estação anovulatória pode ser subdividida em fase transicional de outono, fase de anestro, e fase transicional de primavera. Durante a fase transicional de primavera há desenvolvimento de ondas foliculares anovulatórias as quais antecedem a fase ovulatória, período em que há reinício dos ciclos devido ao aumento repetitivo de LH circulante, determinando a primeira ovulação da estação (BAKER e KENNEY, 1980). A fase de anestro consiste no período de desenvolvimento folicular mínimo, quando há baixa intensidade solar no outono e inverno, com duração que varia entre 40 dias a 8 meses, conforme a localização geográfica (HUGHES *et al.*, 1975).

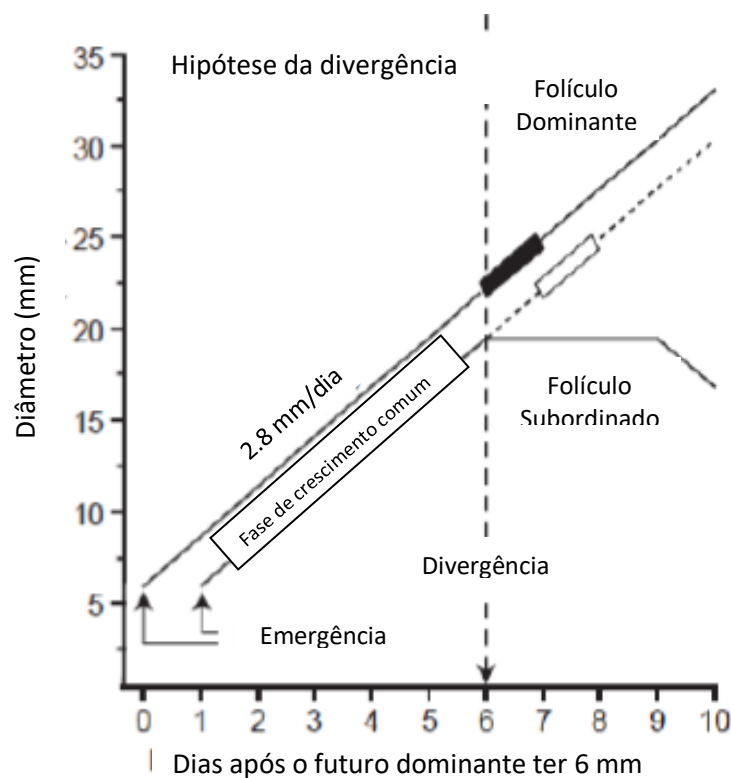
No ponto de vista prático, o ciclo estral nas éguas é constituído por duas fases distintas: o diestro e o estro. A fase de diestro, ou fase lútea, é caracterizada pela presença de corpo lúteo (CL). Logo após a ovulação, há a produção de progesterona pelas células lúteas, atingindo nível máximo entre os dias 5 e 6 pós-ovulação, sendo responsável pelo comportamento de não receptividade ao macho, além de induzir a preparação do trato reprodutivo para uma possível prenhez (DAELS *et al.*, 1991). Por outro lado, o estro, ou fase folicular, tem este nome devido à presença de pelo menos um folículo dominante no

ovário, cujas células da granulosa produzem altas quantidades de estrógeno (GINTHER, 1992), o qual determina a exteriorização de sinais característicos desta fase, como o interesse pelo garanhão e edema uterino, e preparação do trato reprodutivo para a cópula e concepção (BURATINI, 1997).

### 3.1.2 *Características da dinâmica folicular ovariana*

A dinâmica folicular é um processo fisiológico sequencial de crescimento e de regressão de grupos de folículos antrais ovarianos, sendo cada sequência dividida em três fases, denominadas de recrutamento, seleção e dominância (GINTHER *et al.*, 2004). Portanto, há mudanças macroscópicas contínuas nestes órgãos consequentes do desenvolvimento de folículos a partir de ondas foliculares durante o intervalo interovulatório (IIO; GINTHER *et al.*, 2004). Uma onda folicular refere-se a uma população de folículos que emerge e cresce em sincronia a partir da estimulação de FSH (GASTAL *et al.*, 1997), sendo a fase de emergência ou recrutamento. Gastal *et al.* (2004) observaram que aproximadamente 7 a 11 folículos entram em fase comum de crescimento no recrutamento durante um período médio de 6 dias, quando aumentam em média 3 mm ao dia. Até o final deste momento, todos os folículos recrutados têm potencial de tornarem-se o dominante (GASTAL *et al.*, 2004). O final da fase de crescimento comum é marcado pela fase de seleção, com a atresia dos folículos menores e crescimento dos maiores, até chegar à fase de divergência folicular, quando o desenvolvimento entre o futuro folículo dominante e os demais subordinados se torna discrepante (GASTAL *et al.*, 1997). Em éguas, o momento de divergência ocorre quando o maior folículo atinge cerca de 22,5 mm de diâmetro, e o segundo maior atinge ao redor de 19 mm (Figura 1). O maior folículo, então, atinge a dominância, com os folículos remanescentes, denominados subordinados, entrando em atresia (GASTAL *et al.*, 1997; GINTHER *et al.*, 2004; 2008).

A frequência das ondas foliculares difere entre as espécies. Em éguas, podem ser observadas uma a duas ondas foliculares durante o IIO, com crescimento e regressão de vários folículos. As ondas maiores são ondas em que o folículo maior se torna dominante e podem ser divididas em primária ou secundária, conforme a fase do ciclo estral em que ocorrem. A onda maior primária emerge no início do diestro e ocasiona o desenvolvimento do folículo que será o pré-ovulatório ao final do estro; já a onda maior secundária é gerada durante o início do estro, podendo resultar em ovulação durante o diestro. Por outro lado, as ondas menores são ondas em que há seleção de população de folículos, porém o folículo maior não se torna dominante e regride (GINTHER *et al.*, 2008).



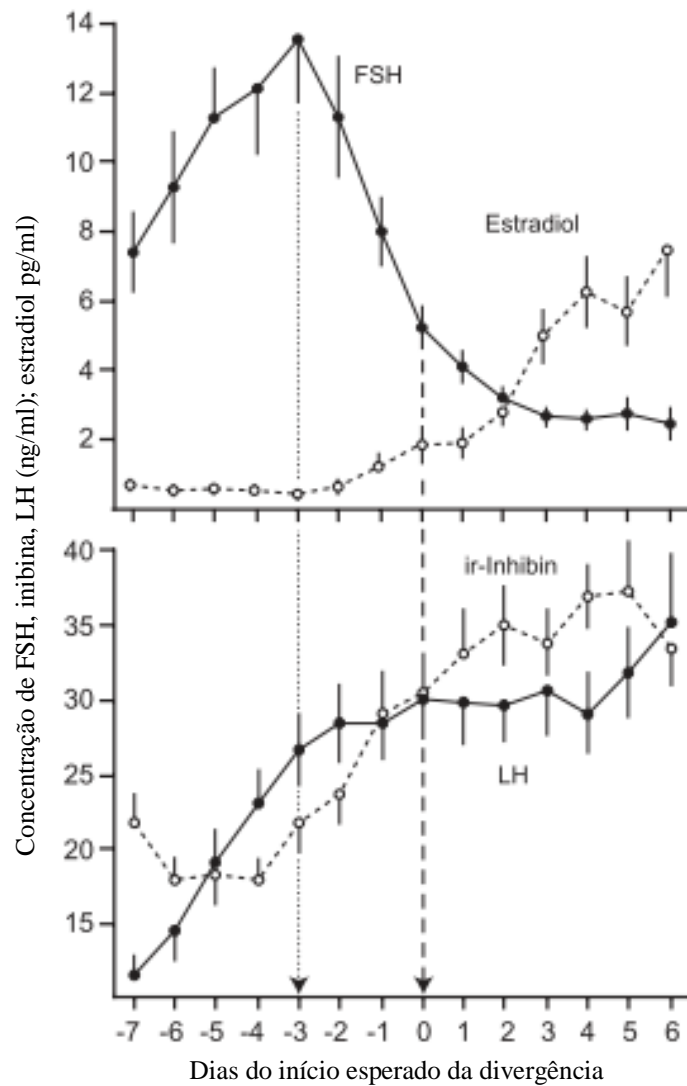
**Figura 1.** Ilustração esquemática do modelo de dois folículos (primeiro e segundo maior) em equinos. O primeiro folículo emerge um dia antes e demonstra vantagem de tamanho, sendo o futuro folículo dominante. A fase de crescimento comum termina quando há a divergência entre os folículos quando o maior atinge o diâmetro indicado (22,5 mm, barra preta), associado a mecanismos hormonais que inibem o crescimento do segundo maior, ou futuro subordinado (GASTAL *et al.*, 1997).

### 3.1.3 Mecanismo neuroendócrino da dinâmica folicular

A divergência folicular é apenas o fenômeno físico visível de diferenciação no desenvolvimento que foi iniciado com antecedência por via de *feedback* hormonal (GINTHER *et al.*, 2005). No princípio de uma onda folicular, a elevação do FSH determina a emergência de um grupo de folículos gonadotrofino-dependentes (recrutamento, folículos com cerca de 5 a 6 mm em equinos), ocorrendo aumento na concentração até que o maior folículo atinja cerca de 13 mm, aproximadamente três dias antes da divergência, o que dará início à fase de seleção. O início deste declínio do FSH é causado pela ação da inibina, principalmente, e do estradiol (Figura 2), secretados pelas células da granulosa dos folículos em crescimento (DONADEU e GINTHER, 2001). O estradiol inibe a secreção de GnRH no centro tônico hipotalâmico, reduzindo o estímulo à secreção de FSH, enquanto a inibina bloqueia a secreção de FSH diretamente nos gonadotrofos (BERGFELT, 2009). Quanto maiores os folículos, maior será a secreção de inibina e estradiol, e maior será o efeito de *feedback* negativo à secreção de FSH, o que determinará uma estagnação de crescimento e posterior atresia dos folículos menores, que dependem de níveis séricos de FSH elevados para seguir seu desenvolvimento. Os folículos maiores, por sua vez, necessitam de menos FSH e começam a depender mais da elevação do LH (GINTHER *et al.*, 2004).

Portanto, o papel da redução dos níveis circulantes de FSH é fundamental para a ocorrência do desvio de crescimento entre os folículos, uma vez que esta não ocorre após aplicação de FSH ou imunização contra inibina, levando ao desenvolvimento de codominância folicular (McCUE *et al.*, 1992). Na medida em que a concentração de FSH diminui, a concentração peri-ovulatória de LH começa a se elevar progressivamente pela ação da elevação intensa de estradiol do folículo dominante, que desencadeia a liberação de GnRH pelo centro pré-ovulatório por *feedback* positivo, elevando ainda mais o LH

sérico e desencadeando a maturação do folículo, do oócito, e conseqüentemente a ovulação (GINTHER *et al.*, 2004). No equino, o LH atinge o pico de concentração máxima um dia após a ovulação, decrescendo gradualmente alguns dias após (GINTHER, 1992; GINTHER *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Médias das concentrações de quatro hormônios circulantes (FSH, LH, estradiol e inibina) em equinos, normalizadas de acordo com o dia de ocorrência da divergência folicular (0). A linha pontilhada representa o pico de FSH, enquanto a linha tracejada representa o dia de divergência, quando o maior folículo atinge em torno de 13 mm e 23 mm, respectivamente. (BERGFELT *et al.*, 2001).

As concentrações sistêmicas e foliculares de estradiol aumentam paralelamente ao desenvolvimento do folículo dominante e atingem pico cerca de 1 a 2 dias antes da ovulação, próximo ao momento em que o maior folículo atinge diâmetro máximo, cerca de dois a três dias antes do pico do LH (GINTHER, 1992; BERGFELT, 2009). Ligeiramente anterior à ovulação, há uma diminuição nos níveis de estradiol, o que corresponde a um aumento no FSH antes da ovulação, apesar das elevadas concentrações de inibina (GINTHER *et al.*, 2004). Ao término da onda, logo após a ovulação, ou mesmo antes da ovulação, desencadeado pelo pico de LH e mudanças funcionais no folículo dominante, há marcante diminuição dos hormônios ovarianos, especialmente da inibina, permitindo o desbloqueio hipotalâmico-hipofisiário que leva a um novo aumento na concentração de FSH e, conseqüentemente, à emergência de uma nova onda folicular que repetirá o processo e atingirá a dominância em meio ao diestro (BERGFELT, 2009).

O aumento da concentração circulante de progesterona, por sua vez ocorre de forma gradual com a proximidade da ovulação, após a elevação do LH, atingindo concentração máxima entre os dias cinco e seis após a ovulação, associando-se à formação do CL. Em um ciclo onde não houve fecundação, a duração da fase lútea do ciclo estral é em torno de 14 dias (DAELS *et al.*, 1991). Caso não houver sinalização da concepção, ocorrerá a luteólise (falha na concepção ou falha de sinalização do concepto) a partir da produção e liberação de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio até a involução do CL (GINTHER, 1985), o qual ocorre concomitante à elevação na concentração de FSH da onda folicular subsequente.



### 3.2 Efeito da estimulação hormonal exógena no desenvolvimento folicular na égua

O sucesso de técnicas avançadas utilizadas na reprodução seria maior na espécie equina se uma superovulação efetiva fosse capaz de proporcionar maior número de oócitos e maior número de embriões através de técnicas como a TE, a GIFT e a ICSI. Tal limitação se deve, principalmente, a fatores anatômicos dos ovários da espécie equina quando comparada a outras espécies, tendo estes tamanhos avantajados e posição invertida das camadas cortical e medular (SQUIRES e McCUE, 2007). Portanto, a partir destas características, a ovulação é possível apenas através da fossa ovulatória. Nas últimas quatro décadas, experimentaram-se diferentes tipos de regimes hormonais na tentativa de induzir a superovulação em éguas cíclicas, incluindo o uso de GnRH, extrato de pituitária equina (EPE), hormônio folículo-estimulante equino parcialmente purificado (eFSH) e gonadotropina coriônica equina (eCG), porém a taxa de sucesso tem sido limitada ou inconsistente (ROSER e MEYERS-BROWN, 2012).

O princípio da superovulação baseia-se em modular o controle dos hormônios responsáveis pelo crescimento do folículo dominante e inibir a regressão dos folículos subordinados, levando-os à codominância (SQUIRES e McCUE, 2007). Considerando a limitação anatômica dos ovários da espécie equina, onde não haveria a ovulação de mais de dois folículos por ovário, NAGAO *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo capaz de induzir a codominância folicular utilizando agonistas de GnRH.

Os agonistas do GnRH, como o acetato de deslorelina, são eficientes em provocar o aumento nas concentrações de FSH e LH, contornando o *feedback* negativo causado pelo estradiol no hipotálamo, apesar da ação da inibina em reduzir a síntese e a secreção de FSH (EVANS e IRVINE, 1976). No trabalho de Nagao *et al.* (2012), o acetato de deslorelina foi efetivo na indução do desenvolvimento de codominância folicular e consequente ovulação dupla em éguas, utilizando protocolo o qual consistia em

aplicações diárias de 100 µg de acetato de deslorelina imediatamente após a indução da luteólise no oitavo dia pós-ovulação até o momento em que um folículo dominante ( $\geq 30$  mm) fosse visualizado ou até que não houvesse detecção de crescimento durante três dias consecutivos. Seguindo tal protocolo foi possível duplicar o número de embriões recuperados por ciclo, aumentando a eficiência da transferência de embriões. Além disso, já foi demonstrado na espécie bovina que o GnRH exógeno é efetivo em aumentar a eficiência da técnica de aspiração folicular, melhorando a taxa de recuperação e competência dos oócitos aspirados a partir de aplicação única de 200 µg de GnRH após luteólise induzida com análogo de PGF<sub>2α</sub> (BORDIGNON *et al.*, 1997). Entretanto, alguns autores descreveram a possibilidade de ocorrência do fenômeno denominado *downregulation* após o tratamento contínuo de altas doses de análogo de GnRH, o qual seria causado pela hipersecreção inicial de gonadotrofinas após a estimulação exógena, com posterior dessensibilização da hipófise anterior ao GnRH, causando, indiretamente, uma diminuição na atividade ovariana (IRVINE, 1983; NAGAO *et al.*, 2012; AZEVEDO *et al.*, 2015).

### **3.3 Influência da aspiração folicular sobre a dinâmica folicular na égua**

O primeiro estudo a utilizar a ultrassonografia transretal para o monitoramento das estruturas do trato reprodutivo de éguas foi publicado no ano de 1980 (PALMER e DRIANCOURT, 1980) e confirmou características fisiológicas descritas anteriormente (AITKEN, 1926; GINTHER, 1979), quando se detectava o momento da seleção folicular através da palpação transretal de folículos >20 mm aproximadamente sete dias antes da ovulação (GINTHER, 1979). Em 1984, a utilização de transdutor de maior frequência passou a permitir a visualização de folículos maiores do que 2 mm em diâmetro durante o ciclo estral em equinos (GINTHER e PIERSON, 1984) e em bovinos (PIERSON e GINTHER, 1984). Porém, a identificação individual de cada folículo tornava o

monitoramento difícil, sendo possível apenas o acompanhamento de folículos >15 mm (SIROIS *et al.*, 1989). Desde então, as imagens geradas através da ultrassonografia transretal permitem o monitoramento direto e sequencial de maneira não-invasiva e de alta resolução do desenvolvimento folicular durante o IIO (GINTHER, 2017), o que trouxe um tremendo avanço no conhecimento da fisiologia ovariana nos equinos e em outras espécies mamíferas.

Com o passar dos anos, a ultrassonografia transvaginal em associação à manipulação ovariana transretal se tornou ferramenta efetiva para a obtenção do conteúdo folicular (GASTAL *et al.*, 2000) ou para injeção de fatores específicos intrafoliculares (GINTHER *et al.*, 2004; 2005). A ablação folicular se tornou um procedimento útil tanto com o objetivo de iniciar uma nova onda, anulando a possibilidade de haver perda de identificação dos folículos da onda folicular anterior e dos folículos da onda a ser acompanhada (GASTAL *et al.*, 1997; 2000; CHECURA *et al.*, 2010), quanto para estudar os efeitos endócrinos de folículos e momentos específicos da dinâmica folicular (DONADEU e GINTHER, 2001). Um procedimento muito utilizado é a ablação de todos os folículos em diâmetro específico (>5 mm) no dia 10 pós-ovulação, para que os folículos da nova onda induzida possam ser rastreados desde o princípio (6 mm; GASTAL *et al.*, 1997). Outra modalidade de estudo é a ablação do maior folículo no início da divergência folicular (22,5 mm), o que é utilizado para estudar o momento de eventos envolvidos na conversão do folículo subordinado em dominante (GINTHER *et al.*, 2001). Da mesma forma, a técnica pode ser utilizada para a obtenção de amostras do CL ou para secção de folículo antral (ISHAK *et al.*, 2018) e de tecido ovariano que poderá incluir folículos pré-antrais (ALVES *et al.*, 2016).

A ablação folicular tem sido utilizada como abordagem não esteroideal para a compreensão de detalhes acerca da natureza da dinâmica folicular em bovinos e equinos

(BERGFELT *et al.*, 1994; GINTHER *et al.*, 1996; GASTAL *et al.*, 1997; GINTHER *et al.*, 2001; GASTAL *et al.*, 2004). Através da aplicação de tal técnica, constatou-se que a partir da aspiração de todos os folículos  $\geq 6$  mm após 10 dias da ovulação, houve a emergência do primeiro folículo  $1,3 \pm 0,1$  dias após, havendo média de  $12,0 \pm 0,4$  folículos até o final do período de crescimento do coorte folicular (GASTAL *et al.*, 2004). Além disso, folículos extras emergiram esporadicamente durante o intervalo entre a divergência folicular e a ovulação, os quais atingiram diâmetro máximo de 12 mm, o que se acredita que seja devido à baixa concentração de FSH no período de divergência folicular (GINTHER *et al.*, 2001; GASTAL *et al.*, 2004). Segundo Gastal *et al.* (1997), o futuro folículo dominante emerge em média um dia antes dos demais, tendo vantagem de tamanho sobre os subordinados desde então. Além disso, o segundo folículo maior tem competência de se tornar dominante quando a ablação foi realizada até dois dias após a divergência (GASTAL *et al.*, 2004), evidenciando que a concentração de FSH chega a níveis baixos mais tarde quando comparado aos bovinos, em que o segundo folículo maior mantém tal capacidade até no máximo um dia após a divergência (GINTHER *et al.*, 2001).

Como ferramenta de indução de nova onda folicular sem interferência esteroidal exógena, a técnica de ablação folicular é capaz de causar sincronização entre a ovulação das fêmeas, representando redução de até 41% do tempo entre a indução de sincronização e a ovulação quando comparado ao tratamento hormonal de progesterona e estradiol, o qual é o protocolo mais utilizado na clínica equina (BERGFELT *et al.*, 2007). A sincronização da emergência folicular foi primeiro documentada em bovinos (BERGFELT *et al.*, 1994), sendo posteriormente realizado estudo comparativo em equinos (BERGFELT e ADAMS, 2000). De acordo com aqueles autores, a aspiração em diferentes momentos da dinâmica folicular de éguas resultou em novo crescimento

folicular dentro de um período de três dias em 90% dos animais e, seguido da aplicação de PGF<sub>2α</sub>, as ovulações foram detectadas em 81% das éguas após quatro dias da aplicação de hCG no momento em que havia presença de folículo de diâmetro  $\geq 30$  mm, demonstrando ocorrência das ovulações dentro de um período de 13 dias, variando entre 7 e 17 dias.

### 3.4 Métodos de obtenção de complexos *cumulus*-oócito (CCO)

A PIV de embriões equinos pode ser realizada tanto no âmbito clínico quanto para fins de pesquisa. Os oócitos equinos podem ser obtidos por meio da aspiração de folículos terciários (oócitos imaturos) ou pré-ovulatórios (oócitos maduros), tanto de ovários coletados *post-mortem*, quanto de animais vivos (*in vivo*) submetidos ou não a protocolos hormonais (HINRICHS, 2010).

Dell'aquila *et al.* (2001) destacam que devido à maior adesão do CCO equino à parede folicular, a aspiração do folículo da forma como é realizada em espécies como a bovina não gera uma eficiente recuperação de CCOs em termos qualitativos e quantitativos, revelando-se a taxa de recuperação de estruturas viáveis que alcançam 50% da média do que se obtém em outras espécies domésticas. Um outro fato ressaltado pelos autores é a recuperação de uma maior quantidade de CCOs em atresia, que apresentam uma frágil adesão à parede folicular. A aspiração dos CCOs realizada com agulha e seringa ou pelo uso de bomba de aspiração, pode reduzir a taxa de recuperação oocitária e prejudicar a qualidade morfológica pela remoção das células do *cumulus* (ALM *et al.*, 1997; DELL'AQUILA *et al.*, 2001). Desta forma, para que os CCOs possam ser recuperados de forma efetiva em qualquer dos métodos de aspiração, mantendo a qualidade morfológica, é fundamental que sejam realizadas sequências de curetagem da parede folicular com subsequente lavagem do conteúdo durante o procedimento de aspiração (DELL'AQUILA *et al.*, 2001; JACOBSON *et al.*, 2010).

Na aspiração folicular *post-mortem*, os ovários equinos podem ser transportados ao laboratório em até 12 h após a coleta, porém intervalos menores que 6 h entre a coleta e a aspiração proporcionam resultados mais adequados de MIV e de desenvolvimento embrionário (HINRICHS, 2018). Carnevale *et al.* (2004) destacam que quando os ovários são encaminhados rapidamente ao laboratório, a taxa de MIV dos CCOs atinge em média 50% e que a taxa de nascimento pode variar conforme a técnica de fecundação, sendo de 32% quando realizada por OT em égua receptora previamente inseminada. Por outro lado, Hinrichs *et al.* (2010) observaram 63% de prenhez após a transferência de blastocistos produzidos por ICSI.

A coleta *in vivo* de oócitos para realização de ICSI ou OT pode ser realizada em fêmeas de alto valor zootécnico, com infertilidade adquirida, e que não são mais capazes de produzir embriões pelo método convencional de coleta e TE (HINRICHS, 2018). Problemas reprodutivos na genitália tubular, como aderências uterinas ou da salpinge, metrites ou endometrites ou outras condições patológicas impedem o desenvolvimento e a manutenção da viabilidade do embrião até o dia 7 pós-fecundação (HINRICHS *et al.*, 2010). Além disso, de acordo com Choi *et al.* (2006), a eficiência do uso do sêmen congelado pode ser aumentada consideravelmente pela técnica de ICSI, já que de uma pequena amostra espermática, apenas uma célula será selecionada para cada oócito. De acordo com os autores, a ICSI é a técnica de eleição quando há baixa quantidade ou qualidade espermática disponível como, por exemplo, quando o reprodutor já morreu e há baixa disponibilidade de doses de sêmen congelado.

Conforme já mencionado, a aspiração de CCOs imaturos pode chegar a uma taxa de recuperação entre 50 a 60% quando realizadas lavagens foliculares sucessivas concomitantes à curetagem da parede folicular para desprendimento da conexão ao CCO (JACOBSON *et al.*, 2010), variando conforme a habilidade de cada técnico (HINRICHS

*et al.*, 2010). Dos CCOs aspirados, cerca de 60% são capazes de chegar à Metáfase II, dos quais 33% podem se desenvolver até o estágio de blastocisto após a ICSI (HINRICHS, 2010). Segundo Jacobson *et al.* (2010), os ovários de fêmeas equinas podem ser aspirados a cada 14 dias sem a necessidade de acompanhamento diário da atividade ovariana, mas a doadora pode ser monitorada até o momento desejado para a aspiração de todos os folículos pequenos sem a presença de folículo dominante (GALLI *et al.*, 2014). Além disso, pode-se realizar a aspiração folicular o ano todo, e não apenas durante a estação reprodutiva, sem redução da eficiência (HINRICHS *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2016). Interessantemente, CCOs imaturos podem ser mantidos em temperatura ambiente controlada (~22°C) em meio apropriado durante 16 a 18 h ou mais sem prejuízo à viabilidade (CHOI *et al.*, 2006; FOSS *et al.*, 2013), uma vez que se encontram e permanecem em quiescência na fase de prófase I da meiose I, permitindo o início da MIV e a realização da ICSI no momento mais oportuno para o laboratório.

A aspiração *in vivo* de folículo pré-ovulatório pode ser realizada após a estimulação exógena da ovulação com análogos de GnRH ou de LH. A taxa de recuperação oocitária é maior do que a aspiração de folículos terciários, podendo chegar a 80%, uma vez que a maturação ocorre predominantemente *in vivo*, com o *cumulus oophorus* se encontrando expandido e mais destacado da parede folicular (CARNEVALE e GINTHER, 1995). Além disso, a competência de desenvolvimento embrionário subsequente com estes CCOs também é mais elevada. Em dois estudos distintos comparou-se a taxa de competência através do desenvolvimento embrionário *in vitro* entre oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, resultando em 70% *versus* 30% (FOSS *et al.*, 2013) e 40% *versus* 33% (JACOBSON *et al.*, 2010), respectivamente. JACOBSON *et al.* (2010), destacam que a aspiração de folículos pré-ovulatórios é mais dispendiosa, uma vez que requer monitoramento frequente de um folículo dominante (ou de poucos, no

caso de codominância folicular) até o momento adequado para a aplicação hormonal exógena (indução da ovulação), além de sincronização técnica com o laboratório executor da ICSI, que deve ser realizada 36 a 42 h após o estímulo hormonal. Apesar de apresentar altas taxas de recuperação e desenvolvimento embrionário por não haver a possibilidade de superovulação na espécie equina, a aspiração de folículos pré-ovulatórios não é o método mais eficiente para a ICSI, tornando a aspiração de folículos terciários o método de eleição na atualidade (JACOBSON *et al.*, 2010). Mesmo com uma menor taxa de recuperação de CCOs de qualidade, com subsequente menor taxa de maturação (HINRICHS *et al.*, 2010), o uso de CCOs imaturos torna o processo mais eficiente por resultar em mais estruturas finais produzidas *in vitro* em apenas um procedimento (JACOBSON *et al.*, 2010). Porém, segundo Jacobson *et al.* (2010), métodos ou procedimentos que resultem em um incremento nas taxas de recuperação de CCOs mais competentes ainda necessitam desenvolvimento.

### **3.5 Desenvolvimento folicular e maturação oocitária**

Para que o oócito possa realizar sua função final de interação com o espermatozoide, este gameta passa por uma série de eventos durante o desenvolvimento da fêmea, estendendo-se desde o estágio de oogônia, com posterior diferenciação e estagnação meiótica no ovário fetal, até a maturação final do oócito antes da ovulação (EPPIG, 2001).

Em mamíferos, a população de folículos primordiais presentes ao nascimento será o *pool* de células germinativas disponíveis para o recrutamento durante toda a vida reprodutiva da fêmea (PEPLING, 2006; ADONA *et al.*, 2013). As células germinativas primordiais (CGP) derivam do mesoderma extraembrionário, no saco vitelínico secundário, que por sua vez deriva do mesoderma e endoderma extraembrionários. Por quimiotaxia, as CGP migram do endoderma do saco vitelínico para a crista gonadal



durante a fase embrionária (PEPLING, 2006). Uma vez estabelecidas na região de desenvolvimento das futuras gônadas, tais células perdem sua propriedade migratória, proliferam-se como gonócitos, e colonizam a gônada em formação sob a forma de oogônias na fêmea, e espermatogônias no macho (PICTON *et al.*, 1998).

Segundo Pepling (2006), as oogônias entram em sucessivas divisões mitóticas, formando grupos de células conectadas umas às outras por meio de pontes citoplasmáticas capazes de interagir com células somáticas presentes nos arredores, formando aglomerados de células germinativas. Para a posterior formação dos oócitos primários, cessam-se as divisões mitóticas, dando início à meiose I. Assim, os oócitos primários entram em estagnação meiótica no estágio de prófase I, na fase de diplóteno, havendo a formação da vesícula germinativa, onde os cromossomos são descondensados e circundados pela membrana nuclear (PEPLING, 2006). Os oócitos permanecem em meiose I até que os folículos entrem em atresia ou sofram influência do hormônio luteinizante (LH), após a puberdade (PICTON *et al.*, 1998). Conforme explicam Morita e Tilly (1999), a perda por morte celular nesta fase do desenvolvimento, na fase fetal, antes de se tornarem folículos primordiais, é massiva. Os autores ainda esclarecem que tal processo continua após o nascimento, intensificando-se após a puberdade, ocorrendo aleatoriamente até a idade adulta, sendo aumentada por fatores ambientais como o déficit alimentar. Além disto, sugere-se que esta mortalidade tem por função eliminar células germinativas com anormalidade cromossomal ou com defeitos no genoma mitocondrial (MORITA e TILLY, 1999).

Na gametogênese feminina, ao mesmo tempo em que ocorre o bloqueio da meiose, há o início da formação folicular. Neste momento, os oócitos são circundados por uma camada de células somáticas pavimentosas, chamadas de células da pré-granulosa, dando origem aos folículos primordiais (GUIGON e MAGRE, 2006). As

células foliculares primordiais são a reserva folicular ovariana, permanecendo em quiescência nuclear desde antes do nascimento até o início da puberdade, momento em que o hipotálamo inicia os padrões pulsáteis de liberação de GnRH, com resposta hipofisária de liberação de gonadotrofinas (FSH e LH; SENGER, 2003). O desenvolvimento dos folículos primordiais até alcançarem o estágio de folículos pré-ovulatórios envolve a diferenciação e proliferação das células foliculares, bem como o aumento de diâmetro, havendo uma fase pré-antral (folículos primordiais, primários e secundários), seguida da antral (folículos terciários e pré-ovulatórios; EPPIG, 2001). Dentro da fase de folículos pré-antrais, a mudança das células da granulosa de pavimentosas para aspecto cuboide diferencia os folículos primordiais para primários após a ativação (PICTON, 2001). A partir de fatores parácrinos produzidos nos próprios ovários e células somáticas circundantes (que futuramente darão origem às células da teca interna e da granulosa), há a formação de folículos secundários, os quais apresentam duas ou mais camadas de células somáticas. O estágio de folículo secundário tardio precede a formação de antro, já havendo a ZP e a diferenciação das células da teca, externamente à membrana basal, e da granulosa, internamente, havendo as células murais e as do *cumulus*, que circundam o oócito (PICTON *et al.*, 1998; ADONA *et al.*, 2013). Neste estágio, o oócito entra em fase de crescimento e há a formação do antro, dando origem ao folículo terciário, o qual, a partir de diâmetro variável entre as espécies, torna-se responsivo aos hormônios gonadotróficos, resultando na ciclicidade e no desenvolvimento folicular de forma previsível. Após a puberdade, há o estímulo do LH, responsável por garantir a competência ao folículo pré-ovulatório e por desencadear o desbloqueio da meiose, concluindo a maturação folicular e ovulação (ADONA *et al.*, 2013).

### 3.6 Competência oocitária

A competência oocitária é definida a partir da habilidade do oócito em retomar a meiose, clivar após a fecundação e proporcionar o desenvolvimento de um concepto viável, resultando no nascimento de um indivíduo saudável (HINRICHS *et al.*, 2005). O sucesso das biotécnicas da reprodução está diretamente ligado à competência do oócito, uma vez que tem efeitos na FIV, na sobrevivência embrionária inicial, na manutenção da prenhez e até mesmo no desenvolvimento fetal (WANG e SUN, 2007). Entende-se por qualidade oocitária a avaliação de características morfológicas e bioquímicas que determinam a competência, as quais são encontradas em oócitos capazes de ultrapassar uma série de estádios durante a foliculogênese, incluindo a maturação nuclear, citoplasmática, molecular e epigenética, além dos eventos iniciais da fecundação (ALBRECHT *et al.*, 2018). Para Hinrichs e Williams (1997), as características que indicam o potencial de desenvolvimento de um oócito selecionado para maturação inclui a habilidade da célula de retomar e concluir a meiose até a fase de metáfase II (competência meiótica), e de ser fecundado, gerando um embrião viável (competência de desenvolvimento). Hinrichs e Williams (1997) destacam que tais habilidades parecem estar relacionadas à configuração da cromatina da vesícula germinativa anterior à maturação, à morfologia do *cumulus oophorus* e à viabilidade e tamanho do folículo de origem. Acredita-se que o pleno desenvolvimento do oócito requer maturação citoplasmática e nuclear síncronas (GOUDET *et al.*, 1997). A maturação citoplasmática incompleta leva, durante o desenvolvimento embrionário, a alterações da passagem do controle genômico materno para o embrionário, prejudicando a reprogramação celular do embrião (KRISHER, 2004). Ainda não foram descritos métodos acurados para a determinação da maturação citoplasmática, molecular e epigenética, exceto por meio da fecundação e do desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* (KRISHER, 2004).

O CCO é usualmente classificado de acordo com o grau de compactação das células do *cumulus oophorus* e homogeneidade do citoplasma do oócito. A morfologia e sua relação com a qualidade oocitária varia entre as diferentes espécies. Em bovinos, por exemplo, a competência oocitária está relacionada com CCOs com *cumulus oophorus* compacto e ooplasma de coloração escura e uniforme (BLONDIN e SIRARD, 1995). Por outro lado, na espécie equina, há melhor taxa de maturação em CCOs que apresentam *cumulus* expandido quando comparados com os de *cumulus* compacto (60% vs. 51%, respectivamente; HINRICHS e SCHMIDT, 2000). Além disso, a maturação de CCOs com *cumulus* expandido ocorre em velocidade maior, maturando em 24 horas ao invés de 36 horas observadas em oócitos compactos (HINRICHS *et al.*, 1993). O estágio de desenvolvimento do folículo de origem determina o ambiente em que o oócito se encontra e tem influência sobre suas propriedades, incluindo sua competência de desenvolvimento (HINRICHS e WILLIAMS, 1997). Logo, oócitos oriundos de folículos de até 20 mm tendem a apresentar *cumulus* compacto, sendo estes viáveis, porém, com competência de retomada da meiose reduzida quando comparados aos oócitos de *cumulus* expandido, originados de folículos >20 mm de diâmetro ou de folículos que se encontravam sob algum nível de atresia (HINRICHS *et al.*, 2005). Sendo assim, Hinrichs (1991) concluiu que, em relação ao folículo de origem, 92% dos CCOs com *cumulus* compacto derivam de folículos viáveis e 76% dos CCOs expandidos são originários de folículos em fase intermediária ou final de atresia, curiosamente havendo maior taxa de maturação nos expandidos (74% expandidos vs. 30% compactos). Portanto, considera-se que a competência oocitária é inversa ao *status* de seu folículo de origem (HINRICHS, 1991; VERNUNFT *et al.*, 2013). Porém, CCOs com *cumulus* expandido demonstraram ter a mesma habilidade em promover após a FIV o desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto, quando comparados aos CCOs com *cumulus* compacto, ambos após a

maturação, diferente do que ocorre com CCOs na espécie bovina (LAGUTINA *et al.*, 2005).

Duas classificações da cromatina podem ser realizadas em oócitos após coloração com bisbenzimidida (*Hoechst* 34432) em estágio de vesícula germinativa, ou seja, aquelas em que o núcleo fluoresce de maneira difusa, e aquelas em que a cromatina é vista como uma massa condensada (HINRICHS *et al.*, 1993). A ocorrência de cromatina condensada é mais frequente conforme aumenta o tamanho folicular de origem, havendo *cumulus* compacto e cromatina condensada em quase 80% dos folículos maiores do que 20 mm (HINRICHS *et al.*, 1993; HINRICHS, 1997). Por outro lado, as células que apresentam fluorescência difusa são aquelas oriundas de folículos menores em que a vesícula germinativa ainda não alcançou a competência necessária para a retomada da meiose. Esta observação indica que à medida em que o oócito se torna competente, a cromatina se condensa. Tal prevalência de configuração de cromatina condensada em oócitos oriundos de folículos maiores sugere que a condensação representa a configuração da cromatina de oócitos totalmente desenvolvidos previamente ao estímulo ovulatório de gonadotrofinas (HINRICHS, 1997). Desta forma, a obtenção de CCOs de folículos de maior diâmetro tendem a ser mais competentes, com o desenvolvimento de protocolos e manipulação da foliculogênese e competência oocitária sendo promessas úteis para uso em biotécnicas da reprodução em equinos.

### **3.7 A égua como modelo experimental na fisiologia ovariana**

Os roedores são o modelo experimental mais popular utilizado em pesquisas no âmbito médico, porém, em certas ocasiões, animais domésticos apresentam fisiologia e respostas endócrinas mais fisiologicamente próximas aos humanos, tornando-os um modelo mais adequado (IRELAND *et al.*, 2008). Ireland *et al.* (2008) concluíram que, quando utilizados em estudos de duplo-propósito, modelos animais de não roedores

demonstram ganho elevado ao conhecimento tanto na área médica quanto na área veterinária.

Segundo Ireland *et al.* (2008), a elucidação dos mecanismos relacionados à competência oocitária e a identificação de marcadores de qualidade é de alta importância para ambas as áreas, pois o melhor entendimento destes temas causaria grande impacto na eficiência nas tecnologias da reprodução assistida em animais domésticos e em humanos. Portanto, a pesquisa comparativa entre espécies de mecanismos biológicos semelhantes abre caminhos a partir de espécie com determinada vantagem de estudo para obtenção de conhecimento preliminar e posterior aplicação em espécie distinta, na qual a realização de estudos é difícil ou impraticável (GINTHER, 2012).

Apesar de ser um animal de fácil acesso e manipulação, os roedores não devem ser o modelo de eleição para pesquisa comparativa de dinâmica folicular ovariana em mulheres e em grandes mamíferos. Devido ao tamanho corporal destes animais, o conhecimento acerca de seu desenvolvimento folicular é muito limitado (MIRCEA *et al.*, 2009), além de apresentarem diferenças nos padrões endócrinos e progressão rápida dos processos reprodutivos devido ao tempo de vida curto. Em contrapartida, resultados de estudos relacionados à eficiência reprodutiva sobre a idade nas espécies equina e humana se tornam cada vez mais paralelas (CARNEVALE, 2008).

Assim como na mulher, as éguas são policíclicas e monovulares com similaridades na dinâmica folicular e nas ondas foliculares durante o IIO, apresentando ainda a vantagem do grande tamanho folicular (GINTHER, 2012). As semelhanças incluem: (a) a emergência do folículo dominante ocorrendo um dia antes do folículo que virá a ser o segundo maior; (b) uma taxa de crescimento folicular durante o período de crescimento comum proporcional; (c) mesma duração de intervalo entre emergências foliculares sequenciais; e (d) ocorrência de onda maior anovulatória em ambas as espécies

(GINTHER *et al.*, 2004). As semelhanças entre as espécies também estão associadas a mudanças nas concentrações hormonais. Anteriormente à divergência, há o aumento de estradiol e LH que mais tarde estarão associados à ovulação (GINTHER *et al.*, 2005; JACOB *et al.*, 2009). Além disso, a concentração máxima de FSH ocorre no dia da emergência da onda folicular em ambas as espécies (GINTHER *et al.*, 2005). Tais características na ocorrência das ondas foliculares, na taxa de crescimento e momento de seleção folicular, além das variações hormonais, suportam a conclusão de que as fêmeas da espécie equina são um bom modelo para estudo comparativo sobre a foliculogênese em outras espécies, como a humana (GINTHER, 2012).

A demanda econômica crescente favorece o aprofundamento científico sobre o controle dos processos reprodutivos e mecanismos fisiológicos em equinos com o objetivo de aumentar a eficiência das biotecnologias da reprodução disponíveis na espécie, bem como o desenvolvimento de técnicas até então de repetibilidade ainda não atingida na atualidade (HINRICHS, 2018). Uma vez que seja possível desenvolver um protocolo de superestimulação ovariana na espécie equina a partir da aplicação de hormônios exógenos e/ou a partir de modulação física dos ovários, será possível obter um maior aproveitamento da técnica de OPU, havendo maior recuperação de oócitos mais competentes. Assim, haverá avanço considerável nas mais diversas ferramentas da biotecnologia da reprodução na espécie equina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local, animais, e manejo geral e nutricional

Dois experimentos foram executados durante as estações reprodutivas de 2018/2019 (Experimento 1) e 2019/2020 (Experimentos 1 e 2), sob protocolo de número 37743 aprovado pela Comissão de Ética de Utilização Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), utilizando fêmeas equinas híbridas mestiças de salto e da raça Brasileiro de Hipismo, não-prenhes, não-lactantes, pertencentes ao Exército Brasileiro, selecionadas conforme a idade, escore de condição corporal (ECC), docilidade e ciclicidade reprodutiva. As fêmeas estavam localizadas junto às dependências do 3º Regimento de Cavalaria de Guarda de Porto Alegre, sendo mantidas em cocheiras individuais durante a noite, e retiradas para um piquete com pastagem nativa sob luz natural durante o dia, com água, sal mineral e pasto *ad libitum*. O arração era realizado cinco vezes ao dia com ração concentrada comercial (aproximadamente 2,5 kg/dia/animal, contendo 14,0% de proteína bruta, 3,5% de extrato etéreo, e 2,9 Mcal de energia digestível) e feno de alfafa.

As atividades com animais incluíram a (a) seleção das fêmeas para os experimentos, por critérios de saúde, idade, ECC, docilidade e ciclicidade; (b) avaliação da funcionalidade ovariana, sincronização do ciclo estral, e acompanhamento das ondas de desenvolvimento folicular e das ovulações por meio de ultrassonografia transretal; (c) ablação folicular ovariana para a sincronização da onda folicular, e (d) OPU para a coleta de CCOs. Após a recuperação dos CCOs pela OPU, os processos de (a) MIV, (b) ativação partenogenética e (c) cultivo embrionário *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), percurso o qual durava cerca de 10 minutos (7,5 km).



## **4.2 Experimento 1 – Caracterização da dinâmica folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular**

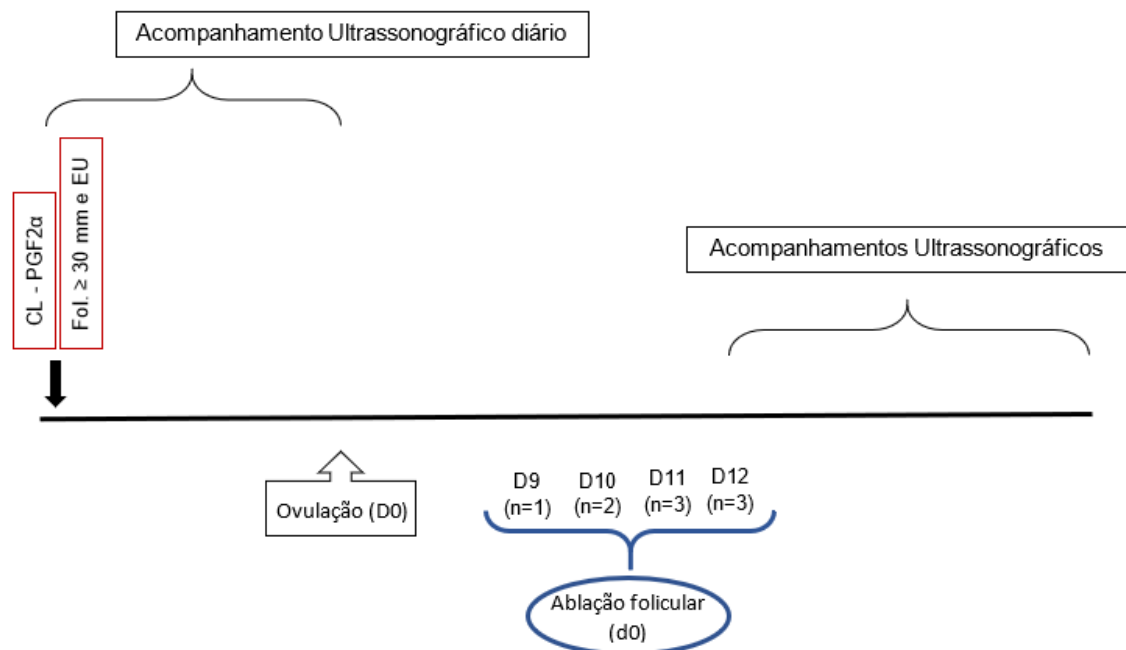
O Experimento 1 foi realizado com o objetivo de determinar o padrão de desenvolvimento folicular em função do tempo no grupo de animais antes e principalmente após a ablação folicular

### *4.2.1 Seleção dos animais, manipulação do ciclo estral e monitoramento ultrassonográfico do trato reprodutivo equino*

Foi realizada avaliação ginecológica em um grupo de 17 éguas selecionadas de um total de 26 fêmeas. Para tanto, cada fêmea foi conduzida ao tronco de contenção de maneira ordenada para a realização da palpação transretal das estruturas do trato reprodutivo interno (ovários e útero). Em seguida, realizou-se exame ultrassonográfico transretal em Modo B (A5V; Sonoscape Medical Corp., Guangdong, China) com transdutor linear (7,5 MHz) para a visualização da genitália tubular e de estruturas ovarianas para a determinação da ciclicidade e fase do ciclo estral. Das 17 fêmeas cíclicas, avaliou-se a presença de CL em um ou em ambos os ovários, indicando diestro (n = 10), ou ausência de CL e a presença de folículo >30 mm e edema uterino, indicando estro (n = 7). As dez fêmeas em diestro, após receberem 5 mg (1 mL) de PGF<sub>2α</sub> (Dinoprost de trometamina, Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis, Campinas, Brasil) por via intramuscular, e as sete fêmeas em estro foram acompanhadas por ultrassonografia transretal diariamente por 14 dias ou até a ovulação (D0), a qual foi determinada pela visualização de pelo menos um novo CL após o desaparecimento de folículo(s) pré-ovulatório(s). Também se acompanhou qualitativamente o desenvolvimento folicular para a determinação de codominância e de ovulações duplas.

#### 4.2.2 Ablação folicular guiada por ultrassonografia transvaginal

A ablação folicular ovariana por aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal, conforme descrito abaixo, foi realizada durante o período de diestro subsequente à ovulação, nos dias 9 (n=1), 10 (n=2), 11 (n=3) ou 12 (n=3) do ciclo, das nove fêmeas selecionadas, conforme ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Representação cronológica das atividades e do delineamento experimental realizados no Experimento 1, com a caracterização da dinâmica folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular (d0=D9, D10, D11, D12 após a ovulação, ou D0). CL: CL PGF2α: análogo sintético de PGF2α; EU: edema uterino.

#### 4.2.3 Caracterização da dinâmica folicular pós-ablação

Após a ablação (dia 0 = d0), iniciou-se o acompanhamento da nova onda folicular por meio de exames ultrassonográficos periódicos, realizados nos dias 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 18 pós-ablação, com a quantificação e a mensuração individual de folículos ovarianos maiores do que 5 mm, a determinação da ovulação, e a observação do crescimento da onda folicular subsequente.

As medidas de altura e largura do antro de cada folículo, geradas pelas imagens ultrassonográficas, foram utilizadas para o cálculo da média do diâmetro folicular. A partir disto, os folículos foram classificados por tamanho e por dia, em duas modalidades: (a) modalidade métrica, conforme realizado por Goudet *et al.* (1997), com a segregação de folículos a intervalos de 5 mm, agrupados em 5 a 9 mm; 10 a 14 mm; 15 a 19 mm; 20 a 24 mm; 25 a 29 mm; 30 a 34 mm; 35 a 39 mm; 40 a 44 mm; e > 45 mm; e (b) modalidade funcional, com a segregação de folículos em intervalos entre 5 e 13 mm; 14 e 23 mm; 24 e 34 mm; e  $\geq 35$  mm, com base nas características neuroendócrinas e morfofisiológicas foliculares descritas por Gastal *et al.* (1997) e Jacob *et al.* (2009). Em seguida, baseando-se nas curvas de crescimento folicular, caracterizaram-se as ondas foliculares das éguas utilizadas no experimento, visando determinar temporalmente os fenômenos de emergência/recrutamento, seleção, divergência e dominância folicular e ovulação, e ultimamente, para eleger o momento mais adequado na onda folicular pós-ablação para a realização de aspiração folicular (OPU) para a obtenção de CCOs no Experimento 2. Também se determinaram as taxas de codominância e de ovulações duplas subsequentes à ablação.

### **4.3 Experimento 2 – Indução da codominância folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular e desenvolvimento embrionário após a OPU**

O Experimento 2 foi realizado durante duas estações reprodutivas consecutivas, sendo uma parte realizada em fevereiro e março de 2019, e outra parte em dezembro de 2019.

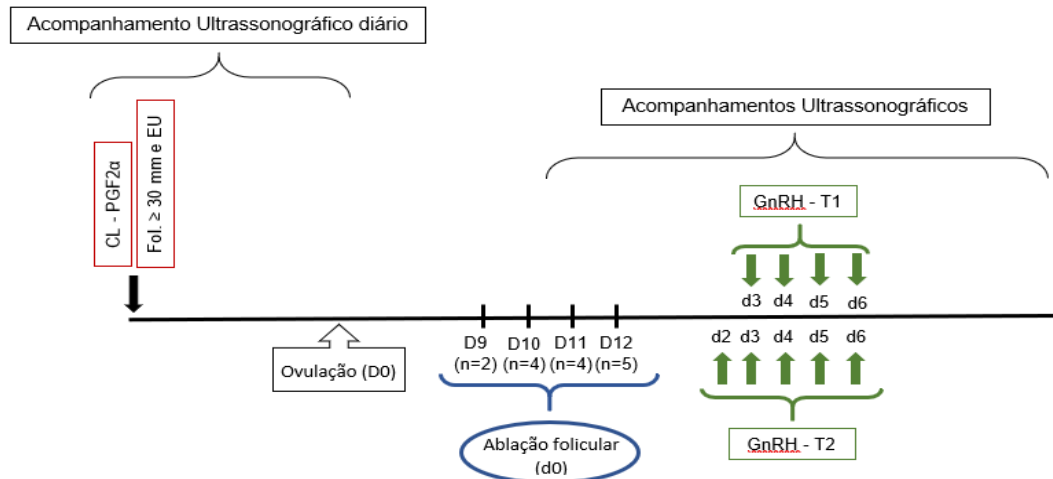
#### *4.3.1 Seleção dos animais, manipulação do ciclo estral e monitoramento ultrassonográfico do trato reprodutivo equino*

Um total de 25 fêmeas mestiças foi examinado para a manipulação do ciclo estral e o monitoramento ultrassonográfico do trato reprodutivo até a determinação da ovulação

(D0), conforme descrito para o Experimento 1. Um total de 16 fêmeas (94,1%) ovulou dentro do período de avaliação de 10 dias, após acompanhamento diário por ultrassonografia desde o exame inicial, com quatro de cinco fêmeas que receberam hormônio luteolítico ovulando em  $8,6 \pm 1,0$  dias (6 a 10 dias), e 10 de 11 fêmeas com folículo dominante ( $>30$  mm) e sem CL ovulando em  $6,8 \pm 1,2$  dias (5 a 10 dias). Duas fêmeas foram avaliadas em dois ciclos estrais, com uma sendo monitorada em temporadas reprodutivas distintas, e a outra em dois ciclos na mesma temporada, com um ciclo estral de intervalo. Também se avaliou a ocorrência de codominância folicular e taxa de ovulação dupla. Uma das fêmeas foi removida do experimento pela ocorrência de estrutura característica de HAF no quarto dia pós-ablação (d4), com os resultados a partir da ablação folicular apresentados abaixo representando dados de 15 fêmeas, independente dos grupos experimentais.

#### *4.3.2 Ablação folicular guiada por ultrassonografia transvaginal*

Após a determinação da ovulação (D0), as 15 fêmeas selecionadas foram alocadas para a ablação folicular ovariana por aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal, conforme descrito abaixo, realizada durante o período de diestro subsequente, nos dias 9 (n=2), 10 (n=4), 11 (n=4) e 12 (n=5) do ciclo, conforme ilustrado na Figura 4, a qual inclui os grupos experimentais.



**Figura 4.** Representação cronológica das atividades e do delineamento experimental realizados no Experimento 2, com a caracterização da dinâmica folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular (d0=D9, D10, D11, D12 após a ovulação, ou D0), conforme os grupos experimentais (Controle, não apresentado, sem hormônio exógeno; GnRH 3-6, tratamento com 125 µg de GnRH a cada 12 h, do dia 3 ao dia 6 pós-ablação, ou d3 ao d6; GnRH 2-6, tratamento com 125 µg de GnRH a cada 12 h, do dia 2 ao dia 6 pós-ablação, ou d2 ao d6). CL: CL; PGF<sub>2α</sub>: análogo sintético de PGF<sub>2α</sub>; EU: edema uterino; GnRH: análogo sintético do hormônio liberador de gonadotrofinas.

#### 4.3.3 Caracterização da dinâmica folicular pós-ablação e após administração exógena de análogo do GnRH

Após a realização das ablações foliculares (d0), as 15 éguas foram aleatoriamente segregadas em três grupos experimentais: (a) Grupo Controle (n=6), fêmeas que não receberam hormonioterapia exógena; (b) Grupo Tratamento 1 (GnRH 3-6, n=5), fêmeas submetidas a aplicações de duas doses diárias de 125 µg (0,5 mL) de análogo sintético do GnRH (acetato de deslorelina, Sincrorrelin<sup>®</sup>, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) do d3 ao d6 pós-ablação; e (c) Grupo Tratamento 2 (GnRH 2-6, n=4), com fêmeas sendo submetidas a aplicações de duas doses diárias de 125 µg de análogo sintético do GnRH do d2 ao d6 pós-ablação. Independente do grupo experimental, iniciou-se o acompanhamento da nova onda folicular de todas as éguas a partir do d1 após a ablação por meio de exames ultrassonográficos realizados diariamente até o dia da aspiração folicular (OPU) para a recuperação de CCOs no d6 em um subgrupo de fêmeas dos grupos

Controle (n=4) e GnRH 3-6 (n=4), ou até a ovulação pós-ablação nas fêmeas remanescentes dos grupos Controle (n=2) e GnRH 3-6 (n=1), e as do grupo GnRH 2-6 (n=4), com a quantificação e a mensuração individual de folículos ovarianos maiores do que 5 mm na onda folicular pós-ablação, e classificação de folículos por tamanho e por dia, nas modalidades métrica e funcional, conforme o Experimento 1.

#### **4.4 Aspiração folicular ovariana por ultrassonografia transvaginal para a ablação folicular ou para a coleta de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) pela OPU**

*Ablação folicular.* A ablação folicular consistiu na aspiração do conteúdo folicular de todos os folículos ovarianos maiores do que 5 mm de diâmetro, sob visualização ultrassonográfica por guia transvaginal. Os procedimentos durante o decorrer dos Experimentos 1 e 2 foram realizados por meio da aspiração dos folículos via ultrassonografia transvaginal com transdutor convexo (Mindray DP 2200 Vet, Schenzen, China) e bomba de vácuo para aspiração com tubulação e filtro hidrofóbico (WTA<sup>TM</sup>, São Paulo, Brasil) acoplados à uma agulha descartável de 12 G de lúmen simples (Cook Veterinary Products Inc, Austrália), conforme Gastal *et al.* (1997). Após a sedação e analgesia, os animais foram contidos em tronco; a cauda de cada fêmea era protegida por bandagem e fixada lateralmente ao animal para manter a higiene do períneo e facilitar a realização do procedimento. Realizava-se a limpeza manual da ampola retal e subsequente assepsia do períneo com água e sabão neutro. A guia transvaginal foi inserida no fundo de saco vaginal, e, por via transretal, os ovários foram posicionados individualmente contra o transdutor, sendo possível a visualização dos folículos ovarianos. Com a agulha inserida no interior de cada folículo, acionava-se a bomba de vácuo (com pressão negativa a aproximadamente 250 mmHg) para a aspiração do conteúdo folicular em um frasco descartável de 500 mL. Antes do término de cada

procedimento, visualizava-se o parênquima ovariano para a certificação da ausência de folículos maiores do que 5 mm em diâmetro.

Ovum Pick Up. O procedimento de OPU foi realizado em um sub-grupo das fêmeas dos Grupos Controle (n = 3) e GnRH 3-6 (n=3), durante Experimento 2, no sexto dia pós-ablação (d6). A coleta de CCOs foi realizada por meio da aspiração dos folículos via ultrassonografia transvaginal com transdutor convexo (Mindray, DP 2200 Vet, Schenzhen, China) e agulha de 12 G de duplo lúmen para curetagem e lavagem constante do folículo (COOK *et al.*, 1993) com solução de PBS suplementada com 5% de soro sanguíneo equino inativado (SSE) e 20 UI/mL de heparina sódica (Blau Farmacêutica, São Paulo, Brasil), conforme Galli *et al.* (2002), por meio de sistema à vácuo. Os procedimentos de preparação dos animais para a aspiração folicular *per se* e dos cuidados pós-aspiração foram idênticos aos descritos para a ablação folicular, exceto com respeito à OPU propriamente dita. Para tanto, após a inserção da agulha no interior do lúmen folicular, realizavam-se cinco a dez ciclos sucessivos de lavagem, que incluíam a aspiração até o colapso do folículo, a curetagem folicular pela escarificação do interior do folículo com o bisel da agulha de aspiração por movimentos circulares alternados, e a infusão de meio de lavagem até o preenchimento do folículo, com o reinício do ciclo. Como na ablação folicular, o conteúdo da aspiração, curetagem e lavagem folicular foi coletado em um frasco descartável estéril de 500 mL.

Tanto após a OPU quanto após a ablação folicular, as fêmeas eram conduzidas às cocheiras no final dos procedimentos, onde permaneciam em observação e em repouso e jejum absoluto durante o período de duas horas, para mitigar possíveis efeitos adversos dos sedativos, como a diminuição da motilidade gastrointestinal e consequente risco de síndrome do abdômen agudo.

## 4.5 Recuperação dos CCOs e produção *in vitro* de embriões equinos por partenogênese

Todos os reagentes utilizados para a PIV de embriões equinos foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

### 4.5.1 Recuperação e transporte dos CCOs equinos

Após a OPU, o fluido resultante das aspirações de ambos os ovários de cada fêmea, de cada grupo experimental, foi filtrado em filtro de tela de nylon com poros de 79 micrometros (WTA<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Após lavagem com PBS, o conteúdo resultante da lavagem foi vertido para uma placa de Petri de 100 mm para pesquisa dos CCOs sob lupa estereomicroscópica em aumento de 10 a 20x. Os CCOs foram classificados em expandidos (1 - Ex), compactos (2 - Cp) ou desnudos (3 - De), conforme presença e morfologia das células do *cumulus oophorus*, e em homogêneos (1) ou heterogêneos (2), conforme a morfologia do ooplasma, de acordo com classificação de Choi *et al.* (1993) e Hinrichs *et al.* (2010). Após a classificação morfológica, os CCOs foram lavados e mantidos em meio de manutenção (*holding*) composto de TCM 199 (M2520) suplementado com 2 mM de NaHCO<sub>3</sub> (S5761), 50 µM de cisteamina (M9768), 2 mM de piruvato de sódio (P4562), e 10% de soro fetal bovino (SFB), sob temperatura controlada entre 22 e 25°C (LOVE *et al.*, 2002), em microtubos de fundo cônico para o transporte ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução da FAVET/UFRGS, o qual se localizava a 10 minutos, onde então foram submetidos à MIV.

### 4.5.2 Maturação *in vitro* (MIV)

No laboratório, os CCOs foram lavados e mantidos em meio de bancada, composto de TCM-199 (M2520) suplementado com 2 mM de NaHCO<sub>3</sub> (S5761), 50 µM de cisteamina (M9768), 2 mM de piruvato de sódio (P4562) e 10% de SFB, a 22-25°C, até o momento propício para o início da MIV, conforme o horário de término das



aspirações foliculares. No final da tarde do dia de cada OPU, os CCOs foram retirados dos microtubos, lavados em gotas de 100  $\mu$ L em placa de Petri de 100 mm e transferidos para placa de Petri em microgotas individuais de 10  $\mu$ L de meio de MIV contendo TCM-199 com 10% de SFB, 1 mM de piruvato de sódio, 50 ng/mL de EGF, 0,1 UI/mL de LH e 0,1 UI/mL de FSH, sob óleo mineral, para a MIV por 36 h a 38,8°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada (GALLI *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2006). Após 36 h, as células do *cumulus oophorus* foram removidas por pipetagem em meio *holding* contendo hialuronidase a 0,1%, para a avaliação da taxa de maturação, caracterizada pela presença do primeiro corpúsculo polar e subsequente ativação química dos oócitos por partenogênese.

#### 4.5.3 Ativação partenogenética e desenvolvimento embrionário após cultivo *in vitro*

Os oócitos maturados *in vitro* foram submetidos à ativação partenogenética com o objetivo de avaliar a competência oocitária (CARNEIRO *et al.*, 2001) através da exposição a 5  $\mu$ M de ionomicina por 7 min, seguida da incubação em 2 mM de 6-DMAP e 5  $\mu$ g/mL de cicloheximida por 4 h. Os zigotos putativos foram cultivados *in vitro* em incubadora a 38,8°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada em meio de cultivo *in vitro* (CIV) composto de meio DMEM/F-12 (50/50%, v/v), suplementado com 10% de SFB, aminoácidos essenciais e não-essenciais, 1,5 mM de D-glucose, e 0,4% de BSA (HINRICHS *et al.*, 2005). As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas após 72 h e no Dia 7 de CIV pós-ativação, respectivamente.

## 4.6 Análise estatística

Os dados qualitativos obtidos no Experimento 2 relativos às distribuições de folículos por tamanho, entre intervalos por diâmetro ou pelos dias das avaliações, e às taxas de recuperação oocitária após a OPU, de proporção de CCOs conforme avaliação morfológica, de MIV, de clivagem e de blastocistos foram analisados pelo teste do  $\chi^2$  ou

pelo Teste Exato de Fisher, para  $P < 0,05$ . Os dados quantitativos observados no Experimento 2 relativos à área e diâmetro folicular, crescimento folicular diário, e número de folículos por fêmea e por ovário foram analisados por ANOVA, com as comparações pareadas pelo teste de Tukey, para  $P < 0,05$ , considerando o dia da avaliação e os tratamentos como fatores com efeitos fixos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento 1

#### 5.1.1 Caracterização da dinâmica folicular ovariana pré- e pós-ablação folicular

No Experimento 1, a dinâmica folicular e o comportamento das ondas foliculares em função do tempo foram caracterizados durante 9 IIOs.

Anteriormente à ablação, um total de nove fêmeas ovulou no período de monitoramento (D0), sendo cinco de dez éguas que receberam  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , com ovulação em  $9,6 \pm 1,2$  dias (7 a 11 dias), e quatro de sete fêmeas que apresentavam folículo dominante, que ovularam em  $9,2 \pm 1,7$  dias (7 a 12 dias), com a ovulação ocorrendo mais precocemente em éguas com folículos dominantes de maior diâmetro no início do estudo. As oito fêmeas que não ovularam fisiologicamente no intervalo de 14 dias após a primeira avaliação foram removidas do experimento, com as causas de eliminação incluindo atraso da ocorrência de ovulação no período de monitoramento (n=3) e falhas na ovulação *per se* por ocorrência de folículo hemorrágico anovulatório (HAF, *hemorrhagicum anovulatory follicle*, n=5).

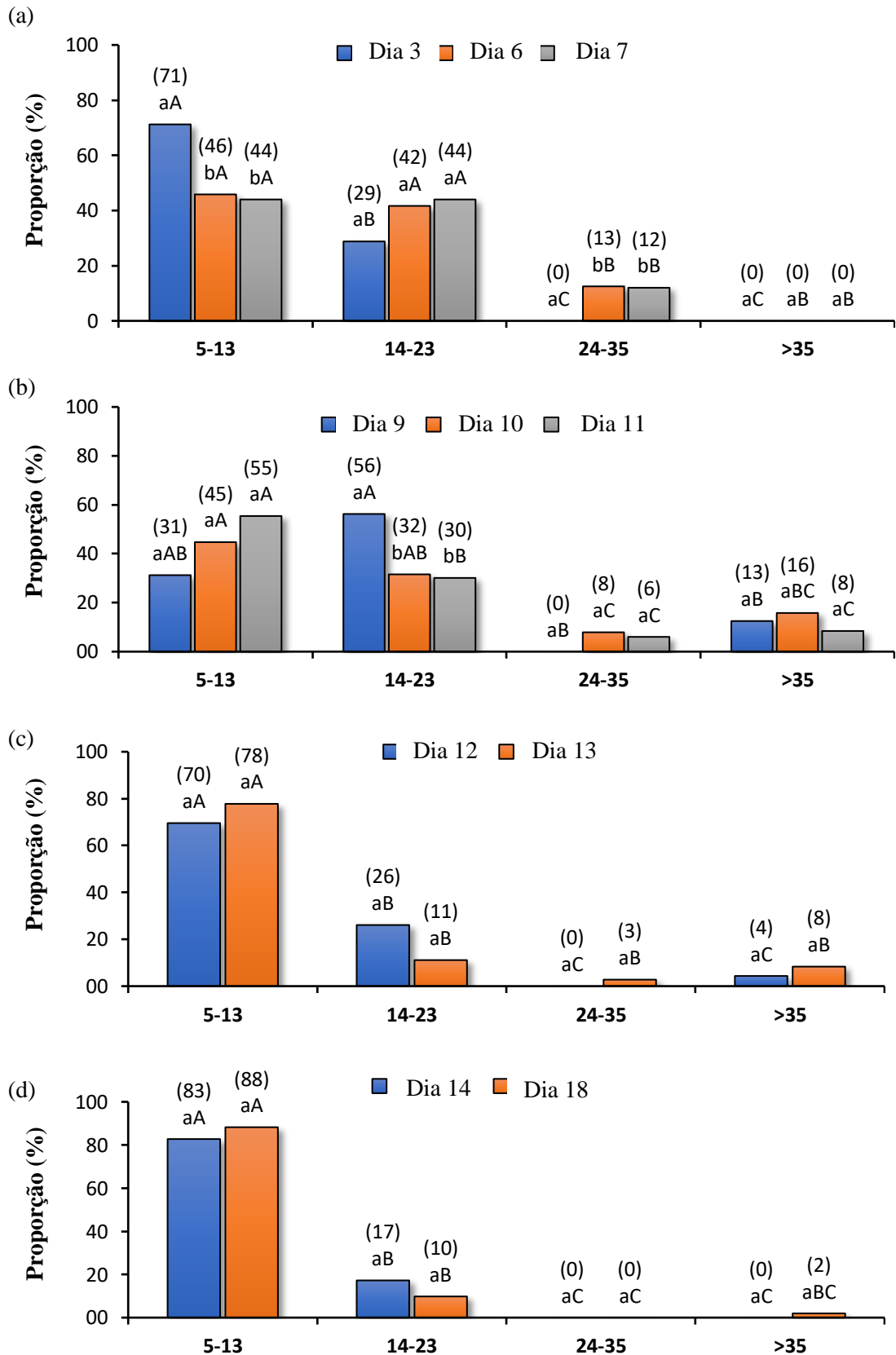
Um total de oitenta folículos ovarianos foram submetidos à ablação folicular, em uma média de  $8,8 \pm 3,4$  folículos por égua, variando de 2 a 18 folículos por animal. Na avaliação anterior à ablação completa dos folículos, constatou-se um diâmetro folicular médio de  $18,4 \pm 4,1$  mm, com uma variação entre 10 a 25 mm. Cinco (60%) éguas apresentaram folículos com diâmetro próximo ou acima do característico da divergência folicular física ( $\pm 23$  mm), em uma média de  $22,2 \pm 1,7$  mm, variando entre 20 e 25 mm, sendo aspiradas uma no D10, duas no D11 e duas no D12. As quatro fêmeas restantes apresentaram população folicular com diâmetro abaixo do característico ao momento da divergência física ( $<23$  mm), com média de  $13,5 \pm 2,0$  mm, variando entre 10 e 16 mm, com as ablações sendo realizadas nos dias 9 (n=1), 10 (n=1), 11(n=1) e 12 (n=1).

A dinâmica folicular ovariana das fêmeas, acompanhada por ultrassonografia transretal nos dias 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 18 pós-ablação, revelou um padrão coletivo relativamente repetível da onda de desenvolvimento folicular entre as fêmeas, com períodos previsíveis de emergência/recrutamento observado no d3, seleção para divergência folicular nos d6-d7, dominância folicular nos d9, d10 e d11, e ovulação entre d11-d13, com o restabelecimento de uma nova onda folicular a partir do d12, conforme pode ser visualizado nas médias e medianas de folículos por fêmea e do diâmetro dos folículos por fêmea apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Média ( $\pm$  SEM), mediana e variação no número de folículos e diâmetro folicular por égua em cada dia de avaliação ultrassonográfica pós-ablação folicular (n=9)

Dia	Folículos/fêmea (n)			Diâmetro dos folículos/fêmea (mm)		
	Média $\pm$ dp	Mediana	Varição	Média $\pm$ dp	Mediana	Varição
3	7,6 $\pm$ 4,1	7,0	3 a 13	11,4 $\pm$ 3,9	11,0	5 a 20
6	8,0 $\pm$ 3,6	8,0	5 a 12	15,5 $\pm$ 6,7	15,0	5 a 29
7	12,5 $\pm$ 3,5	12,5	10 a 15	16,3 $\pm$ 6,7	15,0	7 a 32
9	8,0 $\pm$ 1,4	8,0	7 a 9	17,5 $\pm$ 10,0	17,0	5 a 40
10	7,6 $\pm$ 2,7	8,0	4 a 11	19,2 $\pm$ 12,1	15,5	5 a 46
11	9,2 $\pm$ 3,1	10,0	4 a 13	15,6 $\pm$ 10,2	12,5	5 a 52
12	11,5 $\pm$ 7,8	11,5	6 a 17	13,4 $\pm$ 7,8	12,0	6 a 43
13	7,2 $\pm$ 1,5	7,0	5 a 9	13,7 $\pm$ 9,6	11,0	3 a 44
14	14,5 $\pm$ 2,1	14,5	13 a 16	10,6 $\pm$ 4,2	10,0	5 a 22
18	13,3 $\pm$ 3,8	14,0	8 a 17	10,5 $\pm$ 5,8	9,0	6 a 45

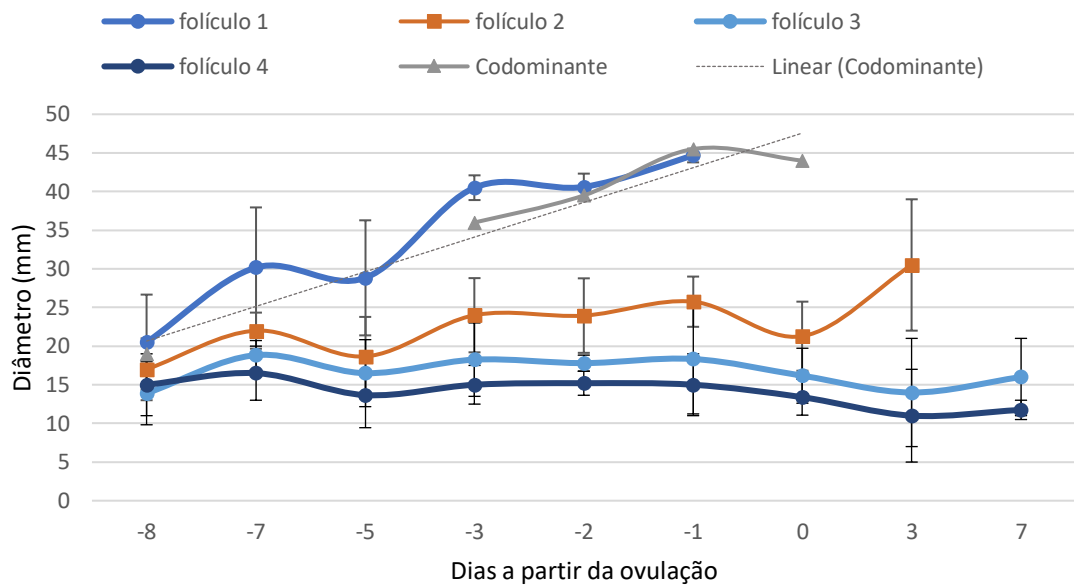
A figura 5 ilustra a distribuição percentual do diâmetro dos folículos ovarianos observados nas éguas (mm), após agrupamento em intervalos por tamanho folicular na modalidade funcional (conforme características endócrinas e fisiológicas), nos dias dos exames ultrassonográficos pós-ablação. Os dados de distribuição percentual destes dias de resultados comuns combinados, sob a modalidade métrica, são ilustrados na Figura Suplementar 1, Anexo A. Os folículos observados no d6 e d7, d10 e d11, d12 e d13, e d14 e d18, apresentaram comportamentos semelhantes, conforme evidenciado em ambas as figuras.



**Figura 5.** Distribuição (%) do diâmetro dos folículos ovarianos em éguas (mm), agrupados em intervalos por tamanho, nos dias (a) 3, 6 e 7; (b) 9, 10 e 11; (c) 12 e 13; e (d) 14 e 18 pós-ablação. Letras desiguais sobre as colunas, dentro de cada intervalo (a,b) ou cada dia (A,B,C), diferem ( $P < 0,05$ ).

Apesar de trabalhos anteriores sobre sincronização da onda folicular por meio da ablação folicular terem utilizado  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dias após o procedimento (BERGFELT e ADAMS, 2000; BERGFELT *et al.*, 2007), o presente estudo demonstrou uma previsibilidade temporal e espacial de desenvolvimento folicular pós-ablação que se assemelhou aos resultados de dinâmica folicular observados anteriormente por Gстал *et al.* (2004) após realizarem ablação dos folículos ovarianos dez dias pós-ovulação com posterior acompanhamento do crescimento folicular comum a partir da emergência aos 6 mm de diâmetro no dia 3 até o momento de divergência, quando os folículos atingiram  $\geq 20$  mm no dia 6 pós-ablação. O momento da dominância (d9 ao d11) e ovulação (d10 ao d13) encontrados neste trabalho também foram próximos ao descrito por Gстал *et al.* (1997), em que as ovulações ocorreram sete dias (d15) após o momento da divergência (d8 pós-ablação).

As médias dos diâmetros dos quatro folículos ovarianos maiores caracterizados após a ablação folicular estão ilustrada em escala de dias normalizada na Figura 6, partindo do dia -8 pré-ovulação até o dia 7 pós-ovulação de nove IIOs. As médias dos diâmetros dos folículos ovarianos codominantes observados em dois IIOs foram considerados a parte dos demais, sendo estes também observados na Figura 6.



**Figura 6.** Média ( $\pm$  SEM) do diâmetro dos quatro maiores folículos ovarianos e folículos ovarianos codominantes (mm) avaliados durante nove IOs normalizados em escala de dias a partir do dia da ovulação (ovulação = dia 0).

A partir da análise conjunta da Tabela 1 e das Figuras 5 e Suplementar 1 (Anexo A), observa-se que, no d6, parte da população folicular (50%) apresentava diâmetros entre 5 e 14 mm, com a outra metade (50%) variando entre 15 a 30 mm, com tamanhos predominantemente característicos de divergência folicular. Já no d7, os folículos mensurados apresentaram um comportamento semelhante aos folículos avaliados no dia anterior, havendo um ligeiro aumento na média do diâmetro folicular (Tabela 1), uma vez que surgiram folículos >30 mm, e diminuiu a proporção de folículos <24 mm. Não obstante, a distribuição dos folículos por tamanho foi similar no d6 e no d7, demonstrando que o final da seleção e o início da divergência folicular ocorreram neste período, havendo a regressão de folículos subordinados e o estabelecimento da dominância ou codominância folicular nos períodos subsequentes (>d9). Por tais características, definiu-se o d6 como sendo o dia mais propício para a realização dos procedimentos de OPU no Experimento 2.

Semelhante ao d9, todas as éguas apresentaram folículos dominantes >35 mm de diâmetro nos d10 e d11 (Figura 5b). Interessantemente, a maior população folicular nos d10 e d11 situou-se entre 5 e 13 mm e 14 e 23 mm, possivelmente caracterizando uma nova onda, em especial nas fêmeas já ovuladas (Figura 5b). Até o último dia de acompanhamento ovariano (d18), oito das nove éguas que passaram pelo procedimento de ablação folicular haviam ovulado. Em duas das nove fêmeas (22,2%) houve ocorrência de codominância folicular culminando em ovulação dupla, havendo um dia de intervalo entre as ovulações. Considerando a data da primeira ovulação nestas éguas, a média de dias em que as ovulações ocorreram foi de  $11,1 \pm 0,9$ , com variação de ocorrência das ovulações entre 10 e 13 dias pós-ablação, concentrando 37,5% no d10 (3/8), 25% no d11 (2/8), 25% no d12 (2/8) e 12,5% no d13 (n=1/8), ocorrendo uma ovulação após o período de exames ultrassonográficos pós-ablação. Ademais, houve codominância folicular em duas éguas, resultando em ovulação dupla em ambas (22,2%), em que em uma égua as ovulações ocorreram entre d10 e d11, e na outra ocorreram entre d12 e d13 pós-ablação.



## 5.2 Experimento 2

Durante o Experimento 2, foi realizada a aspiração completa do fluido folicular de 192 folículos ovarianos de 15 fêmeas, com média de  $12,0 \pm 2,6$  folículos por procedimento, variando de 6 a 20 folículos e com média geral de diâmetro folicular do maior folículo de  $19,7 \pm 4,8$  mm, variando entre 10 a 30 mm. Nove éguas (60,0%) apresentavam folículos com diâmetro próximo ou acima do característico da divergência física ( $>23$  mm), tendo este grupo folicular uma média de  $24,0 \pm 3,3$  mm, variando entre 20 e 30 mm. Destas nove fêmeas, duas foram aspiradas no D10 (2 de 3, 66,6%), duas no D11 (2 de 5, 40%) e cinco no D12 (5 de 6, 83,3%). Nos sete ciclos restantes, as fêmeas apresentaram população folicular com diâmetro abaixo do característico ao momento da divergência física ( $>23$  mm), com as ablações sendo realizadas nos dias 9 (2 de 2, 100%), 10 (1 de 3, 33,3%), 11 (3 de 5, 60,0%) e 12 (1 de 6, 16,7%).

### 5.2.1 *Indução da codominância folicular ovariana em éguas cíclicas após a ablação folicular e desenvolvimento embrionário após a OPU*

Durante o ciclo estral pré-ablação, e já com base nos padrões ovarianos observados no Experimento 1, foi possível repetir a caracterização global da dinâmica folicular e agregar informações sobre o comportamento das ondas foliculares dos ovários antes e após a ablação folicular durante o Experimento 2. O comportamento da dinâmica folicular observada nos Experimentos 1 e 2 confirmam que a aspiração completa do conteúdo de folículos ovarianos, ou ablação folicular, é uma técnica alternativa não hormonal considerada eficaz na sincronização das ondas foliculares de diferentes espécies durante o ciclo estral, assim como observados em trabalhos realizados anteriormente, mesmo utilizando  $\text{PGF}_{2\alpha}$  logo após a aspiração de folículos  $\geq 10$  mm e indução da ovulação com hCG no sexto dia pós-ablação (BERGFELT e ADAMS, 2000; BERGFELT *et al.*, 1994; 2007).

Pela maior proporção de folículos de diâmetros pequenos a intermediários e pela baixa proporção de folículos acima do diâmetro de divergência folicular no d6 no Experimento 1, elegeu-se este dia como o dia do ciclo a ser realizada a OPU de sub-grupos de fêmeas nos grupos Controle e GnRH 3-6 no Experimento 2 após a ablação folicular. Desta forma, pôde-se também avaliar a influência das ablações foliculares no comportamento das ondas foliculares e na qualidade oocitária sob a aplicação ou não de hormônio exógeno (análogo de GnRH) em CCOs obtidos por meio da OPU no Tratamento GnRH 3-6 em comparação ao Grupo Controle.

### *5.2.2 Resposta ovariana pós-ablação: características gerais do d1 ao d6*

Após a ablação, a dinâmica folicular ovariana das fêmeas foi acompanhada diariamente por exames ultrassonográficos do trato reprodutivo de duas formas distintas: em um grupo de oito éguas, a dinâmica folicular foi acompanhada diariamente até o dia 6 pós-ablação, dia da realização do procedimento de OPU (d1 ao d6); no segundo grupo de sete fêmeas, a dinâmica folicular foi acompanhada diariamente do d1 até a próxima ovulação pós-ablação, conforme realizado no Experimento 1, ocorrendo o último exame no d17.

Os exames ultrassonográficos diários revelaram um padrão temporal de desenvolvimento de onda folicular semelhante ao observado durante o Experimento 1, em especial no grupo Controle, sendo possível a distinção dos períodos de emergência (d1-d3), seleção (d4-d5), divergência (d6-d7) e dominância folicular (d7-d11), e ovulação (entre os dias 13 a 17 pós-ablação), quando incluídas as fêmeas que não foram submetidas ao procedimento de OPU. As médias e as medianas da frequência de número de folículos por fêmea e do diâmetro folicular por fêmea, e intervalos de variação, por dia de exame ultrassonográfico, do d1 ao d6 pós-ablação, estão incluídas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Média ( $\pm$  SEM), mediana e número de folículos e diâmetro folicular por égua do Dia 1 ao Dia 12 pós-ablação folicular nos grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6

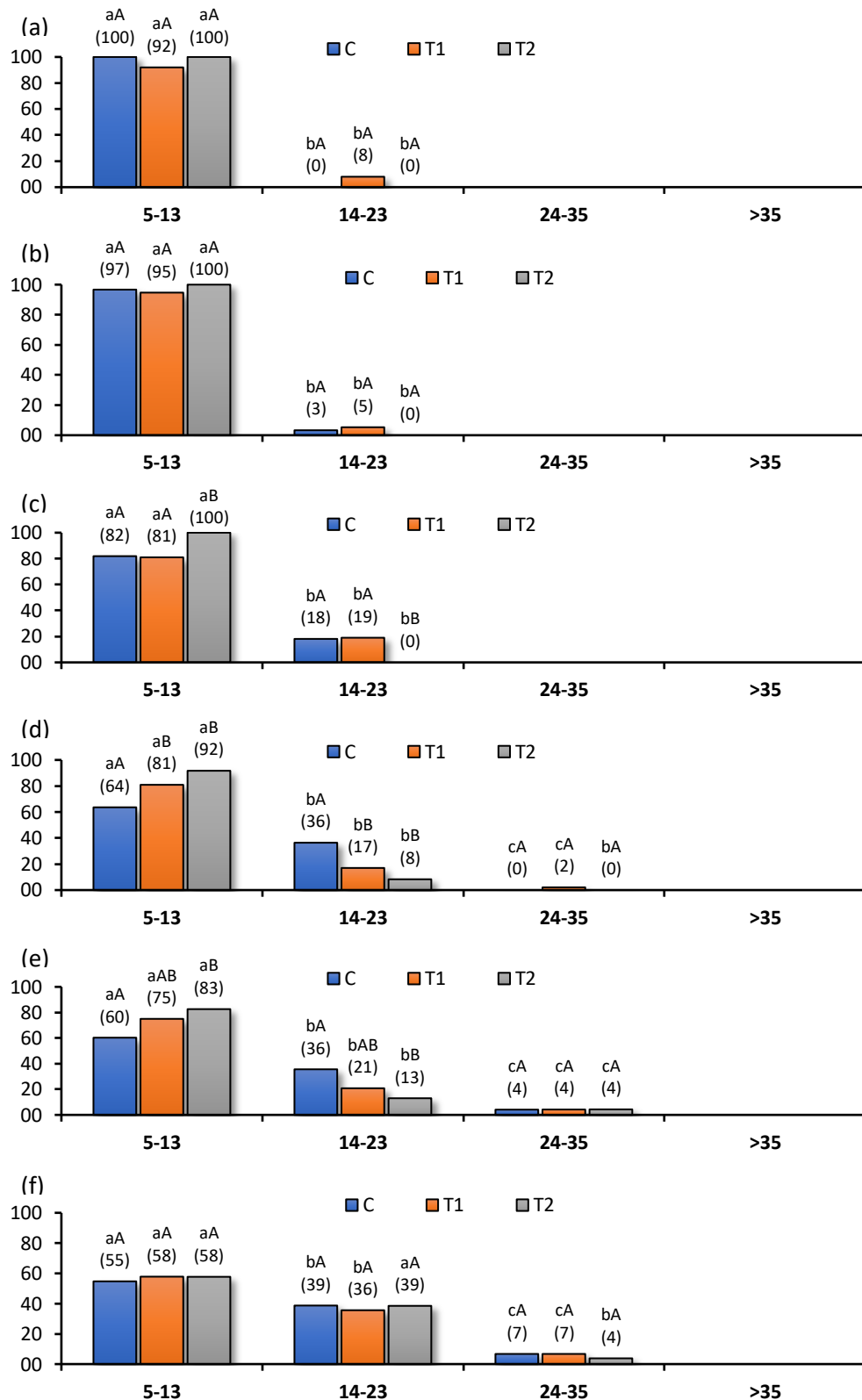
Dia	Grupo (n)	Folículos/fêmea (n)			Diâmetro dos folículos/fêmea (mm)		
		Média $\pm$ dp	Mediana	Varição	Média $\pm$ dp	Mediana	Varição
1	Controle (6)	5,9 $\pm$ 5,0	2,5	1 a 15	6,7 $\pm$ 1,5	6,0	5 a 13
	GnRH 3-6 (5)	3,1 $\pm$ 0,6	3,0	2 a 5	8,2 $\pm$ 2,2	8,0	5 a 15
	GnRH 2-6 (4)	2,2 $\pm$ 1,4	1,0	1 a 4	7,4 $\pm$ 2,0	7,0	5 a 13,5
2	Controle (6)	6,1 $\pm$ 4,3	3,5	1 a 20	7,4 $\pm$ 2,2	6,5	5 a 15
	GnRH 3-6 (5)	4,2 $\pm$ 2,4	5,0	1 a 10	8,0 $\pm$ 2,4	7,0	5 a 17
	GnRH 2-6 (4)	3,0 $\pm$ 1,0	3,0	1 a 6	7,0 $\pm$ 1,6	6,8	5 a 12
3	Controle (6)	5,5 $\pm$ 3,4	5,0	1 a 15	9,3 $\pm$ 3,3	8,0	7 a 17,5
	GnRH 3-6 (5)	2,8 $\pm$ 1,8	2,0	1 a 11	9,3 $\pm$ 3,5	7,5	5 a 20,5
	GnRH 2-6 (4)	2,5 $\pm$ 1,0	2,5	1 a 5	8,3 $\pm$ 2,3	8,3	5 a 13
4	Controle (6)	4,1 $\pm$ 1,6	4,0	2 a 9	11,7 $\pm$ 4,0	11,5	5 a 22,5
	GnRH 3-6 (5)	2,9 $\pm$ 1,5	2,5	1 a 7	10,4 $\pm$ 3,8	9,0	5 a 26,5
	GnRH 2-6 (4)	2,4 $\pm$ 1,2	2,0	1 a 5	9,7 $\pm$ 3,4	9,0	5 a 21
5	Controle (6)	3,8 $\pm$ 1,8	4,0	1 a 9	12,9 $\pm$ 4,4	12,5	5 a 25,5
	GnRH 3-6 (5)	2,8 $\pm$ 1,2	3,0	1 a 7	11,5 $\pm$ 4,4	10,0	5 a 30,5
	GnRH 2-6 (4)	2,3 $\pm$ 1,2	2,0	1 a 7	12,1 $\pm$ 3,5	12,5	5 a 25
6	Controle (6)	3,4 $\pm$ 1,8	3,0	1 a 9	13,8 $\pm$ 4,8	12,5	5 a 28
	GnRH 3-6 (5)	2,1 $\pm$ 0,9	2,0	1 a 4	13,9 $\pm$ 4,8	13,0	3 a 33,5
	GnRH 2-6 (4)	1,9 $\pm$ 0,8	1,5	1 a 5	12,7 $\pm$ 4,4	12,3	5 a 25
7	Controle (2)	1,3 $\pm$ 0,4	1,0	1 a 3	15,9 $\pm$ 6,7	12,0	6 a 27,5
	GnRH 3-6 (1)	1,1 $\pm$ 0,2	1,0	1 a 2	13,6 $\pm$ 4,2	15,0	7,5 a 21
	GnRH 2-6 (4)	1,7 $\pm$ 0,6	1,5	1 a 4	14,5 $\pm$ 4,7	13,5	5 a 29,5
8	Controle (2)	1,2 $\pm$ 0,3	1,0	1 a 2	17,0 $\pm$ 6,5	15,0	5,5 a 29,5
	GnRH 3-6 (1)	1,1 $\pm$ 0,2	1,0	1 a 2	14,0 $\pm$ 5,0	11,0	7,5 a 21
	GnRH 2-6 (4)	1,8 $\pm$ 0,9	1,0	1 a 5	14,6 $\pm$ 6,3	13,0	5 a 35,5
9	Controle (2)	1,2 $\pm$ 0,3	1,0	1 a 2	18,1 $\pm$ 7,3	15,0	5,5 a 35,5
	GnRH 3-6 (1)	1,2 $\pm$ 0,3	1,0	1 a 2	15,7 $\pm$ 7,3	13,0	5 a 28,5
	GnRH 2-6 (4)	1,7 $\pm$ 0,8	1,0	1 a 5	15,4 $\pm$ 7,2	13,5	5 a 36
10	Controle (2)	1,3 $\pm$ 0,5	1,0	1 a 3	17,9 $\pm$ 8,5	15,3	5 a 37,5
	GnRH 3-6 (1)	1,1 $\pm$ 0,2	1,0	1 a 2	15,8 $\pm$ 5,7	15,5	5,5 a 31
	GnRH 2-6 (4)	1,8 $\pm$ 1,1	1,0	1 a 8	15,2 $\pm$ 7,5	11,5	5 a 38,5
11	Controle (2)	1,4 $\pm$ 0,5	1,0	1 a 3	19,6 $\pm$ 7,9	15,8	6 a 39,5
	GnRH 3-6 (1)	1,2 $\pm$ 0,3	1,0	1 a 2	5,2 $\pm$ 7,2	13,0	5 a 35
	GnRH 2-6 (4)	1,9 $\pm$ 0,9	1,5	1 a 6	14,7 $\pm$ 7,8	10,5	5 a 43
12	Controle (2)	1,2 $\pm$ 0,3	1,0	1 a 2	20,1 $\pm$ 9,5	16,0	5 a 53
	GnRH 3-6 (1)	1,0 $\pm$ 0,1	1,0	1 a 2	15,5 $\pm$ 7,4	13,0	5 a 35,5
	GnRH 2-6 (4)	1,8 $\pm$ 0,8	1,0	1 a 5	15,3 $\pm$ 7,9	11,0	5 a 42,5
13*	Controle	-	-	-	-	-	-
	GnRH 3-6 (1)	1,0 $\pm$ 0,0	1,0	1 a 1	16,7 $\pm$ 9,2	12,8	5,5 a 51
	GnRH 2-6 (3)	1,7 $\pm$ 0,7	1,0	1 a 4	16,7 $\pm$ 10,0	9,8	6 a 39
14*	Controle	-	-	-	-	-	-
	GnRH 3-6 (1)	1,5 $\pm$ 0,7	1,0	1 a 3	17,5 $\pm$ 9,2	13,3	6 a 55,5
	GnRH 2-6 (1)	1,0 $\pm$ 0,0	1,0	1 a 1	19,6 $\pm$ 12,4	13,5	6,5 a 50
15*	Controle	-	-	-	-	-	-
	GnRH 3-6 (1)	1,2 $\pm$ 0,3	1,0	1 a 2	16,0 $\pm$ 9,4	10,8	5 a 58,5
	GnRH 2-6 (1)	1,0 $\pm$ 0,0	1,0	1 a 1	20,5 $\pm$ 15,4	10,0	5 a 52
16*	Controle	-	-	-	-	-	-
	GnRH 3-6	-	-	-	-	-	-
	GnRH 2-6 (1)	1,3 $\pm$ 0,4	1,0	1 a 2	17,9 $\pm$ 13,7	7,5	5 a 44,5
17*	Controle	-	-	-	-	-	-
	GnRH 3-6	-	-	-	-	-	-
	GnRH 2-6 (1)	1,4 $\pm$ 0,4	1,0	1 a 2	15,0 $\pm$ 12,7	7,0	5 a 51,5

\*Dias 13 a 17: período ovulatório nos distintos grupos

### *5.2.3 Resposta ovariana pós-ablação entre os grupos experimentais*

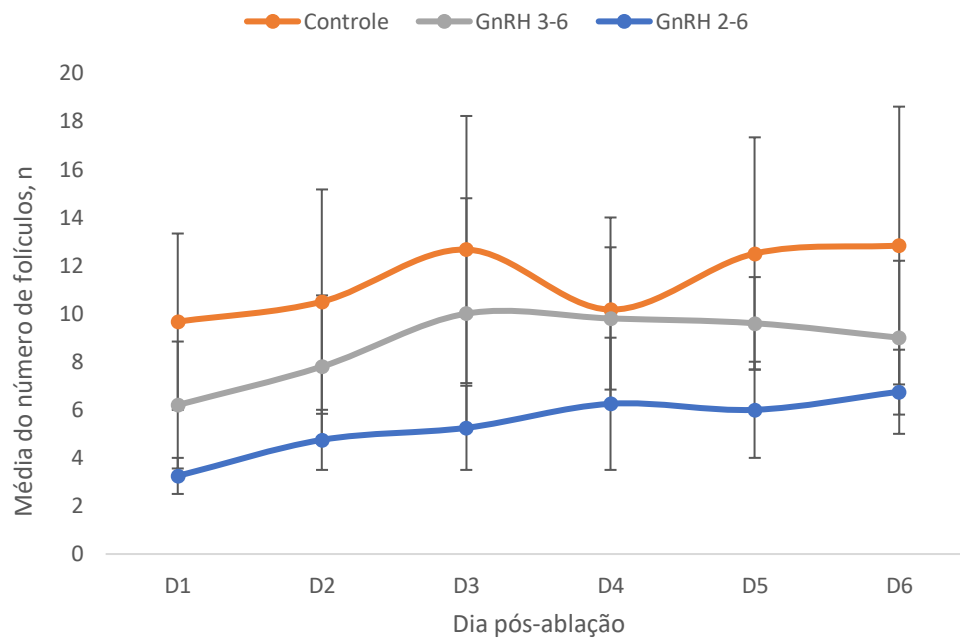
As médias e as medianas da frequência de número de folículos por fêmea e do diâmetro folicular por fêmea, por dia de exame ultrassonográfico pós-ablação e por grupo experimental são apresentados na Tabela 2.

Do d1 para os d2 e d3, houve um aumento gradual na proporção de folículos no intervalo entre 14 e 23 mm nos grupos Controle (d2, 3,3%; Dia 3, 18,1%) e GnRH 3-6 (d2, 5,3%; d3, 19,0%). No d2, todos os folículos possuíam menos de 15 mm no grupo Controle, e de 20 mm no grupo GnRH 3-6, enquanto o grupo GnRH 2-6 apresentava poucos folículos entre 10 e 14 mm, com os demais se situando no intervalo entre 5 e 9 mm (Figura 7).



**Figura 7.** Distribuição (%) do diâmetro dos folículos ovarianos em éguas (mm) entre os grupos experimentais, em intervalos por tamanho, nos dias (a) d1, (b) d2, (c) d3, (d) d4, (e) d5 e (f) d6 pós-ovulação. Controle, sem GnRH; GnRH 3-6: GnRH de 12-12 h, do d3 ao d6; GnRH 2-6: GnRH de 12-12 h, do d2 ao d6. Letras desiguais sobre as colunas, em cada grupo entre intervalos por tamanho (a,b) ou cada intervalo por tamanho entre grupos (A,B,C), diferem ( $P < 0,05$ ).

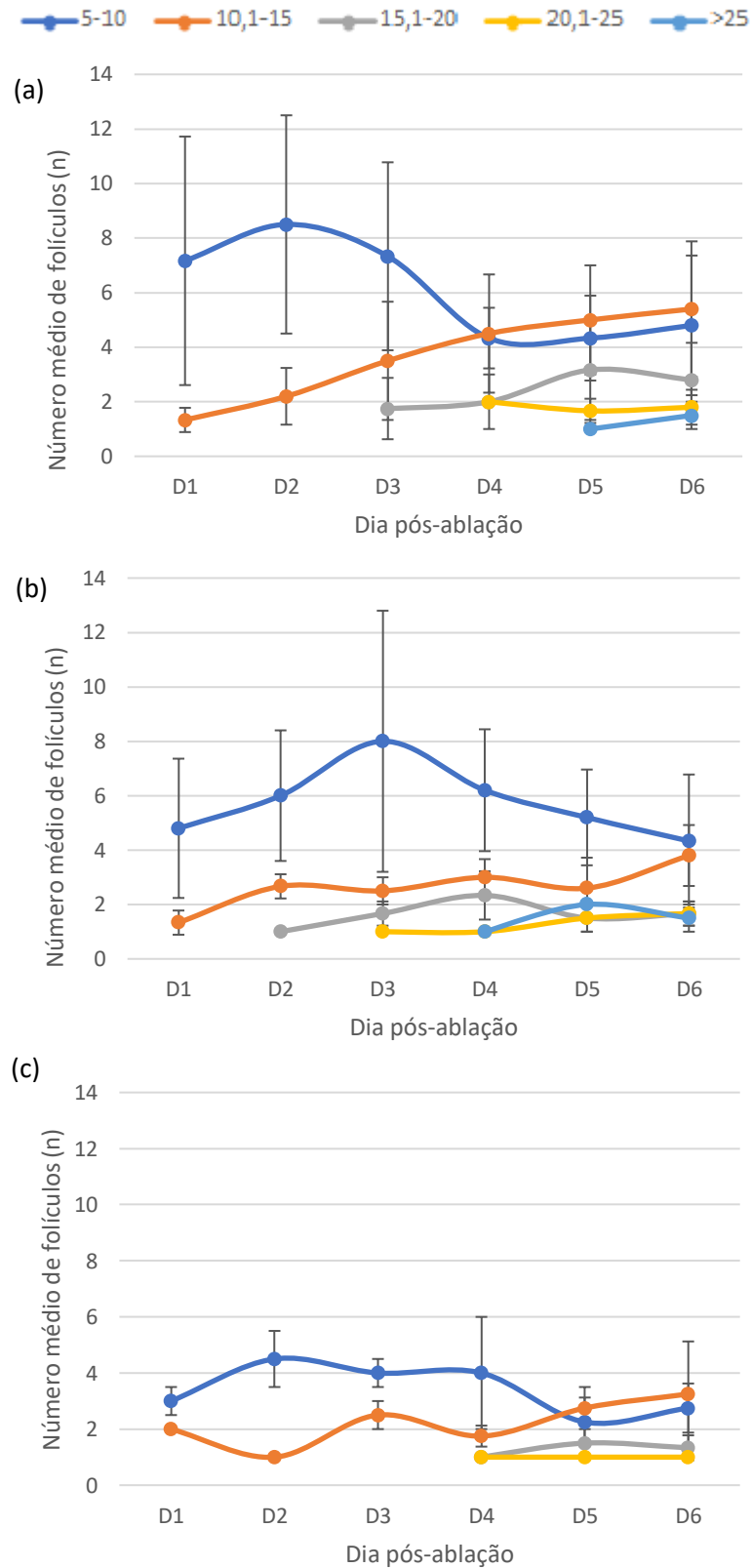
Nos d2, d3 e d4 a proporção de folículos entre 5 e 10 mm no grupo GnRH 2-6 se manteve constante, enquanto no grupo GnRH 3-6, houve aumento gradual na proporção de folículos deste grupo, alcançando elevação máxima no d3, seguido de diminuição até o d6. Por outro lado, no grupo controle houve maior número de folículos dessa faixa de diâmetro já no d2 pós-ablação com início da diminuição a partir deste dia (Figuras 8 e 9), denotando um aparente atraso no início do processo de emergência/recrutamento folicular rumo à seleção folicular. Portanto, o tratamento com doses de 125 µg de acetato de deslorelina a intervalos de 12 h causou uma resposta negativa considerável no desenvolvimento folicular, em especial no grupo GnRH 2-6 (d2 ao d6) em relação ao grupo Controle (Figura 8). Já o tratamento iniciado no dia 3 (GnRH 3-6) demonstrou melhor desenvolvimento folicular, apesar de haver atraso observado nos dias 4 e 5 pós-ablação, uma vez que o diâmetro e a área foliculares neste grupo foram semelhantes aos folículos ovarianos do grupo controle no dia 6 após a ablação. Isto evidencia a diferença que apenas um dia a mais, e mais precoce, de tratamento foi capaz de causar no desenvolvimento folicular entre os tratamentos em relação a animais não tratados.



**Figura 8.** Média ( $\pm$  SEM) do número geral de folículos ovarianos em éguas nos grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6 do d1 pós-ablação até a OPU no d6. Controle, sem GnRH; GnRH 3-6: tratamento 1, GnRH de 12-12 h, do d3 ao d6; GnRH 2-6: tratamento 2, GnRH de 12-12 h, do d2 ao d6.

Folículos maiores de 25 mm surgiram no d4 no grupo GnRH 3-6, e no d5 no grupo Controle (Figura 9). No d6, as proporções de folículos por intervalo de diâmetro foram semelhantes entre os grupos, sendo aparentemente o início da divergência e da dominância folicular.

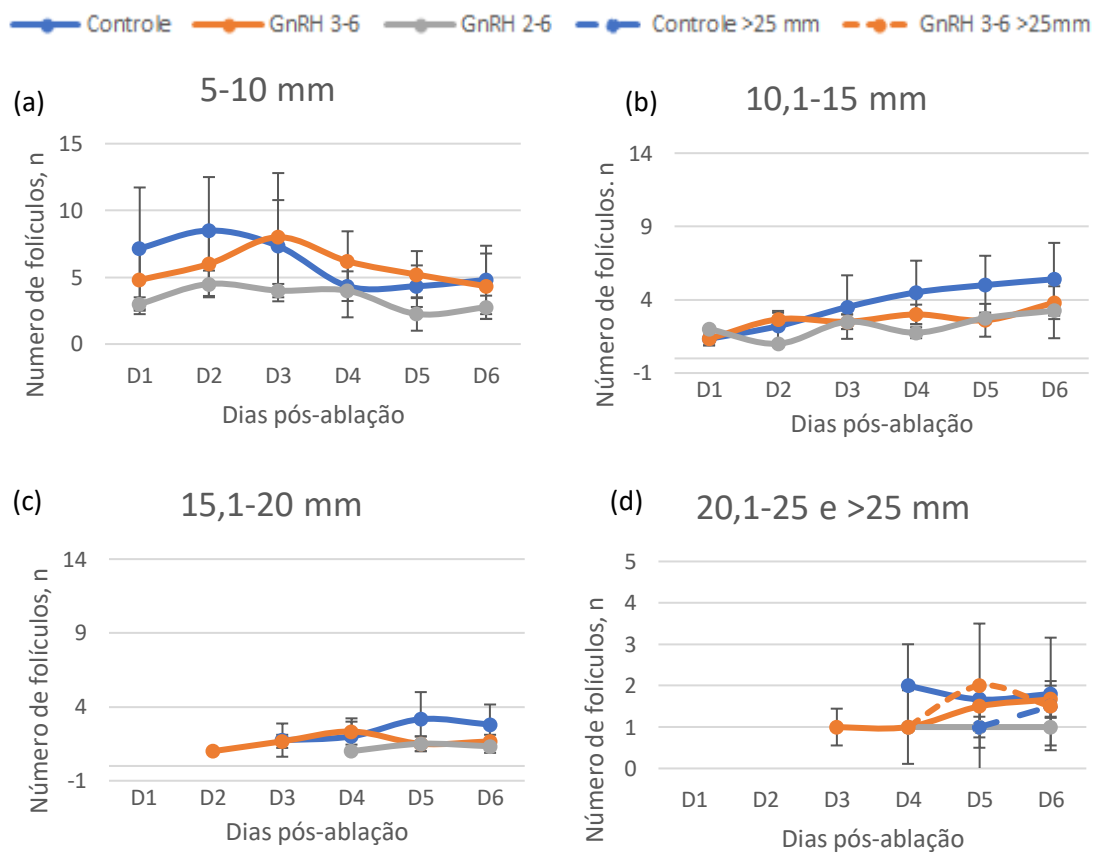
No d5, o grupo GnRH 2-6 continuou possuindo uma menor proporção de folículos entre 10,1 a 15 mm do que o grupo Controle (Figura 9b), sendo o grupo GnRH 3-6 semelhante e intermediário aos demais em todas as categorias (Figura 9). Todos os grupos passaram à divergência folicular neste dia, com folículos maiores de 25 mm, estando com folículos dominantes com menos de 30 mm nos grupos Controle e GnRH 2-6, e menos de 35 mm no grupo GnRH 3-6.



**Figura 9.** Distribuição do número médio de folículos ovarianos em éguas nos grupos (a) Controle, (b) GnRH 3-6 e (c) GnRH 2-6 para os intervalos de 5 a 10 mm, 10,1 a 15 mm, 15,1 a 20 mm, 20,1 a 25 e >25 mm. Em cada grupo, do d1 pós-ablação até a OPU no d6. Controle, sem GnRH; GnRH 3-6: GnRH de 12-12 h, do d3 ao d6; GnRH 2-6: GnRH de 12-12 h, do d2 ao d6.



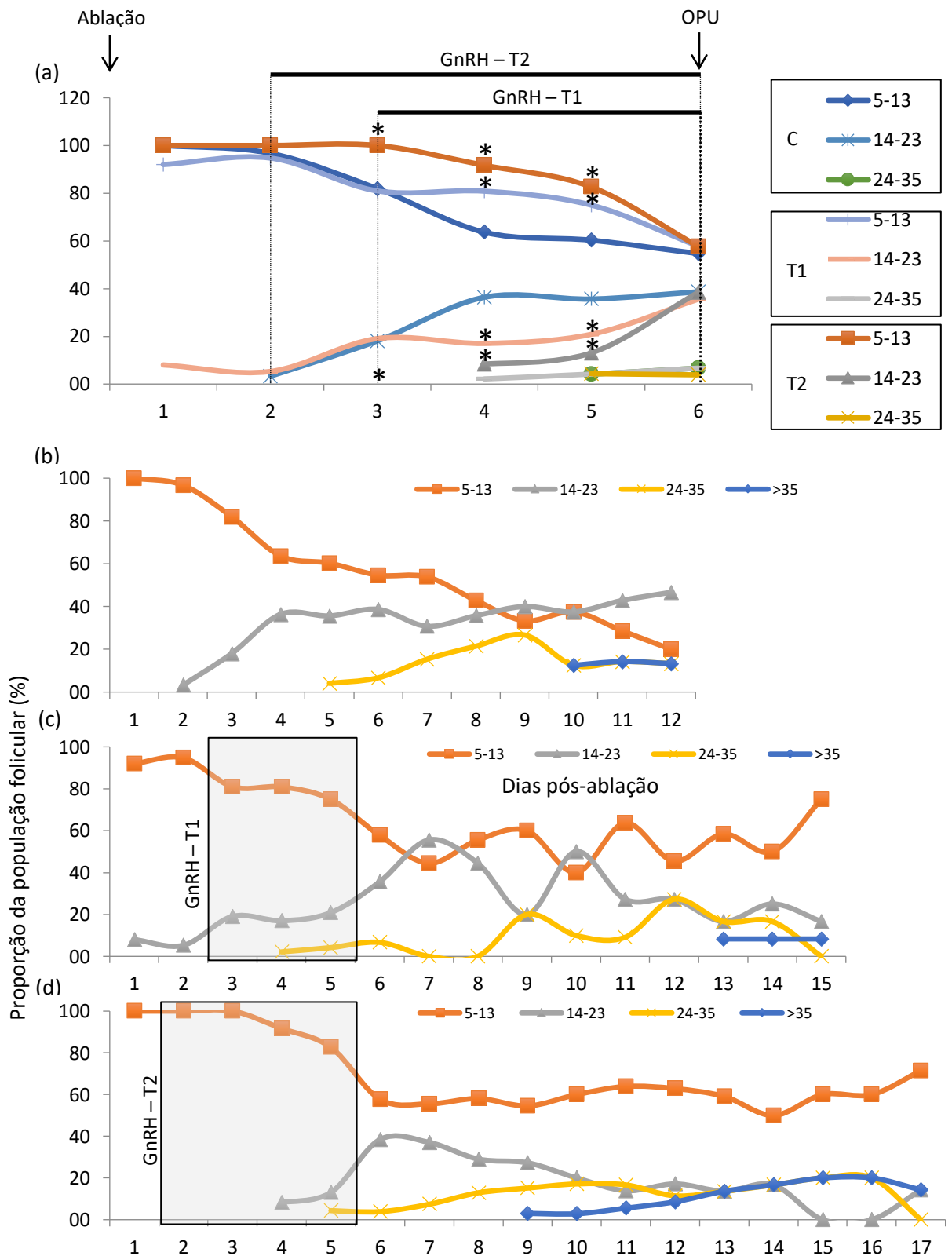
No d6, dia da OPU, os grupos GnRH 3-6 e controle apresentavam populações de folículos de 5 a 10 mm, 10,1 a 15 mm, 20,1 a 25 mm e >25 mm semelhantes entre si. Neste mesmo dia, o número de folículos ovarianos entre 10,1 a 15 mm e 15,1 a 20 mm tiveram média similar entre os grupos tratados com GnRH (Figura 10). Neste dia, realizaram-se sessões de OPU em três fêmeas do grupo Controle e três do grupo GnRH 3-6.



**Figura 10.** Distribuição do número médio de folículos ovarianos em éguas nos grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6 para os diferentes intervalos de (a) 5 a 10 mm, (b) 10,1 a 15 mm, (c) 15,1 a 20 mm, e (d) 20,1 a 25 e >25 mm. Em cada grupo, do d1 pós-ablação até a OPU no d6. Controle, sem GnRH; GnRH 3-6: GnRH de 12-12 h, do d3 ao d6; GnRH 2-6: GnRH de 12-12 h, do d2 ao d6.

Do d7 ao d10, iniciou-se uma redução na proporção de folículos menores e um aumento nos folículos de tamanho intermediário, havendo a consolidação da dominância folicular (Figura 11). Folículos >35 mm somente foram visualizados no d9 no grupo GnRH 2-6 (<40 mm), no d10 no grupo Controle (<40 mm), e no d13 no grupo GnRH 3-6 (40 a 44 mm), conforme ilustrado na Figura 10 (painéis a, b, c). Nos d7 e d8, a proporção de folículos de 5 a 13 mm e de 14 a 23 mm foi semelhante dentro de cada grupo, mas ainda maiores do que folículos de 24 a 35 mm. Nos d9 a d12, também houve uma proporção similar de folículos de 5 a 13 mm, 14 a 23 mm e 24 a 35 mm nos grupos Controle e GnRH 3-6. Porém, o grupo GnRH 2-6 voltou a apresentar uma proporção maior de folículos entre 5 e 13 mm do que entre 14 e 23 mm e 24 e 35 mm, com ambos sendo semelhantes entre si. Nos d11 e d12, a proporção de folículos de 5 a 13 mm foi maior nos grupos GnRH 3-6 e GnRH 2-6 do que no Controle, com a de 14 a 23 mm sendo menor no grupo GnRH 2-6 em relação ao Controle, com o grupo GnRH 3-6 sendo igual a ambos (Figura Suplementar 2, Anexo B).

Em termos de ovulações, nas fêmeas do grupo Controle ocorreu entre os d12 e d13, do grupo GnRH 3-6 entre os d15 e d16, e do grupo GnRH 2-6 entre os d12 e d13, d13 e d14, e d17 e d18. De sete éguas, três ovularam entre d12-d13 (uma do grupo controle e outra do grupo GnRH 2-6), duas entre d13-d14 (ambas do grupo GnRH 2-6), uma entre d15-d16 (do grupo GnRH 3-6), e uma entre d17-d18 (do grupo GnRH 2-6). Evidentemente, os grupos com administração de GnRH apresentaram um aparente atraso nas ovulações, em relação ao grupo Controle e ao padrão observado no Experimento 1.



**Figura 11.** Distribuição da população folicular ovariana em éguas nos grupos Controle (C), GnRH 3-6 e GnRH 2-6 para os intervalos de 5 a 13 mm, 14 a 23 mm, 24 a 35 mm e >35 mm do d1 até o dia da última ovulação: (a) grupo Controle, até o d12; (b) grupo GnRH 3-6, até o d15; e (c) grupo GnRH 2-6, até o d17.

De acordo com as Figuras 11 e Suplementar 2 do Anexo B, a população de folículos pequenos (5 a 13 mm), e que contém folículos com o limite fisiológico de tamanho (13 mm) para o início de redução sérica nos níveis de FSH que precede a seleção folicular, tende a decrescer continuamente no grupo Controle ao longo do tempo, com o aumento da proporção de folículos intermediários em tamanho até a dominância, quando então predomina o folículo dominante, rumo à maturação para folículo pré-ovulatório com a elevação do LH. Interessantemente, a administração de GnRH a intervalos de 12 h a começar no d2 (GnRH 2-6) ou no d3 (GnRH 3-6) pós-ablação aumentou a proporção de folículos pequenos (5 a 13 mm) já no dia seguinte ao início do tratamento, persistindo mais elevado até o d5, um dia antes do final do tratamento e dia da OPU em algumas das fêmeas. Já no d6, não foi observada diferença, havendo a queda da população de folículos de 5 a 13 mm, e uma elevação dos folículos intermediários em todos os grupos, demonstrando não ter havido efeito imediato do tratamento do GnRH nas demais populações de folículos, em especial nos de maior diâmetro. Outrossim, houve um aparente retardo de desenvolvimento destas populações intermediárias após tratamento com GnRH em relação ao grupo Controle, o que pode ser percebido não somente pelo surgimento mais tardio ou atenuado de folículos entre 24 e 35 mm e dos de mais de 35 mm, mas também pelo maior retardo da ocorrência de ovulação pós-ablação em comparação ao grupo Controle. Por ser hormônio análogo liberador de gonadotrofinas, o GnRH estimula a secreção de FSH e LH pela hipófise, favorecendo o crescimento folicular (GINTHER e BERGFELT, 1990). Porém, o tratamento contínuo de altas doses de análogo de GnRH pode induzir o fenômeno conhecido como *downregulation*, o qual seria causado pela hipersecreção inicial de gonadotrofinas após a estimulação exógena, com posterior dessensibilização da hipófise ao GnRH, causando, indiretamente, uma diminuição na atividade ovariana (IRVINE, 1983). Tal fenômeno explicaria a

permanência de maior proporção de folículos pequenos (5 a 13 mm) já no dia seguinte ao início do tratamento com GnRH nos grupos GnRH 3-6 e GnRH 2-6, persistindo até o quinto dia pós-ablação. Desta forma, houve aparente estagnação no processo de crescimento após a emergência folicular, havendo também aparente retardo no desenvolvimento da população intermediária de ambos os grupos tratamento em relação ao grupo controle, o que pôde ser percebido não somente pelo surgimento mais tardio de folículos de diâmetro entre 24 e 35 mm e de folículos maiores do que 35 mm, mas também pelo maior retardo da ocorrência de ovulação pós-ablação em comparação ao grupo controle, no qual as ovulações ocorreram previsivelmente no mesmo período em que ocorreram as ovulações durante o Experimento 1.

#### *5.2.4 Comparação da área folicular, do diâmetro folicular, do crescimento diário e do número de folículos por fêmea e por ovário entre os grupos experimentais*

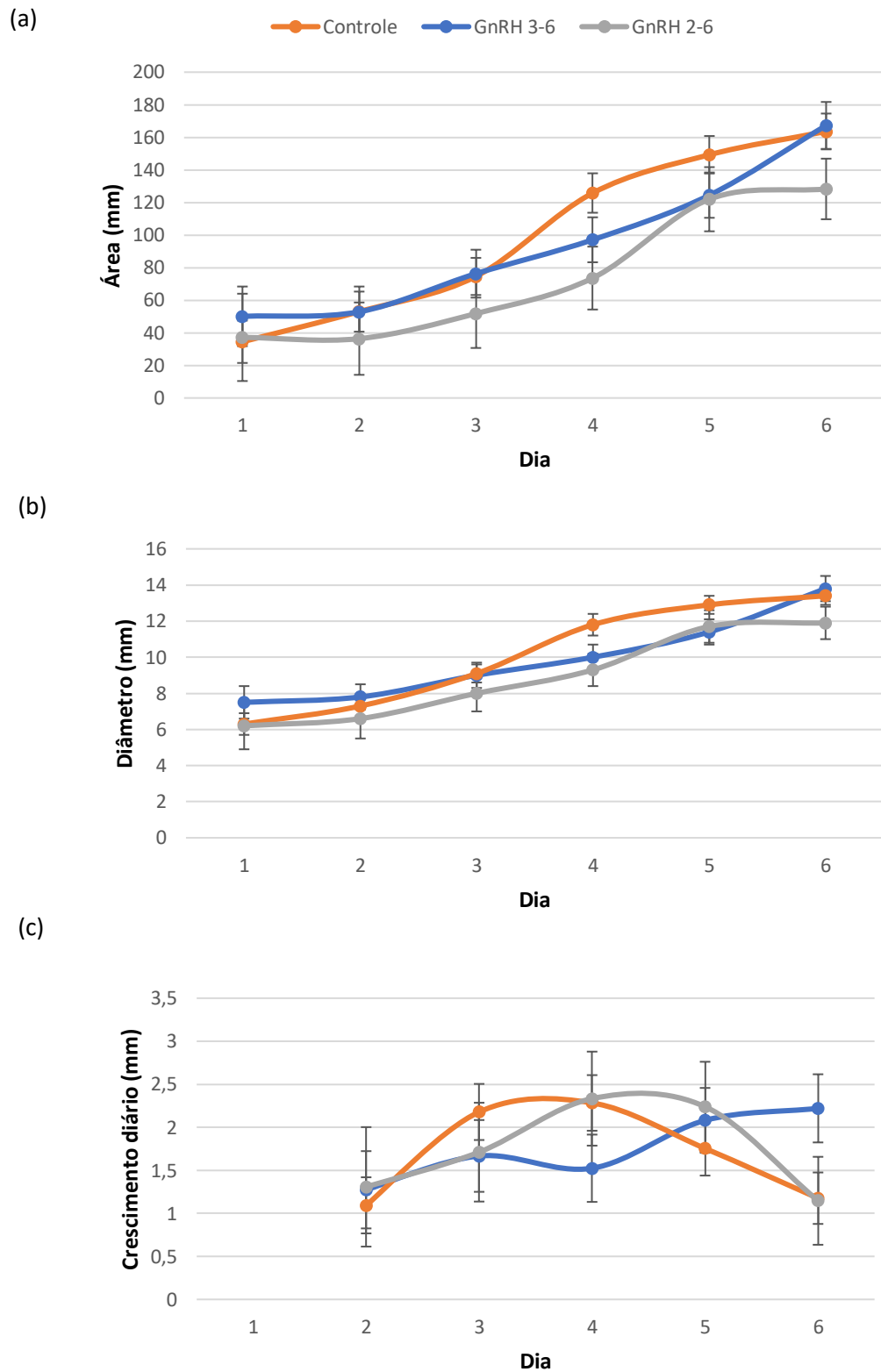
A análise da área folicular, média do diâmetro folicular e crescimento diário foi semelhante entre os grupos Controle e os tratamentos com GnRH, em análise combinada (GnRH 3-6 e GnRH 2-6) ou individual (GnRH 3-6 ou GnRH 2-6), do d1 ao d6, independente do dia da avaliação, sendo de  $124,4 \pm 6,4$  vs.  $111,1 \pm 6,6$  mm<sup>2</sup>;  $11,5 \pm 0,3$  vs.  $11,0 \pm 0,3$  mm; e  $1,7 \pm 0,1$  vs.  $1,8 \pm 0,1$  mm/dia, entre Controle e GnRH 3-6+GnRH 2-6, e de  $124,4 \pm 6,4$  vs.  $118,3 \pm 8,1$  vs.  $97,7 \pm 11,2$  mm<sup>2</sup>;  $11,5 \pm 0,3$  vs.  $11,3 \pm 0,4$  vs.  $10,6 \pm 0,5$  mm; e  $1,7 \pm 0,1$  vs.  $1,8 \pm 0,2$  vs.  $1,8 \pm 0,3$  mm/dia, entre Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6, respectivamente. Já o dia de avaliação dos três parâmetros acima foi um fator de significância ( $P < 0,05$ ), independente dos grupos experimentais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média ( $\pm$  SEM) da área, do diâmetro e do crescimento diário folicular independente dos diferentes grupos do dia 1 ao dia 6 de avaliação ultrassonográfica pós-ablação folicular (LSM  $\pm$  SEM)

Dia	Área (mm <sup>2</sup> )	Diâmetro (mm)	Crescimento diário (mm/dia)
1	39,4 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>	6,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	
2	50,3 $\pm$ 8,8 <sup>a</sup>	7,3 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	1,163 $\pm$ 0,251 <sup>a</sup>
3	71,6 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	1,817 $\pm$ 0,239 <sup>ab</sup>
4	106,1 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>	10,8 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	2,069 $\pm$ 0,231 <sup>b</sup>
5	136,4 $\pm$ 8,1 <sup>bc</sup>	12,2 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	1,950 $\pm$ 0,225 <sup>ab</sup>
6	158,3 $\pm$ 7,9 <sup>c</sup>	13,2 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>	1,482 $\pm$ 0,221 <sup>ab</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem, para  $P < 0,05$ .

Não houve diferença na área, diâmetro ou crescimento folicular diário com ou sem GnRH, havendo diferença somente entre os dias de avaliação. Já a comparação entre grupos experimentais nos seis dias de avaliação pós-ablação revelou diferenças entre os grupos (Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6) e entre os dias (1 a 6) para a área e o diâmetro folicular ( $P < 0,05$ ), mas não para o crescimento diário, sem a existência de interações (Tabela 3 e Figura 12). Houve um aparente retardo de desenvolvimento folicular nos grupos GnRH 3-6 e GnRH 2-6 ao longo dos seis dias de avaliação, tornando-se mais evidente no d4 no GnRH 3-6 e no d3 no GnRH 2-6, coincidentemente um dia após o início dos tratamentos com o GnRH.



**Figura 12.** Médias ( $\pm$  SEM) da (a) área, (b) diâmetro e (c) crescimento diário dos dois maiores folículos ao longo dos seis dias de avaliação ultrassonográfica pós-ablação nos grupos Controle, Tratamento GnRH 3-6 e Tratamento GnRH 2-6.

A análise do número médio de folículos totais por fêmea e por ovário foi semelhante entre os dias de avaliações (dias 1 ao 6), independente dos grupos (Tabela 4). Não obstante, e independente dos dias de avaliação, os tratamentos com GnRH (GnRH 3-6 e GnRH 2-6) apresentaram um número médio de folículos por fêmea menor do que o grupo Controle e entre si ( $P < 0,05$ ), sendo de  $11,6 \pm 0,8$  vs.  $8,5 \pm 0,9$  vs.  $5,4 \pm 1,0$  folículos por égua, respectivamente. Porém, o número de folículos por ovário foi menor somente no GnRH 2-6 do que nos grupos controle e GnRH 3-6, ambos sendo similares entre si, com os valores médios sendo de  $5,0 \pm 0,4$  vs.  $4,6 \pm 0,5$  vs.  $2,8 \pm 0,5$  folículos por ovário nos grupos Controle e tratamentos GnRH 3-6 e GnRH 2-6, respectivamente. Houve uma aparente menor população folicular ao longo dos dias (até d6) nos grupos GnRH 3-6 e GnRH 2-6.

O crescimento diário foi semelhante entre os grupos Controle e os tratamentos com GnRH (GnRH 3-6 ou GnRH 2-6), do d1 ao d6, independente do dia da avaliação, sendo de  $2,867 \pm 0,309$  vs.  $2,250 \pm 0,339$  vs.  $2,075 \pm 0,379$  mm/dia, entre os grupos Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6, respectivamente. Já o dia de avaliação dos três parâmetros acima foi um fator significativo ( $P < 0,05$ ), independente dos grupos experimentais, mas não houve diferenças entre os dias, conforme a Tabela 5 e Figura 12.



**Tabela 4.** Média ( $\pm$  SEM) de folículos por fêmea e folículos por ovário entre os grupos controle e tratamento com GnRH (3-6 e 2-6) do d1 ao d6 de avaliação ultrassonográficas pós-ablação folicular

Tratamento	Dia	Folículos por fêmea	Folículos por ovário
<b>Controle</b>	1	9,8 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	4,7 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
	2	10,5 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
	3	12,7 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	5,2 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
	4	11,3 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
	5	12,5 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
	6	12,8 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
<b>T1 (GnRH 3-6)</b>	1	6,2 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
	2	7,8 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
	3	8,6 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	5,2 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
	4	9,8 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
	5	9,6 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
	6	9,0 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
<b>T2 (GnRH 2-6)</b>	1	3,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
	2	4,8 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
	3	5,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
	4	6,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
	5	6,0 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
	6	6,8 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem, para  $P < 0,05$ .

A comparação entre os grupos experimentais nos seis dias de avaliação pós-avaliação para os dois folículos de maior diâmetro revelou diferenças entre os tratamentos e entre os dias (1 a 6) com relação à área e ao diâmetro folicular ( $P < 0,05$ ), mas não para o crescimento diário, sem a existência de interações, conforme a Tabela 5.

**Tabela 5.** Média ( $\pm$  SEM) da área, do diâmetro e do crescimento diário folicular dos grupos controle, e tratamento com GnRH (3-6 e 2-6) do dia 1 ao dia 6 de avaliações ultrassonográficas

Tratamento	Dia	Área (mm <sup>2</sup> )	Diâmetro (mm)	Crescimento diário (mm/dia)
<b>Controle</b>	1	34,5 $\pm$ 13,0 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	
	2	53,0 $\pm$ 12,3 <sup>ab</sup>	7,3 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>	1,093 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	3	74,6 $\pm$ 11,4 <sup>abc</sup>	9,1 $\pm$ 0,5 <sup>bc</sup>	2,178 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	4	125,8 $\pm$ 12,1 <sup>cde</sup>	11,8 $\pm$ 0,6 <sup>de</sup>	2,283 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	5	149,3 $\pm$ 11,5 <sup>de</sup>	12,9 $\pm$ 0,5 <sup>ef</sup>	1,754 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	6	163,6 $\pm$ 11,0 <sup>e</sup>	13,4 $\pm$ 0,5 <sup>f</sup>	1,176 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
<b>T1 (GnRH 3-6)</b>	1	50,1 $\pm$ 18,3 <sup>abc</sup>	7,5 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>	
	2	52,9 $\pm$ 15,5 <sup>abc</sup>	7,8 $\pm$ 0,7 <sup>abcd</sup>	1,274 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	3	76,3 $\pm$ 14,7 <sup>abc</sup>	9,0 $\pm$ 0,7 <sup>abcde</sup>	1,667 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	4	97,1 $\pm$ 13,8 <sup>bcd</sup>	10,0 $\pm$ 0,7 <sup>bcde</sup>	1,524 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	5	124,5 $\pm$ 13,9 <sup>cde</sup>	11,4 $\pm$ 0,7 <sup>ef</sup>	2,080 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	6	167,3 $\pm$ 14,4 <sup>e</sup>	13,8 $\pm$ 0,7 <sup>f</sup>	2,220 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
<b>T2 (GnRH 2-6)</b>	1	37,2 $\pm$ 26,8 <sup>abc</sup>	6,2 $\pm$ 1,3 <sup>abc</sup>	
	2	36,4 $\pm$ 22,2 <sup>abc</sup>	6,6 $\pm$ 1,1 <sup>abc</sup>	1,308 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	3	51,8 $\pm$ 21,1 <sup>abc</sup>	8,0 $\pm$ 1,0 <sup>abcde</sup>	1,711 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	4	73,6 $\pm$ 19,3 <sup>bc</sup>	9,3 $\pm$ 0,9 <sup>abcde</sup>	2,333 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	5	122,0 $\pm$ 19,7 <sup>bcde</sup>	11,7 $\pm$ 0,9 <sup>cdef</sup>	2,239 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	6	128,3 $\pm$ 18,6 <sup>cde</sup>	11,9 $\pm$ 0,9 <sup>ef</sup>	1,146 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>

<sup>a-f</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem, para  $P < 0,05$ .

Quando somente os dois folículos maiores por animal foram selecionados para a análise, houve diferença significativa com relação à área folicular e à média do diâmetro folicular entre o GnRH 2-6 e o Controle e GnRH 3-6, sendo ambos similares entre si, independente do dia da avaliação, sendo de 208,8  $\pm$  13,5 vs. 191,3  $\pm$  14,8 vs. 126,9  $\pm$  16,6 mm<sup>2</sup> e 15,1  $\pm$  0,5 vs. 14,6  $\pm$  0,6 vs. 11,9  $\pm$  0,6 mm, para o Controle, GnRH 3-6 e GnRH 2-6, respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6.** Médias ( $\pm$  SEM) dos parâmetros de desenvolvimento diário em éguas dos dois folículos maiores no decorrer dos seis dias de avaliação ultrassonográfica pós-ablação para os três grupos experimentais (Controle, GNRH 3-6 e GNRH 2-6)

Tratamento	Dia	Área (mm <sup>2</sup> )	Diâmetro (mm)	Crescimento diário (mm/dia)
<b>Controle</b>	1	53,7 $\pm$ 33,1 <sup>abc</sup>	8,0 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup>	
	2	119,2 $\pm$ 33,1 <sup>bcd</sup>	10,3 $\pm$ 1,2 <sup>bc</sup>	2,292 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	3	147,0 $\pm$ 33,1 <sup>bcd</sup>	14,0 $\pm$ 1,2 <sup>bcd</sup>	3,708 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	4	230,9 $\pm$ 33,1 <sup>def</sup>	16,8 $\pm$ 1,2 <sup>def</sup>	2,833 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	5	305,8 $\pm$ 33,1 <sup>efg</sup>	19,5 $\pm$ 1,2 <sup>ef</sup>	2,750 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	6	396,2 $\pm$ 33,1 <sup>g</sup>	22,3 $\pm$ 1,2 <sup>f</sup>	2,750 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
<b>T1 (GnRH 3-6)</b>	1	75,4 $\pm$ 36,3 <sup>abcd</sup>	9,5 $\pm$ 1,4 <sup>abc</sup>	
	2	94,0 $\pm$ 36,3 <sup>abcd</sup>	10,8 $\pm$ 1,4 <sup>abcd</sup>	1,250 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
	3	159,3 $\pm$ 36,3 <sup>abcde</sup>	13,8 $\pm$ 1,4 <sup>abcd</sup>	3,050 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
	4	210,2 $\pm$ 36,3 <sup>abcdef</sup>	15,8 $\pm$ 1,4 <sup>def</sup>	1,950 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
	5	271,2 $\pm$ 36,3 <sup>efg</sup>	17,0 $\pm$ 1,4 <sup>def</sup>	1,200 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
	6	337,4 $\pm$ 36,3 <sup>fg</sup>	20,8 $\pm$ 1,4 <sup>ef</sup>	3,800 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
<b>T2 (GnRH 2-6)</b>	1	48,4 $\pm$ 40,6 <sup>abc</sup>	7,1 $\pm$ 1,5 <sup>abc</sup>	
	2	53,0 $\pm$ 40,6 <sup>abc</sup>	8,0 $\pm$ 1,5 <sup>abc</sup>	0,938 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
	3	83,8 $\pm$ 40,6 <sup>abcd</sup>	10,2 $\pm$ 1,5 <sup>abcd</sup>	2,125 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
	4	137,1 $\pm$ 40,6 <sup>abcde</sup>	13,6 $\pm$ 1,5 <sup>abcde</sup>	3,375 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
	5	191,8 $\pm$ 40,6 <sup>cdef</sup>	15,2 $\pm$ 1,5 <sup>de</sup>	1,625 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
	6	247,1 $\pm$ 40,6 <sup>cdefg</sup>	17,5 $\pm$ 1,5 <sup>def</sup>	2,313 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>

<sup>a-g</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem, para P<0,05.

Considerando somente os dois folículos de maior diâmetro no d6, houve um aparente retardo de desenvolvimento folicular nos grupos GnRH 3-6 e GnRH 2-6, principalmente no GnRH 2-6, ao longo dos seis dias de avaliação, tornando-se mais evidente no d4 no GnRH 3-6 e no d5 no GnRH 2-6 (Figura 12, painéis a e b).

Portanto, interessante, o tratamento com apenas quatro dias de GnRH (GnRH 3-6), iniciado no d3 durante a emergência folicular, pode trazer vantagens técnicas para aplicação em procedimentos de OPU. No grupo GnRH 3-6, houve um aumento no crescimento diário no segundo dia após o início do tratamento com GnRH, quarto dia pós-ablação, concomitante ao momento em que houve maior quantidade de folículos intermediários em diâmetro (14 a 23 mm), o que poderia ser favorável não

somente para uma melhor recuperação de CCOs, por serem maiores, conforme descrito por Bøgh *et al.* (2002), como de maior viabilidade (HINRICHS e SCHMIDT, 2000), por ainda não haver um impacto negativo de atresia folicular causado pela divergência do(s) folículo(s) maiores do que 23 mm. Já as fêmeas do grupo GnRH 2-6, por sua vez, mostraram redução do crescimento folicular a partir do segundo dia após o início do tratamento, momento em que havia grande população de folículos pequenos (5 a 13 mm), característicos ao momento de recrutamento folicular, havendo uma possível desvantagem em termos de eficiência de recuperação de CCOs após a OPU. Nos estudos de Nagao *et al.* (2012) e Azevedo *et al.* (2015), quando as fêmeas foram tratadas com 100 µg de acetato de deslorelina após aplicação de PGF<sub>2α</sub>, com início ocorrendo próximo à divergência folicular, houve codominância folicular com crescimento comum entre os dois folículos maiores, que se tornaram codominantes, com a posterior ovulação dupla após a indução hormonal. Sendo assim, os autores constataram que, iniciando o tratamento quando pelo menos dois folículos possuíam diâmetros entre 20 e 25 mm, ovulações duplas ocorreram em 82% das fêmeas, realizando tratamento por curto período de tempo (3 dias) a partir da divergência folicular (>23 mm), minimizando a probabilidade de ocorrência do fenômeno de *downregulation* (Nagao *et al.*, 2012). Neste estudo, o tratamento dos grupos GnRH 2-6 e GnRH 3-6, iniciados no segundo ou terceiro dia pós-ablação, estando todos os folículos com menos de 23 mm no início dos tratamentos, fato que justificaria a não resposta ao tratamento pelo fenômeno de *downregulation*. Ademais, a ocorrência de codominância em 40% das éguas do Experimento 1 e das éguas controle do Experimento 2, e a ausência de codominância folicular das éguas tratadas com análogo de GnRH com exceção de apenas uma fêmea, a qual estabeleceu divergência após o d6, reforça o atraso influenciado pelo tratamento sobre o desenvolvimento folicular. Futuros estudos desta natureza deverão testar

protocolos hormonais alternativos, adequando doses, períodos de administração e hormônios para a superestimulação ovariana de equinos com vistas à codominância folicular e aumento da eficiência da OPU.

#### 5.2.5 *Recuperação dos CCOs e produção in vitro de embriões equinos por partenogênese*

Do grupo experimental de 15 animais utilizados no Experimento 2, seis fêmeas foram submetidas ao procedimento de OPU no d6 pós-ablação para a coleta de CCOs, sendo três do grupo Controle e três do grupo GnRH 3-6 (GnRH, 12-12 h, d3 ao d6). Foram aspirados 46 folículos terciários, sendo 32 folículos das éguas do grupo Controle (69,5%) e 14 folículos das éguas do grupo GnRH 3-6 (30,5%), obtendo-se uma taxa de recuperação folicular de 31,2% (n=10/32) e 28,5% (n=4/14) nos grupos Controle e GnRH 3-6, respectivamente (Tabela 7). O diâmetro folicular médio no dia da OPU foi de 23,0 mm no grupo Controle (variando de 17,5 a 28,0 mm) e 21,0 mm no grupo GnRH 3-6 (variando entre 13,5 a 33,5 mm). Após a realização de avaliação morfológica, segundo Hinrichs *et al.* (2010), os CCOs recuperados, de ambos os grupos, foram considerados morfolologicamente viáveis e com células do *cumulus oophorus* compactas (conforme descrito na Tabela 7), sendo esta característica também visualizada no trabalho de Vernunft *et al.* (2013), no qual obtiveram 12% de recuperação após realização de aspirações no momento em que o maior folículo atingia 23 mm de diâmetro, sendo todos submetidos à MIV.

A taxa de maturação nuclear oocitária, constatada pela visualização do corpúsculo polar após a remoção das células do *cumulus* 36 h após o início da MIV, foi de 50% nos grupos Controle (5/10) e GnRH 3-6 (2/4). As taxas de clivagem no Dia 3 após a ativação partenogenética foram de 80% (4/5) no grupo Controle e 100% (2/2) no grupo GnRH 3-

6, com um embrião atingindo o estágio de blastocisto no Dia 7 de desenvolvimento no Grupo Controle (1/5, 20%), conforme a Tabela 8.

**Tabela 7.** Taxas de recuperação oocitária após a OPU e classificação morfológica de CCOs equinos recuperados nos grupos Controle e GnRH 3-6

Grupo	Folículos aspirados n	CCO recuperados		<i>Cumulus oophorus</i>		Citoplasma	
		n	%	Expandidos/ Desnudos n	Compacto n (%)	Homogêneo n (%)	Heterogêneo n (%)
<b>Controle</b>	32	10	31,2	0	10 (100%)	9 (90%)	1 (10%)
<b>GnRH 3-6</b>	14	4	28,5	0	4 (100%)	3 (75%)	1 (25%)

**Tabela 8.** Taxas de maturação *in vitro*, clivagem e de blastocistos em equinos nos grupos Controle e Tratamento 1

Grupo	MIV	Taxa de maturação		Taxa de clivagem		Taxa de blastocistos	
	n	n	%	n	%	n	%
<b>Controle</b>	10	5	50	4	80%	1	20%
<b>GnRH 3-6</b>	4	2	50	2	100%	0	0%

A baixa eficiência de recuperação após a OPU encontrada no presente trabalho (31,2% no grupo controle e 28,5% no grupo GnRH 3-6) era um tanto esperada, uma vez que a aspiração de folículos imaturos é mais laboriosa devido à íntima ligação das células da granulosa à parede folicular (HINRICHS, 2010). Estudos anteriores, ao realizarem a aspiração de folículos imaturos de uma nova onda folicular, revelaram taxa de recuperação de <30% (COOK *et al.*, 1993; MARI *et al.*, 2005; VERNUNFT *et al.*, 2013). Houve maior quantidade de oócitos de citoplasma homogêneo em ambos os grupos, o

que parece não haver prejudicado a capacidade dos oócitos de atingirem a maturação nuclear após a MIV. Estudos atestam que o citoplasma heterogêneo é característico de CCOs com maior competência, tendo relação com a qualidade, sendo, portanto, uma das características favoráveis a serem avaliadas antes do processo de maturação (HINRICHS e SCHMIDT, 2000; VERNUNFT *et al.*, 2013). Entretanto, os nossos resultados revelaram que apesar da alta ocorrência de citoplasma homogêneo, a taxa de maturação foi próxima à considerada ideal (60%) por Hinrichs *et al.* (2010). A ocorrência de apenas um blastocisto no grupo Controle após a ativação partenogenética demonstra o potencial de desenvolvimento dos oócitos equinos obtidos por OPU, mas não é suficiente para gerar dados conclusivos em relação à influência do tratamento sobre a competência oocitária neste estudo.

### **5.3 Visão geral de codominância espontânea durante os Experimentos 1 e 2**

Observando o comportamento geral das ovulações após a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e anterior ao procedimento de ablação folicular nos Experimentos 1 e 2, houve 36,0% (9/25) de codominância folicular, podendo-se observar 28,0% de ovulação dupla (7/25), sendo semelhante às frequências encontradas em estudos anteriores. Ginther *et al.* (2009) observaram dupla ovulação em 17% de animais tratados com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Em comparação a outras raças, é comum a raça Brasileiro de Hipismo apresentar maior frequência de ovulações duplas provavelmente devido à forte ascendência do Puro Sangue de Corrida (GINTHER, 1992). Além disso, Ginther *et al.* (2009) observaram ocorrência de 15% de HAF após a aplicação de tal hormônio. Em contrapartida, foi visualizada a ocorrência de apenas uma fêmea com HAF (6,6%) neste estudo após aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . A utilização deste hormônio é muito comum na clínica de equinos, principalmente na rotina de transferência de embriões para garantir o retorno ao estro de doadoras após a coleta de embriões. Por isto, torna-se relevante o conhecimento que o emprego de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pode

aumentar a probabilidade de ocorrência de ovulações duplas, o que seria positivo na rotina de TE, porém também pode haver aumento da ocorrência de HAF, dependendo do momento da onda folicular em que o hormônio é aplicado. Acredita-se que a ocorrência de HAF após a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  esteja relacionada ao aumento na concentração de LH no momento da emergência de uma nova onda folicular, enquanto os folículos que sofrem influência do LH após atingirem 6 mm de diâmetro (após a emergência) terão maiores chances de sofrerem codominância e ovulação dupla (GINTHER *et al.*, 2008).

Ademais, durante as avaliações após a realização da ablação até o d6, considerando folículos com diâmetro próximo ao característico do momento de divergência (23 mm), observou-se um total de 40% (6/15) de codominância nas fêmeas do Experimento 1 (n= 2) e nas éguas do grupo Controle (não tratadas) do Experimento 2 (n=4). Não obstante, nas éguas que receberam tratamento de GnRH (GnRH 3-6 e GnRH 2-6), não foi possível observar codominância entre os folículos até o d6 pós-ablação. Porém, uma égua do Grupo GnRH 2-6 apresentou codominância com divergência se estabelecendo a partir do d7 e ovulação dupla ocorrendo no d15 pós-ablação, indicando mais o aparente atraso na taxa de crescimento folicular, possivelmente em resposta aos tratamentos com GnRH. Salienta-se que, apesar de algumas éguas terem sido acompanhadas até a ovulação (éguas não submetidas à OPU no d6), e para manter a uniformidade da compilação dos dados apresentados, consideraram-se apenas as observações até o d6 pós-ablação.

Há relatos de que a realização da ablação folicular favoreça a ocorrência de ovulações duplas, porém tais trabalhos realizaram a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em até 4 dias após a aspiração total do conteúdo folicular (BERGFELT e ADAMS, 2000). Levando-se em consideração o que foi observado no presente trabalho sobre o momento da emergência folicular, a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento em que os folículos já se



encontram com diâmetros maiores do que 6 mm (até o d3) levanta a hipótese de que tais folículos podem sofrer a influência do aumento de LH, conforme descrito por Ginther *et al.* (2008), havendo uma maior chance de haver codominância subsequente à aplicação de PGF<sub>2α</sub> e não à ablação folicular.

Em um estudo onde foi utilizada a ablação folicular em conjunto com a aplicação exógena de PGF<sub>2α</sub> no D10 (D0=ovulação), ocorreu HAF em 24% das fêmeas (GINTHER *et al.*, 2008). Em contraposição, neste estudo foi visualizada estrutura semelhante a HAF após a realização do procedimento de ablação folicular em apenas um animal no quarto dia após o procedimento. Tal estrutura pode ter ocorrido por falha técnica, não havendo a total aspiração do fluido folicular e conseqüente preenchimento do folículo com formação de coágulo. Nas demais fêmeas acompanhadas até o d18, houve atraso na ovulação em apenas um animal, podendo ter sido causado pela presença de CL persistente, ou por eventual ovulação de um folículo que acabou se preenchendo após a aspiração folicular, conforme já relatado por Bergfelt *et al.* (2007). Há relatos de formação de tecido lúteo funcional após a aspiração folicular, porém somente em folículos de diâmetro pré-ovulatório (>35 mm; HINRICHS *et al.*, 1991). Nas 26 ablações foliculares realizadas no presente trabalho, os diâmetros dos folículos ovarianos presentes no dia das aspirações foliculares variaram de 10 a 30 mm, o que justificaria a baixa frequência na formação de corpo lúteo funcional. Ademais, acredita-se que a progesterona tenha papel fundamental no desenvolvimento da competência oocitária (WATSON *et al.*, 2002). Desta forma, buscou-se realizar a sincronização dos ciclos estrais para a ablação folicular em meio ao diestro, com a presença de corpo lúteo e ação da progesterona durante o desenvolvimento da onda folicular pós-ablação. Apesar da presença do corpo lúteo da ovulação anterior à ablação durante o desenvolvimento folicular, a maioria das ovulações nos Experimentos 1 e 2 ocorreu entre d10 e d14 pós-

ablação, mesmo período relatado em estudo anterior, no qual aplicou-se  $\text{PGF}_{2\alpha}$  quatro dias após a ablação folicular de folículos  $\geq 10$  mm, com posterior utilização de hCG como agente indutor da ovulação (BERGFELT *et al.*, 2007).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados observados neste estudo, podemos concluir que:

- a) A técnica de ablação de folículos ovarianos menores do que 5 mm em meados do diestro de éguas cíclicas determinou uma sincronização de uma nova onda de desenvolvimento folicular até a ovulação de formas temporal e espacialmente previsíveis.
- b) A utilização de doses repetidas de GnRH na fase de emergência ou recrutamento da nova onda folicular, após a sincronização por ablação folicular, não somente não induziu codominância folicular subsequente, como determinou um aparente retardo na progressão da onda folicular.
- c) A ocorrência de apenas um blastocisto no grupo Controle após a ativação partenogénica não foi suficiente para gerar dados conclusivos em relação à influência do tratamento sobre a competência oocitária neste estudo.

O aprofundamento científico em relação ao comportamento da dinâmica folicular perante a superestimulação ovariana, possibilitaria o aumento da eficiência nas diversas biotecnologias da reprodução hoje disponíveis, não havendo a necessidade da ocorrência da (super)ovulação *per se*. Além disto, a sincronidade repetível do ciclo estral gerada pela ablação folicular traz a possibilidade de união entre biotecnologias de produção de embriões. Por exemplo, a OPU, para a coleta de CCOs pode ser aplicada também para a ablação folicular de doadoras; enquanto os CCOs são utilizados para a produção *in vitro* por meio da ICSI, a ablação folicular permite o desenvolvimento de nova onda para a produção *in vivo*, pela coleta e TE convencional, podendo ainda a aspiração folicular ser aplicada no intuito de gerar sincronidade entre ovulações das éguas doadoras e receptoras. Certamente, outros modelos e estratégias podem ser utilizados, considerando

que a ablação folicular demonstra ser uma estratégia física repetível e previsível de sincronização de nova onda folicular subsequente.

Ademais, o aparente atraso do crescimento folicular causado pelo fenômeno de *downregulation*, com a manutenção de maior população de folículos pequenos a intermediários no dia da OPU nos grupos tratados com GnRH pode ser vantajoso, por ser capaz de gerar maior população folicular disponível mais adequada para a OPU quando comparada à população folicular presente no momento em que já houve divergência do folículo dominante e atresia dos demais, buscando a competência oocitária relatada por Vernunft *et al.* (2013). Resta saber se a população de folículos sob influência de hormônios exógenos seria tão competente quanto àqueles sem efeito hormonal externo. A coleta sanguínea para mensuração sérica das concentrações de FSH e LH após o tratamento de GnRH para melhor entendimento da ocorrência do fenômeno de *downregulation* possibilitaria correlacioná-las com a competência oocitária para o melhor entendimento de tais fatores em busca de melhor eficiência no momento da OPU, concentrando uma população folicular em uma faixa de diâmetro específico, o qual seja anterior à dominância e posterior à aquisição de competência folicular.

Neste estudo, os dados obtidos não foram suficientes para concluir se a sincronização da onda folicular seguida da aplicação hormonal de acetato de deslorelina é capaz de aumentar a eficiência de recuperação de oócitos de maior competência em maior quantidade após a OPU, devido à baixa recuperação folicular em ambos os grupos e baixa quantidade amostral para uso na PIV de embriões. Para tanto, pesquisas futuras ainda são necessárias para proporcionar melhor esclarecimento destes pontos imprescindíveis, dentre outros, para a compreensão dos efeitos da superestimulação ovariana sobre a competência oocitária em equinos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONA, P.R. Ovogênese e foliculogênese em mamíferos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, p.245-250, 2013.
- AITKEN, W.A. The oestrous cycle of the mare. **Veterinary Practice Bulletin**, v.8, p.178–189, 1926.
- ALBRECHT, F.F. *et al.* Dinâmica folicular nas raças pônei brasileiro e brasileiro de hipismo: Existem diferenças? **Anais Congresso Reprolab de Reprodução Equina**, Porto Alegre, UFRGS, 2018.
- ALM, H. *et al.* Comparison of different methods for recovery of horse oocytes. **Equine Veterinary Journal** (suppl.), v.25, p.47-50, 1997.
- ALVES, K.A. *et al.* The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PLoS ONE**, v.11, p.1-18, 2016.
- AZEVEDO, M.V. *et al.* Induction of multiple ovulations in mares using low doses of GnRH agonist deslorelin acetate at 48 hours after luteolysis. **Pferdeheilkunde**, v.31, p.160-164, 2015.
- BAKER, C.B.; KENNEY, R.M. **Systematic approach to the diagnosis of the infertile and subfertile mare**. In: MORROW (ed) Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia: W. B. Saunders Co. p.721-736, 1980.
- BERGFELT, D.R., LIGHTFOOT, K.C., ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895–907, 1994.
- BERGFELT, D.R., ADAMS, G.P. Ovulation synchrony after follicle ablation in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.257–269, 2000.
- BERGFELT, D.R., GASTAL, E.L, GINTHER, O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v.65, p.426-432, 2001.
- BERGFELT, D.R. *et al.* Ovulation synchronization following commercial application of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.68, p.1183-1191, 2007.
- BERGFELT, D.R. Anatomy and Physiology of the mare. In: SAMPER, J. C. (2<sup>nd</sup> ed.) **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. St Louis: Missouri: Saunders Elsevier. Cap.11, p.113 – 131, 2009.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics of developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.

- BØGH, I.B. *et al.* Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of *in vivo* aspirated equine oocytes. **Theriogenology**, v.57, p.1765-1779, 2002.
- BORDIGNON, V. *et al.* GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers, **Theriogenology**, v.48, p.291-298, 1997.
- BURATINI, J.J. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga utilizando a ultrassonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante**. Tese (Mestrado) – Departamento de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.66, 1997.
- CARNEIRO, G. *et al.* 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. **Biology of Reproduction**, v.65, p.899-905, 2001.
- CARNEVALE, E. M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, p.23-30, 2008.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction**, v.52, p.209–214, 1995.
- CARNEVALE, E.M. *et al.* Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. **AAEP Proceedings**, v.50, p.531-533, 2004.
- CHECURA, C.M. *et al.* Positive effect of FSH but not LH on early development of the dominant follicle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1092-1099, 2010.
- CHOI, Y. H. *et al.* *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. **Theriogenology**, Los Altos. v.40, p.959–966, 1993.
- CHOI, Y. H. *et al.* Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thawed cycles. **Theriogenology**, v.65, p.808–819, 2006.
- CHOI, Y. H. *et al.* Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. **Theriogenology**, v.85, p.1289-1296, 2016.
- COOK, N.L. *et al.* Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. **Equine Veterinary Journal** (Suppl.), v.15, p.71-74, 1993.
- DAELS, P.F. *et al.* The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.501-508, 1991.
- DELL'AQUILA, M.E. *et al.* Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after ICSI of equine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.79-88, 2001.
- DONADEU, F.X.; GINTHER, O.J. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. **Reproduction**, v.121, p.897-903, 2001.

- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular Development and function in mammals. **Reproduction**, v.122, p.829-838, 2001.
- EVANS, M.J.; IRVINE, C.H.G. Measurement of equine follicle stimulating hormone and luteinizing hormone: response of anestrous mares to gonadotropin releasing hormone. **Biology of Reproduction**, v.15, p.477-484, 1976.
- FOSS R.; ORTIS H.; HINRICHS K., Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.45, p.39-43, 2013.
- GALLI C. *et al.* Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. **Theriogenology**, v.58, p.705-708, 2002.
- GALLI, C. *et al.* Ovum pick up, ICSI and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v.81, p.138-151, 2014.
- GASTAL, E.L. *et al.* Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1320-1327, 1997.
- GASTAL, E.L. *et al.* Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.53, p.925-940, 2000.
- GASTAL, E.L. *et al.* interrelationship among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**, v.128, p.417-422, 2004.
- GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**, 1<sup>st</sup> Ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1979.
- GINTHER, O.J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.3, p.41-47, 1985.
- GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**. 2nd Ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, p.642, 1992.
- GINTHER, O.J. The mare: A 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women. **Theriogenology**, v.77, p.818-828, 2012.
- GINTHER, O.J. Systemic and intrafollicular components of follicle selection in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.59, p.116-133, 2017.
- GINTHER, O.J, BERGFELT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development during the current pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p. 119-126, 1990.
- GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**, v.1, p.471-483, 1984.

- GINTHER, O.J. *et al.* Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1195-1201, 2004.
- GINTHER, O. J. *et al.* Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: A comparative study. **Reproduction**, v.130, p.379-388, 2005.
- GINTHER, O.J. *et al.* Follicle and systemic hormone interrelationships during spontaneous and ablation-induced ovulatory waves in mares. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.181–187, 2008.
- GOUDET, G. *et al.* Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: Effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**, v.57, p.232–245, 1997.
- GUIGON, C.J.; MAGRE, S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: Insights from models of germ cell depletion. **Biology of Reproduction**, v.74, p. 450-458, 2006.
- HINRICHS, K. Application of assisted reproductive technologies to clinical practice. **AAEP Proceedings**, v.56, p.195–206, 2010.
- HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals** (Suppl. 2), v.53, p.4-13, 2018.
- HINRICHS, K.; SCHMIDT, A.L. Meiotic competence in horse oocytes: Interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1402-1408, 2000.
- HINRICHS, K.; WILLIAMS, K.A. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration and oocytes meiotic competence in the horse. **Biology of Reproduction**, v.57, p.377-384, 1997.
- HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. **Biology of Reproduction**, v.44, p.292-298, 1991.
- HINRICHS, K.; SCHMIDT, A.L.; SELGRATH, J.P. Atlas of chromatin configurations of germinal vesicle-stage and maturing horse oocytes. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.60-63, 1993.
- HINRICHS, K. *et al.* Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: Changes *post mortem* and relationship to meiotic and developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.72, p.1142–1150, 2005.
- HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. The oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.161-166, 1975.
- IRELAND, J.J. *et al.* A commentary on domestic animals as dual-purpose that benefit agricultural and biomedical research. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2797-2805, 2008.



- IRVINE, C.H.G. Gonadotropin releasing hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.3, p.168-170, 1983.
- JACOB, J. C. *et al.* Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. **Reproduction of Domestic Animals**, v.44, p.92-99, 2009.
- JACOBSON, C.C. *et al.* Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.73, p.1116–1126, 2010.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on Development. **Journal of Animal Science**, v.82, p.E14-E23, 2004.
- LAGUTINA, I. *et al.* Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. **Reproduction**, v.130, p.559-567, 2005.
- 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, p.233–245, 2016.
- LOVE, C.C. *et al.* Effect of holding at room temperature on initial chromatin configuration and in vitro maturation rate of equine oocytes. **Theriogenology**, v.57, p.1973-1979, 2002.
- MARI, G. *et al.* Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.299-308, 2005.
- McCUE, P.M. *et al.* Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against inhibin alpha-subunit fragment. **Theriogenology**, v.38, p.823-831, 1992.
- MIRCEA, C.N. *et al.* Ovarian imaging in the mouse using ultrasound biomicroscopy (UBM): a validation study. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 579-586, 2009.
- MORITA, Y.; TILLY, J. Oocyte apoptosis: Like sand through na hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p. 1-17, 1999.
- NAGAO, J.F. *et al.* Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.69-73, 2012.
- PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.3, p.203–216, 1980.
- PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.193-210, 2001.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27–37, 1998.

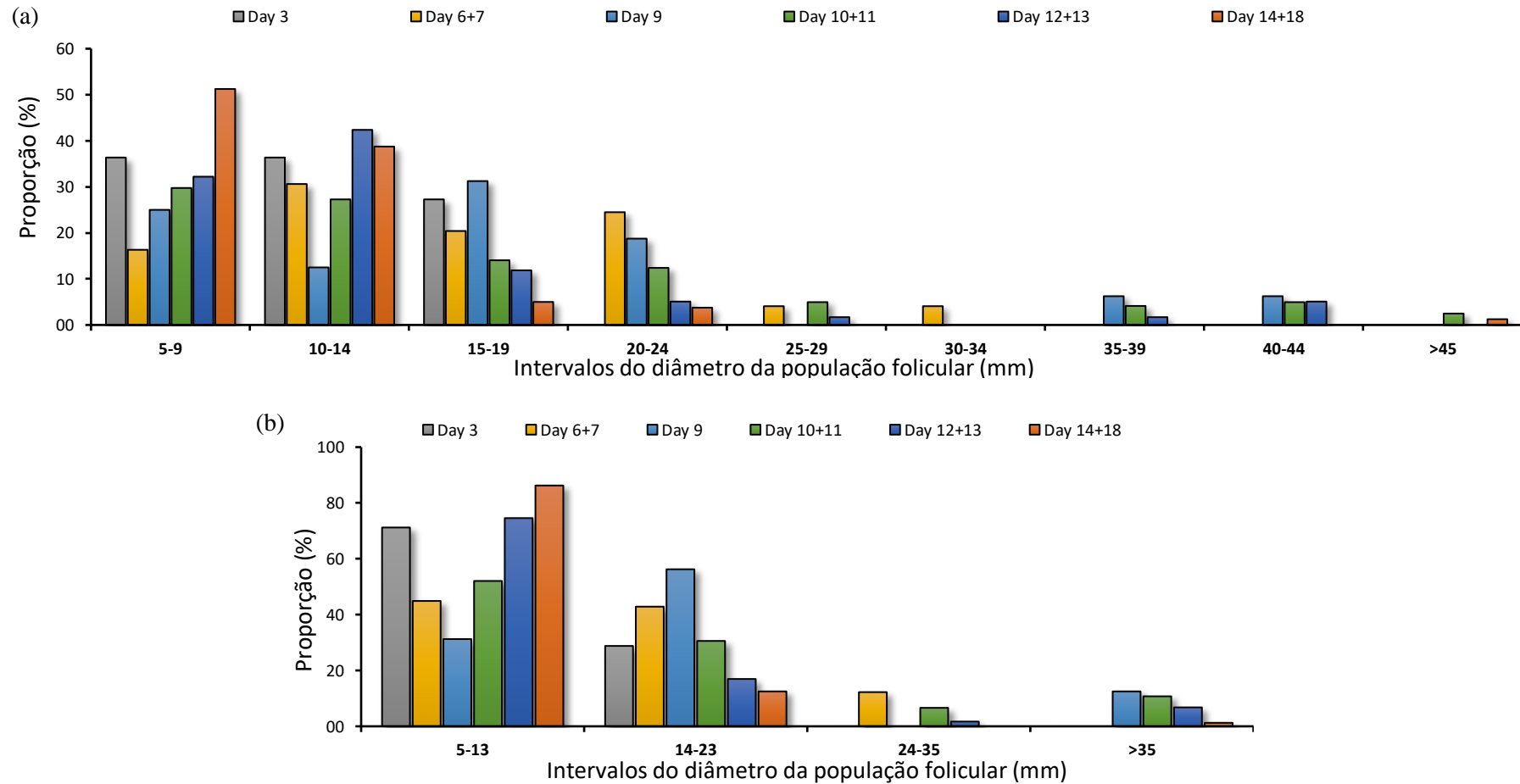
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.21, p.495–504, 1984.
- ROSER, J.F.; MEYERS-BROWN, G. Superovulation in the mare: A work in progress. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.376-386, 2012.
- SENGER, P.L. Puberty. In: **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2<sup>nd</sup> Ed. Current Conception: Pullmann, USA. p.128–143, 2003.
- SIROIS, J.; BALL, B.A.; FORTUNE, J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the oestrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.8, p.43–48, 1989.
- SQUIRES, P.C., McCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.1-8, 2007.
- VERNUNFT, A. *et al.* Chromatin and cytoplasmic characteristics of equine oocytes recovered by transvaginal ultrasou-guided follicle aspiration are influenced by the developmental stage of their follicle of origin. **Theriogenology**, v.80, p.1-9, 2013.
- WANG, Q.; SUN, Q.Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.1-12, 2007.
- WATSON, E.D. *et al.* Concentrations of inhibin, progesterone ando estradiol in fluid dominant and subordinate follicles from mares during spring transistion and the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v.15, p.55-67, 2002.
- ZHANG, X.; RUTLEDGE, J.; ARMSTRONG, D.T. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, p.292–296, 1991.

## **8. BIOGRAFIA DA AUTORA**

Juliana Torriani Maciel é natural de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, ingressou na Faculdade de Veterinária da UFRGS em agosto de 2010, e desde o princípio do curso buscou realizar estágios no âmbito da reprodução de equinos. Entre os anos de 2014 e 2015 teve a oportunidade de realizar intercâmbio estudantil na Alemanha, em Hanôver, onde buscou oportunidades para se aprofundar ainda mais na especialidade. Ao retornar ao Brasil, foi monitora na disciplina de Medicina de Equinos do curso de graduação, auxiliando os alunos durante as atividades práticas, descobrindo sua feição em explanar sobre o assunto que gosta: reprodução de equinos.

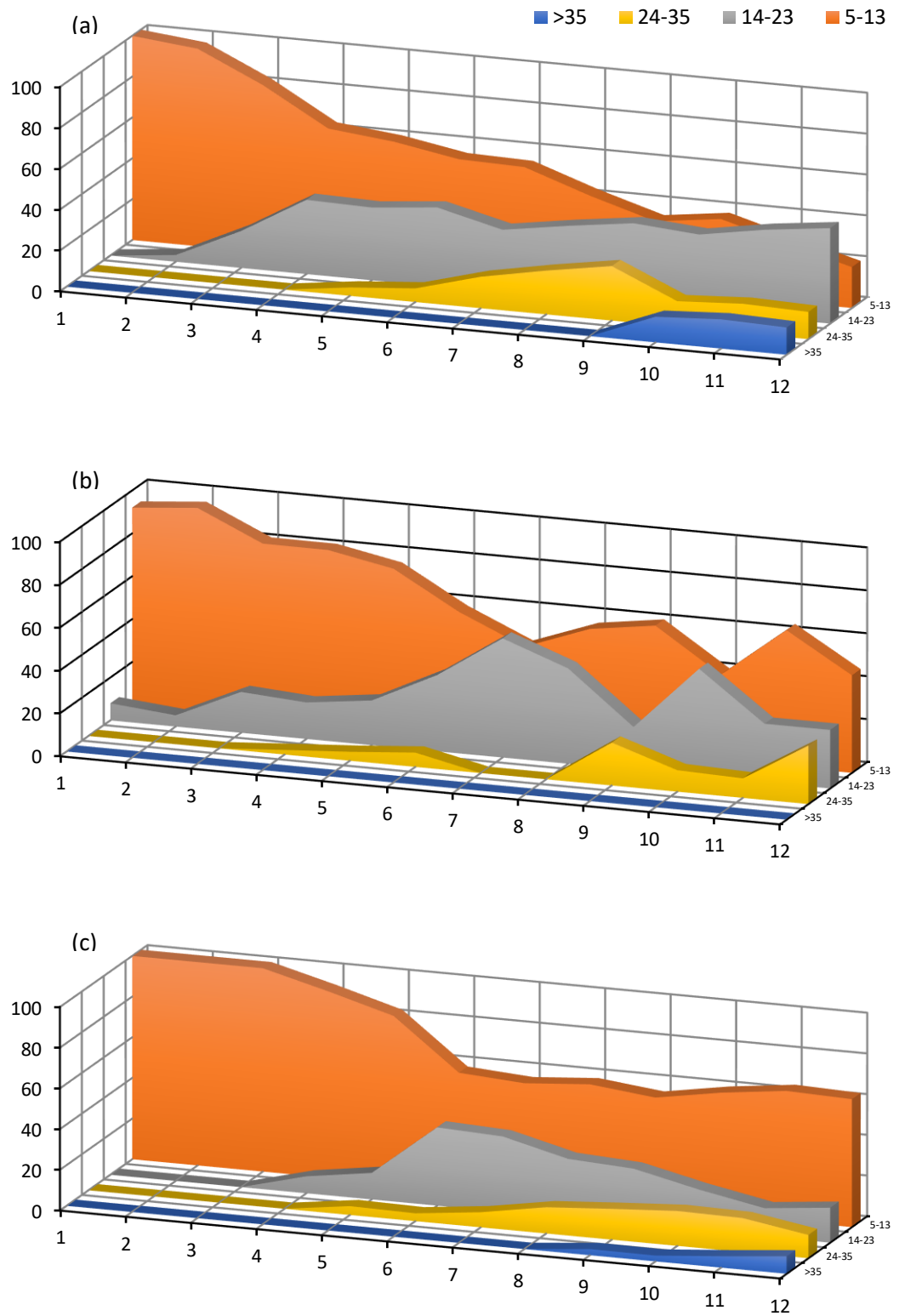
## **9. ANEXOS**

### **9.1 Anexo A – Datos suplementares - Experimento 1**



**Figura suplementar 1.** Distribuição (%) do diâmetro dos folículos ovarianos em éguas (mm), agrupados por tamanho em intervalos, sob modalidade (a) métrica ou (b) funcional, nos dias 3, 6+7, 9, 10+11, 12+13, 14 e 18 pós-ablação.

## 9.2 Anexo B – Dados suplementares - Experimento 2



**Figura suplementar 2.** Evolução da distribuição da população de folículos ovarianos em éguas nos grupos (a) Controle, (b) GnRH 3-6 e (c) GnRH 2-6 para os intervalos de 5 a 13 mm, 14 a 23 mm, 24 a 35 mm e >35 mm do d1 até o d12 pós-abloação. Controle, sem GnRH; GnRH 3-6: GnRH de 12-12 h, do d3 ao d6; GnRH 2-6: GnRH de 12-12 h, do d2 ao d6.