

ADRIANA DEL PILAR RIVERA MILLAN

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA TÉCNICA ULTRA-SONOGRÁFICA DE
INJEÇÃO INTRA-UTERINA VIA TRANSVAGINAL PARA TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES EM EQÜÍDEOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

ADRIANA DEL PILAR RIVERA MILLAN

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA TÉCNICA ULTRA-SONOGRÁFICA DE
INJEÇÃO INTRA-UTERINA VIA TRANSVAGINAL PARA TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES EM EQÜÍDEOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 04 de setembro de 2001

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho

Prof. Eduardo Leite Gastal
(Conselheiro)

Prof. Orlando Marcelo Vendramini
(Conselheiro)

Profa. Melba Maria Furtado Oliveira Gastal
(Orientadora)

Dedico:

A Regis, por su apoyo, colaboración, incentivo y sobre todo por su grande amor. A Gabriela, fruto de nuestro amor.

A mis padres, Ariel y Lucy, personas sin las cuales nunca hubiera llegado a vencer esta etapa de mi vida profesional. A mis hermanas Dora, Vicky y a mi sobrina Valeria.

AGRADECIMENTO

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela concessão da bolsa de estudo no último ano.

À Professora Melba Gastal, pela orientação, paciência, compreensão e ajuda, tanto pessoal quanto acadêmica.

Ao Professor Eduardo Gastal, pela co-orientação, pelas sugestões, pela compreensão e ajuda na condução dos experimentos.

À Pomar Industrial & Comercial – Divisão Frigorífico, nas pessoas do Dr. Mitchel Riensler, Dr. Valmir Tunala e José Inácio de Oliveira Filho, por ceder as genitálias das éguas, e por auxiliar na coleta das mesmas.

Ao Professor Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo, por permitir o uso temporário do microscópio estereoscópio, pertencente ao seu laboratório.

À estudante de Graduação em Zootecnia, Darcilene Maria de Figueiredo, bolsista de iniciação científica (CNPq), pelo auxílio na condução dos experimentos, pela amizade e ajuda incondicional.

Aos estudantes estagiários do Setor de Equiideocultura, Ana Paula Dutra, e Patrícia Campos.

A Fernando Antônio Freitas, funcionário responsável pelo Setor de Equiideocultura, bem como aos outros funcionários do Setor, José Paulo, Donizete, Arcínio, Silvio, Dimas, Sebastião, Roberto, Júlio César, Bernardo e José Antônio.

Aos amigos e colegas de Pós-graduação em Zootecnia, Rogério Fürts e Vanessa, pela ajuda incondicional no momento mais difícil do estudo.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, em nome do Prof. Liovando Marciano da Costa.

À Coordenação de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, em nome da Sr.^a Maria Celeste Ottomar da Silva.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

ADRIANA DEL PILAR RIVERA MILLAN, filha de Ariel Rivera Ospina e Ana Lucy Millan de Rivera, nasceu em La Unión (Valle), Colômbia, em 22 de dezembro de 1970.

Obteve diploma de Zootecnista, em maio de 1996, pela Universidade Nacional de Colômbia –Sede Palmira- Colômbia.

Em março de 1999, iniciou curso de Pós-Graduação na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese para obtenção do título M.S. em Zootecnia em setembro de 2001.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1. Histórico e fundamentos da técnica ultra-sonográfica.....	5
2. Equipamentos.....	7
3. Avaliação ultra-sonográfica do útero.....	8
4. Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina.....	9
5. Aspectos gerais da transferência de embriões em eqüídeos.....	10
5.1. Métodos atuais de transferência de embriões em éguas.....	10
6. Manipulação cervical e liberação de agentes uterocinéticos.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Experimento 1. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de	

injeção intra-uterina via transvaginal.....	15
Experimento 2. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de veículo (tinta guache).....	22
Experimento 3. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de oócitos.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
Experimento 1. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal.....	30
Experimento 2. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de veículo (tinta guache).....	35
Experimento 3. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de oócitos.....	37
CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Extensão plástica para procedimentos transvaginais, agulha de 17 g e tubo de teflon.....	17
Figura 2. Demonstração da introdução da extensão plástica no canal vaginal, contendo a agulha e o tubo, bem como a manipulação da genitália durante o procedimento da injeção intra-uterina.....	18
Figura 3. Desenho esquemático da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal.....	19
Figura 4. Ultra-sonogramas da seqüência da injeção intra-uterina.....	20
Figura 5. Ilustração da agulha e do tubo no lume uterino, após incisão longitudinal do corno uterino.....	21
Figura 6. Ilustração da agulha, do tubo e do fluido injetado no lume uterino, após incisão longitudinal do corno uterino.....	24
Figura 7. Desenho esquemático da disposição das colunas de ar, solução fisiológica e oócitos dentro do tubo de teflon (1,0 mm de diâmetro e 70 cm de comprimento).....	27
Figura 8. Ilustração da genitália com o cateter de Foley para a recuperação dos oócitos após injeção intra-uterina.....	28
Figura 9. Número de tentativas de inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, nas taxas de sucesso e insucesso, por meio da técnica	

ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	32
Figura 10. Taxas de sucesso e insucesso para as duas quantidades de volume de líquido injetado no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	36
Figura 11. Taxas de sucesso e insucesso da injeção intra-uterina de oócitos por meio da técnica ultra-sonográfica via transvaginal “in vitro”	38
Figura 12. Taxa de recuperação de oócitos em cada lavado/sessão com a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	39

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Frequência de sucesso e insucesso para cada uma das sessões de inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	30
Tabela 2. Taxas de sucesso e insucesso relacionadas com o número de tentativas de inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	30
Tabela 3. Taxas de sucesso e insucesso e escores estimados na inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	32
Tabela 4. Tempo médio gasto nas taxas de sucesso e insucesso da inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro” em cada sessão.....	33
Tabela 5. Razões encontradas nas taxas de insucesso da inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.....	34

RESUMO

RIVERA MILLAN, Adriana del Pilar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro, 2001. **Avaliação “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal para transferência de embriões em equídeos.** Orientadora: Melba Maria Furtado Oliveira Gastal. Conselheiros: Eduardo Leite Gastal e Orlando Marcelo Vendramini.

Devido à necessidade de se obter melhores taxas de prenhez após transferência de embriões pelo método não-cirúrgico, técnicas alternativas têm sido testadas, porém com resultados poucos satisfatórios. Dentro desse contexto, o presente estudo foi conduzido com o intuito de investigar a eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”, para validação da mesma e posterior utilização como técnica alternativa na transferência de embriões na espécie equina.

Para isso, foram desenvolvidos três experimentos, utilizando-se genitálias de éguas provenientes de frigorífico (Experimentos 1, 2 e 3) e oócitos (Experimento 3) obtidos de folículos de ovários de genitálias e, ou aspirados de folículos de éguas “in vivo” por meio da técnica ultra-sonográfica. No Experimento 1, a alta taxa de sucesso (88%, 879/1000) na inserção de agulha e de tubo de teflon no lume do útero, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal, sugere a viabilidade do procedimento, o qual foi caracterizado por reduzido número de tentativas ($1,04 \pm 0,2$) e mínimo tempo gasto ($21,7 \pm 0,3$ seg) por injeção, quando o procedimento resultou em sucesso. Além disso, o emprego de um sistema de escores para determinar o grau de certeza do posicionamento da agulha e do tubo no lume uterino, visualizados

no monitor do ultra-som, permitiu maior eficiência da técnica. No Experimento 2, o principal objetivo foi determinar o volume mínimo de fluido injetado no lume uterino de genitálias, capaz de ser visualizado na tela do ultra-som durante e após a injeção do veículo (tinta guache branca). Verificou-se que os volumes de 0,5 e 1,0 mL resultaram em taxas de sucesso de 88,5% (261/295) e 91,2% (269/295), respectivamente. Porém, o volume de 1,0 mL mostrou ser mais adequado para a visualização do fluido no momento da injeção, enquanto o volume de 0,5 mL foi mais fácil de ser visualizado após a injeção. No Experimento 3, a eficiência da técnica foi testada na deposição de oócitos no lume uterino. A taxa de sucesso foi menor (75%, 45/60) quando comparada aos experimentos anteriores. No entanto, a taxa de sucesso baseou-se na recuperação de pelo menos um oócito, após duas lavagens uterinas e não no sucesso em depositar os oócitos de forma adequada no lume uterino. Sendo assim, provavelmente, outros fatores tenham afetado a recuperação dos oócitos, o que interferiu nas taxas de sucesso deste experimento. Com base nos resultados do presente estudo, com taxas de sucesso variando de 75,0 a 89,8%, pode-se sugerir que a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro” é um procedimento viável. O reduzido número de tentativas/injeção e o mínimo tempo gasto para a execução da técnica representam papel importante para que esse procedimento seja utilizado “in vivo”. Finalmente, a técnica testada nesse experimento pode tornar-se mais uma alternativa para transferência não-cirúrgica de embriões em éguas e quem sabe, também, em outras espécies. Isso se deve ao fato desta técnica ser de rápida execução e, principalmente, por evitar manipulações cervicais, comumente suspeitas de interferirem negativamente nas taxas de prenhez, quando do ato da transferência não-cirúrgica de embriões.

ABSTRACT

RIVERA MILLAN, Adriana del Pilar, M.S., Universidade Federal de Viçosa. September of 2001. **Evaluation “in vitro” of transvaginal ultrasonographic technique of intrauterine injection, for equine embryo transfer.** Adviser: Melba Maria Furtado Oliveira Gastal. Committee Members: Eduardo Leite Gastal and Orlando Marcelo Vendramini.

The necessity in obtaining higher pregnancy rates after non-surgical embryo transfer has induced the development of some research on this field. The objective of the present study was to develop and to evaluate, the efficiency of the transvaginal ultrasound-guided intrauterine injection technique in vitro, for a subsequent use as an alternative procedure for embryo transfer in mares. Three experiments were developed using genital tracts of mares (Experiments 1, 2 and 3) and oocytes (Experiment 3) obtained from aspirated follicles. In Experiment 1, the successful rate of insertion of the needle and tube into the uterine lumen in vitro was 87.9% (879/1000). The averages of the certainty scores that resulted in successful (4.0) and not successful (3.7) were different ($P < 0.001$). The high degree of certainty (score 4) resulted in a larger number of successful injections (89.7%, 834/930). This result suggests that the development of visual pattern by scores can be useful to predict the efficiency of this technique. The procedure required on average 21.7 ± 0.3 sec/injection. Difference ($P < 0.001$) was observed among the time for the successful injections (21.0 ± 0.3 sec) versus not successful (26.0 ± 1.2 sec). The viability of the procedure, was also characterized by reduced number of attempts (1.0 ± 0.2) per injection, when the procedure resulted in

success. In Experiment 2, 40 genital tracts were used to determine the amount of vehicle to be visualized in the ultrasound image and to be detected in the opened uterine lumen. A white water color was used as vehicle. Two volumes of vehicle were tested: 1) 0.5 mL and 2) 1.0 mL, with 25 to 30 injections/session in each volume. The successful rate (89.8%, 530/590) to deliver the vehicle into the uterus was similar to that obtained in Experiment 1. No difference was detected between the 2 injected volumes. When 1.0 mL was injected, there was a larger relationship ($P < 0.003$) between the visualization of the fluid during the injection and the successful rate of the procedure. However, the visualization of the fluid on the ultrasound immediately after the injection was facilitated ($P < 0.01$) by the smaller volume (0.5 mL), probably due to a slower diffusion. In Experiment 3, 60 injections with a pool of 4 to 5 oocytes per injection were performed to test the capability of the technique to deliver oocytes into the uterus. The successful rate of depositing oocytes into the uterus was 75% (45/60). A lower efficiency rate obtained in this experiment was probably due to other factors involved in the recovery of oocytes. On average, 2.1 ± 1.5 (73.3%) and 0.1 ± 0.4 (6.7%) oocytes were recovered from the first and second flushing, respectively. The range of successful rates (75.0 to 89.8%), of the present study “in vitro” suggests that the transvaginal ultrasonographic technique is a viable procedure. The reduced number of attempts/injection and the short time needed for the procedure may be important for the use of this technique “in vivo”. This study suggests that the transvaginal ultrasound-guided intrauterine injection may have the potential of becoming one more alternative for embryo transfer. In addition, this technique could avoid cervical manipulations, release of $\text{PGF2}\alpha$ and oxytocin, uterine infection and refluxes of embryos through the cervix, commonly suspected of interfering negatively in pregnancy rates, after a non-surgical embryo transfer in mares.

INTRODUÇÃO

A ultra-sonografia é, atualmente, o procedimento semiológico ideal para exame da maioria dos tecidos moles do organismo animal. Antes da introdução da ultra-sonografia na reprodução de grandes animais, os órgãos genitais internos eram avaliados apenas por meio da palpação transretal e, ou, por procedimentos cirúrgicos (incisão laparoscópica). Os aspectos dinâmicos, tais como, batimentos cardíacos do embrião/feto, mobilidade embrionária/fetal, circulação fetal, ondas peristálticas e contratilidade uterina, raramente eram avaliados.

A principal vantagem desta técnica recai sobre o fato de tratar-se de uma avaliação de caráter não-invasivo, atraumática, que oferece resultados imediatos, sendo que até o momento não foram detectados efeitos colaterais em animais. Atualmente, a ultra-sonografia tem sido amplamente usada no manejo reprodutivo equino e em diagnósticos clínicos, tais como: monitoramento da atividade ovariana, determinação da puberdade de fêmeas, detecção da ovulação, diferenciação entre simples e duplas ovulações, monitoramento do corpo lúteo, estimativa da fase do ciclo estral, sexagem fetal, detecção de sêmen no útero, diagnóstico de perda embrionária precoce, diagnóstico de condições patológicas no ovário e útero, avaliação uterina pós-parto, entre outros.

Na reprodução equina, a ultra-sonografia foi primeiramente utilizada para diagnóstico de gestação precoce de éguas, detecção de gêmeos e documentação

fotográfica da gestação. Porém, atualmente, esta técnica tem sido amplamente utilizada na reprodução, não só para fins de diagnóstico, mas também como uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de pesquisas, principalmente nas áreas que envolvem o estudo da gestação precoce (GINTHER, 1995), foliculogênese (GASTAL, 1999) e interação dinâmica entre o útero e o embrião/feto (GINTHER, 1998). Além disso, o uso de procedimentos técnicos com auxílio da ultra-sonografia tem contribuído com o desenvolvimento de diferentes biotécnicas, visando a maior eficiência reprodutiva em várias espécies. Como exemplos desses procedimentos, podem-se salientar: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia em bovinos (PIETERSE et al., 1991; KANITZ et al., 1993) e eqüinos (BRUCK et al., 1992; CARNEVALE e GINTHER, 1993; COOK et al., 1993; MEINTJES et al., 1995), recuperação de oócitos e transferência intrafolicular em bovinos (BERGFELT et al., 1998) e eqüinos, (CARNEVALE e GINTHER, 1993), e predição de ovulação em eqüinos (GASTAL et al., 1998a).

Um dos maiores avanços do uso da ultra-sonografia, na reprodução de grandes animais, foi o desenvolvimento de instrumentos específicos que permitem a realização de procedimentos ultra-sonográficos via transvaginal (PIETERSE et al., 1991; BRUCK et al., 1992; COOK et al., 1993; MEINTJES et al., 1995). GASTAL et al. (1998b) desenvolveram a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal, para a liberação de substâncias no lume uterino. Os referidos autores obtiveram eficiência de 96% (24/25) de liberação de substâncias no lume uterino de éguas pôneis no dia 12 pós-ovulação e verificaram que o procedimento de perfuração da parede vaginal e uterina não resultou em transtorno para o ambiente uterino, visto que não houve alteração na contratilidade uterina no grupo de éguas que recebeu injeções intra-uterinas com veículo (PBS), quando comparado ao grupo tratado com PGE₂, substância esta que apresentou

poder estimulatório nas contrações uterinas (HURTGEN e GANJAM, 1979; BETTERIDGE et al., 1985; PASCOE, et al., 1989; GASTAL, 1998; GASTAL et al., 1998b). Esses resultados levaram os autores a sugerir que, com adaptações adequadas, a referida técnica, possivelmente, poderia ser desenvolvida para transferência de embriões.

A transferência de embriões, como instrumento de pesquisa, vem permitindo estudos mais profundos de vários aspectos da reprodução equina, tais como, interação precoce entre o embrião e o útero; identificação do sinal embrionário, por meio de liberação de prostaglandina E, que estaria relacionado com o reconhecimento materno da gestação (WEBER et al., 1991a,b); e determinação de causas de subfertilidade em éguas (BALL et al., 1989).

Apesar de a transferência de embriões, na espécie equina, ter evoluído substancialmente nas duas últimas décadas (IMEL et al., 1981; VOGELSANG et al., 1985; McKINNON et al., 1988; RIERA e MCDONOUGH, 1993; SQUIRES e SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999), o seu desenvolvimento, bem como as aplicações, têm sido limitados, quando comparados aos de outras espécies domésticas.

A transferência de embriões em eqüinos tem sido realizada, basicamente, por dois métodos, o cirúrgico e o não-cirúrgico. A técnica não-cirúrgica é a mais prática, porém, os resultados variam muito entre os técnicos/pesquisadores (IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a; IULIANO et al., 1985; MULLER e CUNAT, 1993; FLEURY, 1998). Por outro lado, a transferência de embriões pela técnica cirúrgica tem originado taxas de prenhez/ciclo mais consistentes (IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b; IULIANO et al., 1985; MULLER e CUNAT, 1993; SQUIRES e SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999).

Em função da grande variação nas taxas de prenhez e na tentativa de se desenvolver técnicas menos traumáticas e menos onerosas que a técnica cirúrgica, procedimentos alternativos para transferência de embriões eqüinos têm sido testados. MULLER e CUNAT (1993) desenvolveram uma técnica transvaginal para transferência de embriões em éguas com auxílio de espéculo transvaginal. No entanto, o resultado obtido pelos referidos autores foi abaixo do esperado, sendo sugerido que o principal motivo da falta de sucesso tenha sido a falha na confirmação da agulha e do tubo de teflon no lume uterino. Adicionalmente, necessita-se de que técnicas alternativas de transferência de embriões eqüinos sejam desenvolvidas, com intuito de se evitar manipulações cervicais, liberação de PGF2 α , infecção uterina e refluxo de embriões, comumente suspeitos de interferirem negativamente nas taxas de prenhez, quando do ato da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas (SQUIRES et al., 1982a,b, 1999).

Com base no exposto e considerando-se a importância de desenvolvimento de técnica não-cirúrgica alternativa para transferência de embriões eqüinos e em função da limitação de informações com relação à técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de verificar a eficiência desta técnica “in vitro”, para validação da mesma e posterior utilização como técnica alternativa na transferência de embriões na espécie eqüina.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Histórico e fundamentos da técnica ultra-sonográfica

A introdução da ultra-sonografia no monitoramento de eventos reprodutivos em éguas (PALMER e DRIANCOURT, 1980), no início da década de 80, e como nova

técnica de diagnóstico em Medicina Veterinária (CARTEE, 1980), representou marco importante no desenvolvimento da reprodução animal. Em decorrência do desenvolvimento de equipamentos de alta qualidade em diferentes modelos, nas duas últimas décadas, a técnica de ultra-sonografia em grandes animais tem sido amplamente aplicada, tanto para fins clínicos, como para pesquisas (eqüinos: GINTHER, 1986, 1988; MCKINNON et al., 1987a,b; CARNEVALE et al 1988; SQUIRES et al., 1988; GASTAL et al., 1997, 1998a; bovinos: KASTELIC et al., 1988; PIERSON e GINTHER, 1988; KÄHN e LEIDI, 1989; e caprinos e ovinos: BUCKRELL, 1988; GINTHER e KOT, 1994; GINTHER et al., 1995).

A imagem ultra-sonográfica em tempo real é resultante de uma técnica não-invasiva e não-abrasiva da imagem direta, “in situ”, da anatomia dos órgãos e tecidos reprodutivos. O uso da ultra-sonografia em tempo real tem permitido o desenvolvimento de pesquisas direcionadas à avaliação de eventos dinâmicos, envolvendo o embrião e o útero de éguas gestantes (GINTHER, 1983a,b, 1993, 1995; CROSS e GINTHER, 1987, 1988; GRIFFIN e GINTHER, 1992), batimentos cardíacos do embrião e feto (GINTHER, 1985; GASTAL et al., 1993) e monitoramento da ovulação (TOWNSON e GINTHER, 1987).

A técnica de ultra-sonografia utiliza ondas sonoras de alta frequência (1 a 10 MHz) para produzir imagens dos vários tecidos e órgãos. As ondas sonoras são produzidas pela vibração de um tipo especial de cristal (cristal piezoelétrico) alojado em um transdutor elétrico. O efeito piezoelétrico foi descoberto por Pierre e Jacques Curie em 1880, e consiste na variação das dimensões físicas de certos materiais sujeitos a campos elétricos. As vibrações são produzidas por pulsos de corrente elétrica. A característica ultra-sonográfica do tecido depende da capacidade deste em refletir as ondas sonoras. A proporção das ondas sonoras refletidas retorna ao transdutor, sendo

convertida em energia elétrica. A reflexão de som na tela do aparelho de ultra-sonografia caracteriza-se por diferentes tonalidades de cor cinza (preto e branco). A magnitude do som refletido é diretamente proporcional à densidade do tecido. Em geral, quanto maior a densidade do tecido (osso, músculo), maior a capacidade em refletir as ondas e maior a força do eco produzido. De forma geral, os fluidos são excelentes meios de transmissão de ondas sonoras, porque possuem baixa resistência. Estruturas contendo fluido aparecem em preto na imagem ultra-sonográfica. Tecidos densos, como o osso, refletem a maioria dos feixes sonoros e, por essa razão, aparecem em branco na imagem ultra-sonográfica. Outros tecidos são visualizados em diferentes tonalidades de cinza, dependendo da sua capacidade em refletir as ondas sonoras (GINTHER, 1986, 1995; GRIFFIN e GINTHER, 1992).

2. Equipamentos

Os mais modernos aparelhos de ultra-sonografia usados para examinar o trato reprodutivo de éguas são do tipo B-modal em tempo real. B-modal refere-se à modalidade do brilho, onde a imagem ultra-sonográfica aparece em duas dimensões na tela do ultra-som. O brilho é proporcional ao eco retornado. Quando sinais repetidos são transmitidos, retornados e processados, uma imagem contínua do tecido é produzida, o que permite a observação dessas estruturas e sua movimentação em tempo real (B-modal, tempo real).

Os dois principais tipos de transdutores ultra-sonográficos, usados em exames reprodutivos da égua, são o linear e o setorial convexo. O arranjo físico dos cristais dentro do transdutor determina o padrão de propagação das ondas a partir do transdutor. No transdutor linear a largura da imagem dos ecos corresponde ao comprimento da

porção ativa (cristalizada) do transdutor. O transdutor linear é orientado no plano longitudinal com relação ao corpo da égua. Dessa forma, imagens da cérvix e do corpo do útero são orientadas, longitudinalmente, enquanto os cornos uterinos aparecem em seção transversal. Transdutores setoriais produzem feixes de som de forma triangular, porque as ondas sonoras partem de um único ponto. O feixe de som, geralmente atravessa o corpo da égua transversalmente, e, conseqüentemente, a cérvix e o corpo do útero aparecerão em seção transversal e os cornos uterinos em seção longitudinal.

A habilidade para detectar pequenas diferenças na densidade do tecido depende da resolução de cada equipamento. Enquanto os aparelhos com alta frequência (5 a 7,5 MHz) fornecem imagens detalhadas dos órgãos próximos ao transdutor, os aparelhos de mais baixa frequência (3 a 3,5 MHz) apresentam maior poder de penetração. Dessa forma, transdutores de baixa frequência permitem a visualização de estruturas maiores e distantes do transdutor; por outro lado, os transdutores de alta frequência permitem a obtenção de informações minuciosas de estruturas que estão sendo examinadas próximas ao transdutor.

3. Avaliação ultra-sonográfica do útero

O exame ultra-sonográfico do útero de éguas consiste em avaliações da ecotextura do endométrio, das contrações uterinas e do diâmetro dos cornos uterinos. As alterações da ecotextura ultra-sonográfica do útero de éguas são resultantes, primariamente, de mudanças no grau de edema das pregas endometriais (GINTHER e PIERSON, 1984; HAYES et al., 1985; GINTHER, 1986), as quais são influenciadas pelos níveis circulantes de esteróides ovarianos (GINTHER, 1993). A ecotextura uterina visualizada pelo ultra-som é classificada por meio de sistema de escores

variando de 1 (mínimo) a 4 (máximo), com base no grau de edema das pregas endometriais (HAYES et al., 1985). A ecotextura do endométrio de éguas durante o diestro apresenta-se homogênea, com pouca definição das pregas endometriais. No entanto, quando o útero é visualizado em seção longitudinal, é possível identificar o lume uterino, que pode ser visto como uma linha branca, a qual é resultante de reflexão das paredes opostas do tecido endometrial (GINTHER, 1995). O diâmetro dos cornos uterinos é determinado por mensurações dos limites externos do endométrio (diâmetro do endométrio) e das superfícies opostas do perimétrio (diâmetro do miométrio), visualizados em seções transversais na tela do aparelho de ultra-sonografia (GASTAL, 1998).

A imagem ultra-sonográfica também tem sido usada como uma técnica não-invasiva e de resultados imediatos para a avaliação da contratilidade uterina de éguas (CROSS e GINTHER, 1988; GRIFFIN e GINTHER, 1990; GASTAL et al., 1998a,b). A contratilidade uterina determinada por meio da ultra-sonografia se baseia na avaliação contínua do corpo uterino, visualizado em uma seção longitudinal, durante um minuto. Para cada avaliação, a contratilidade uterina recebe um escore com base nos movimentos de vai-e-vem dos pontos de reflexão do endométrio ou dos movimentos de ondas observados na superfície ventral do corpo do útero (CROSS e GINTHER, 1987).

4. Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina

Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via canal vaginal tem sido recentemente descrita (GASTAL et al., 1998b). Resumidamente, essa técnica consiste na utilização de um tubo de teflon (1,0 mm de diâmetro externo e 70 cm de comprimento) que é inserido em uma agulha longa (56 cm de comprimento) de 17g,

sendo ambos introduzidos no canal guia metálico da agulha na extensão plástica do transdutor setorial para procedimento via transvaginal em grandes animais. Após introdução no canal vaginal, o transdutor é girado (90°) para a visualização do segmento posterior do corno uterino direito em seção longitudinal após adequada manipulação transretal contra a parede vaginal sob a face do transdutor. As paredes vaginal e uterina são perfuradas pela agulha, a qual é visualizada na tela do ultra-som dentro do lume uterino. A confirmação do posicionamento da ponta do tubo no lume uterino é realizada por meio de movimentos de vai-e-vem do tubo contra o endométrio (GASTAL et al., 1998b).

5. Aspectos gerais da transferência de embriões em eqüídeos

Desde o primeiro relato em 1972, por Oguri e Tsutsumi, o desenvolvimento de pesquisas e trabalhos na área de transferência de embriões tem sido intenso. No entanto, apesar dos esforços de muitos pesquisadores e técnicos, os avanços na TE em eqüinos têm sido lentos, quando comparados aos obtidos em bovinos, ovinos e suínos (RIERA, 2000). Tem sido sugerido que a principal razão pela qual a TE em eqüinos encontra-se em desvantagem, quando comparada às demais espécies domésticas, advém da falta de interesse da maioria das associações de raça em registrar produtos oriundos de TE. Além disso, a falta de métodos práticos de indução de superovulação tem tornado essa prática relativamente ineficiente na égua (RIERA, 2000).

Dentre as principais vantagens no emprego da TE em rebanhos eqüinos podem ser citados: a) incremento do número de produtos por doadora, resultando no melhoramento genético por influência genética da fêmea; b) obtenção de produtos de éguas em competições hípcas, permitindo, dessa forma, que éguas doadoras, de alta

performance atlética, sejam utilizadas mais intensamente em provas e competições; c) obtenção de produtos de éguas subfêrteis e idosas, viabilizando, assim, a utilização de éguas geneticamente superiores em contribuir para o progresso da raça; e d) obtenção de descendentes de éguas jovens, as quais estão ativamente produzindo oócitos, porém não se encontram fisiologicamente preparadas para levar uma gestação a termo (CARNEVALE, 1996; SQUIRES et al., 1985a; EAST et al., 1998).

5.1. Métodos atuais de transferência de embriões em éguas

Os embriões eqüinos têm sido transferidos, convencionalmente, por dois métodos: o cirúrgico, por incisão no flanco, e o não-cirúrgico via transcervical (SQUIRES et al., 1985a). O método não-cirúrgico tem sido o mais utilizado entre técnicos e pesquisadores (SQUIRES et al., 1999). Os resultados obtidos pelo método não-cirúrgico transcervical variam muito, de acordo com a técnica usada, observando-se taxas de prenhez entre 26% e 83% (IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b,c; IULIANO et al., 1985; MULLER e CUNAT, 1993; FLEURY, 1998). Diversos fatores têm sido relacionados com as variações nas taxas de prenhez obtidas por meio da transferência não-cirúrgica, tais como, local de deposição do embrião, provável expulsão do embrião do útero, possível introdução de contaminantes dentro do útero através da cérvix e manipulação excessiva da genitália durante a introdução do inovulador e, ou, pipeta contendo o embrião (HURTGEN e GRANJAM, 1979; IULIANO et al., 1985; LAGNEAUX e PALMER, 1989).

A transferência de embriões pela técnica cirúrgica, com incisão no flanco, tem originado taxas de prenhez entre 39 e 75% (IMEL et al., 1981; IULIANO et al., 1985; MULLER e CUNAT, 1993; SQUIRES et al., 1982a,b,c; SQUIRES e SEIDEL, 1995;

SQUIRES et al., 1999). Estudos em éguas que compararam os dois métodos de transferência mostraram maiores taxas de prenhez após transferência cirúrgica que a não-cirúrgica (IMEL, 1981; SQUIRES et al., 1982b; IULIANO et al., 1985). Somente 4 de 15 receptoras que receberam embriões por transferência não-cirúrgica, resultaram em prenhez aos 50 dias, comparadas com 8 de 15 receptoras com embriões transferidos cirurgicamente (IMEL, 1981). Similarmente, em estudo subsequente, a transferência cirúrgica resultou em altas taxas de prenhez (72%), quando comparada à transferência não-cirúrgica (45%, IULIANO et al., 1985). Recentemente, CARNEVALE et al. (2000) compararam os dois métodos de transferência de embriões (não-cirúrgica e cirúrgica) e obtiveram taxas de prenhez aos 12 dias de 47,4% (37/78) e 68,3% (381/558), e aos 50 dias de 39,7% (31/78) e 57,9% (323/558), respectivamente, porém, vale salientar que a qualidade dos embriões transferidos pela técnica não-cirúrgica foi inferior à dos embriões transferidos cirurgicamente. Embora o procedimento cirúrgico possa ser considerado por alguns técnicos como simples e de rotina, trata-se de uma intervenção cirúrgica de caráter invasivo a qual demanda pessoal altamente qualificado, tempo, equipamentos especiais e medicamentos (inclusive no pós-operatório), o que onera seus custos, tornando sua aplicação questionável em termos práticos.

MULLER e CUNAT (1993) desenvolveram técnica transvaginal para transferência de embriões em éguas. Por essa técnica, o embrião era depositado dentro de um tubo de teflon com 1,0 x 0,7 mm de diâmetro e 50 cm de comprimento, o qual era colocado dentro de uma agulha de 1,2 mm de diâmetro e 48 cm de comprimento. A transferência era realizada com o auxílio de palpação via transretal e de um tubo metálico (espéculo) vaginal. A taxa de prenhez de aproximadamente 38% obtida pela referida técnica foi abaixo do esperado. De acordo com os autores, o sucesso da técnica depende do local de deposição do embrião no lume uterino e a base da técnica

consistiria na confirmação da penetração da agulha e do tubo com o embrião no lume uterino, fato esse que não foi possível de ser confirmado em algumas tentativas.

6. Manipulação cervical e liberação de agentes uterocinéticos

A ação mecânica ou traumática no trato genital da fêmea pode ativar o processo de reação em cascata do ácido araquidônico e resultar na síntese e liberação de vários mediadores inflamatórios (HIGGINS e LEES, 1984), bem como de substâncias uterocinéticas, tais como, prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$; HURTGEN e GANJAM, 1979, BETTERIDGE et al., 1985; PASCOE et al., 1989) e ocitocina (HANDLER et al. 2001). A liberação de $PGF2\alpha$, após a manipulação cervical no processo de transferência não-cirúrgica de embriões, tem sido objeto de vários estudos (KASK et al., 1995; HANDLER et al., 2000). Entretanto, os resultados das pesquisas relacionadas ao efeito da manipulação uterina na liberação de $PGF2\alpha$ são contraditórios. KASK et al. (1995, 1997) obtiveram concentrações elevadas do metabólito da $PGF2\alpha$ (15-cetodihidro- $PGF2\alpha$) após transferência transcervical de embriões. Por outro lado, SIROIS et al. (1987) e HANDLER et al. (2000) não encontraram incremento na concentração dessa substância após transferência não-cirúrgica de embriões em éguas. A divergência dos resultados das pesquisas acima mencionadas, possivelmente, está relacionada à diferença dos protocolos experimentais adotados, com relação à coleta de sangue para dosagem de metabólitos da $PGF2\alpha$ (KASK et al., 1997). São necessários mais estudos comprovando o envolvimento da liberação de $PGF2\alpha$, durante a transferência não-cirúrgica de embriões, nas baixas taxas de prenhez. Entretanto, em função de as pesquisas mostrarem a liberação do metabólito de $PGF2\alpha$ em éguas submetidas à transferência transcervical, a possibilidade da $PGF2\alpha$ afetar o embrião e o ambiente

uterino não podem ser ignorados (KASK et al., 1997). Vários experimentos envolvendo diferentes tecidos e órgãos (KIRTON, 1973) sugerem que as prostaglandinas e seus metabólitos interagem em sistemas complexos de sinalização intracelular, associados a receptores de membranas e canais de íons. Outros estudos demonstraram que um dos mecanismos de ação estimulante das prostaglandinas na musculatura lisa do útero está relacionado com o aumento na concentração intracelular de cálcio (KAWARABAYASHI et al., 1997).

Além da liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ (HURTGEN e GANJAM, 1979, BETTERIDGE et al., 1985, PASCOE et al., 1989), a dilatação cervical e, ou, palpação do útero, em combinação com a inserção de objetos através da cérvix (ex: cateteres, pipetas, etc.), têm sido citados como responsáveis pela liberação de outro agente mioativo, a ocitocina (HANDLER et al., 2001). Esses autores detectaram aumento na concentração plasmática de ocitocina, após dilatação cervical provocada pela introdução do cateter usado em lavagem uterina para recuperação de embriões. O mecanismo de ação da ocitocina no estímulo da atividade uterina parece estar relacionado com a sua ação em estimular a liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ pelo endométrio (FLINT et al., 1986).

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1 - Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal

Neste experimento, foi testada a eficiência da inserção de agulha e de tubo de teflon em atingir o lume do útero, por meio de simulação “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal. Foram selecionadas 60 genitálias de éguas provenientes de frigorífico, após avaliação por meio de exames ultra-sonográficos. As genitálias com anormalidades macroscópicas, presença de líquido uterino ou vesículas embrionárias, foram excluídas do experimento. Foram realizadas 1.000 injeções, subdivididas em 10 sessões, cada uma com 100 aplicações. A técnica de injeção intra-uterina transvaginal utilizada foi adaptada (GASTAL et al., 1998b) para procedimento “in vitro”, usando-se um aparelho de ultra-sonografia em tempo real (Aloka SSD-500, Aloka, Wallingford, CT), equipado com transdutor setorial de 5,0 MHz, acoplado a uma extensão plástica para procedimentos transvaginais em grandes animais (GASTAL et al., 1998b). Foi utilizado um tubo de teflon (1,0 mm de diâmetro externo, 700 µm de diâmetro interno e 70 cm de comprimento). Após a inserção do tubo na agulha de 17 g (56 cm de comprimento; GASTAL et al., 1998b), ambos foram, então, introduzidos no canal guia metálico da agulha localizado na extensão plástica do

transdutor transvaginal (Figura 1). O conjunto constituído do transdutor dentro da extensão contendo a agulha e o tubo foram então inseridos via transvaginal até atingir o fôrnix vaginal da genitália estendida sobre uma mesa (Figura 2). Os cornos uterinos foram manipulados e o segmento posterior de um dos cornos foi então visualizado em corte transversal na tela do ultra-som. As paredes vaginal e uterina foram perfuradas pela agulha, até atingir o lume uterino (Figuras 3 e 4). A confirmação do posicionamento da ponta do tubo de teflon dentro do lume uterino pela imagem ultrasonográfica foi realizada por meio de movimentos de vai-e-vem do tubo contra o endométrio (GASTAL et al., 1998b). Todo o processo de simulação de injeção foi realizado em ambiente escuro, para melhor visualização das avaliações na tela do ultra-som, as quais foram devidamente anotadas em fichas apropriadas. A confirmação da eficiência da técnica foi verificada por meio da incisão, em cada corno uterino, realizada previamente ao procedimento, e comparada com os parâmetros observados e avaliados na tela do ultra-som (Figura 5).

O grau de certeza da inserção da agulha no lume uterino foi estimado com base em sistema de escores que variou de 1 a 4 (1=25%, 2=50%, 3=75% e 4=100%), sendo estimado pelo operador antes do conhecimento do resultado real (abertura da genitália). Para estimação do escore foi considerada a visualização da ponta da agulha e do tubo de teflon no monitor do ultra-som, os quais foram caracterizados pela identificação de dois pontos ecogênicos (agulha e tubo) no lume uterino (Figura 4E), e pelos movimentos de vai-e-vem do tubo contra o endométrio.

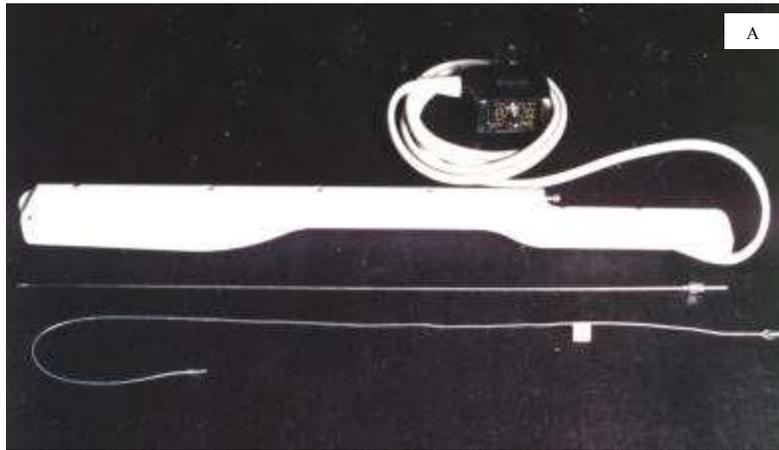


Figura 1 - Extensão plástica para procedimentos tranvaginais, agulha de 17 g e tubo de Teflon (Foto A). Visualização aproximada do tubo e agulha dentro do canal guia metálico da extensão plástica (Foto B). Ilustração de todo equipamento utilizado nas injeções (Foto C).

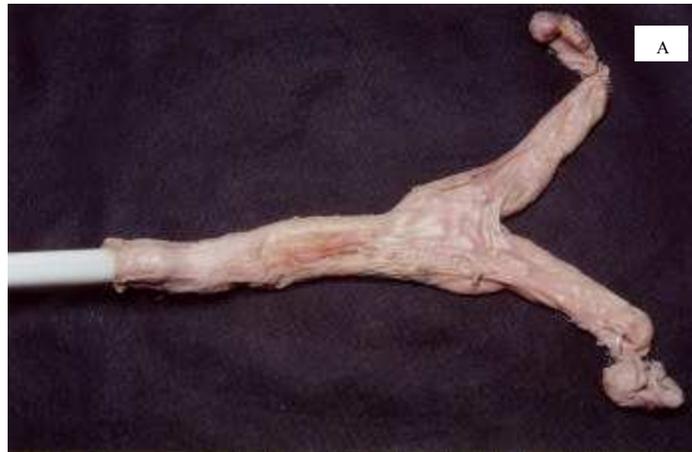


Figura 2 - Demonstração da introdução da extensão plástica no canal vaginal, contendo a agulha e o tubo, bem como a manipulação da genitália durante o procedimento da injeção intra-uterina. Inicialmente, a extensão é introduzida na posição vertical (Foto A) e, posteriormente, a mesma é girada em 90° (Foto B) e aproximada da porção posterior do corno uterino (Foto C).

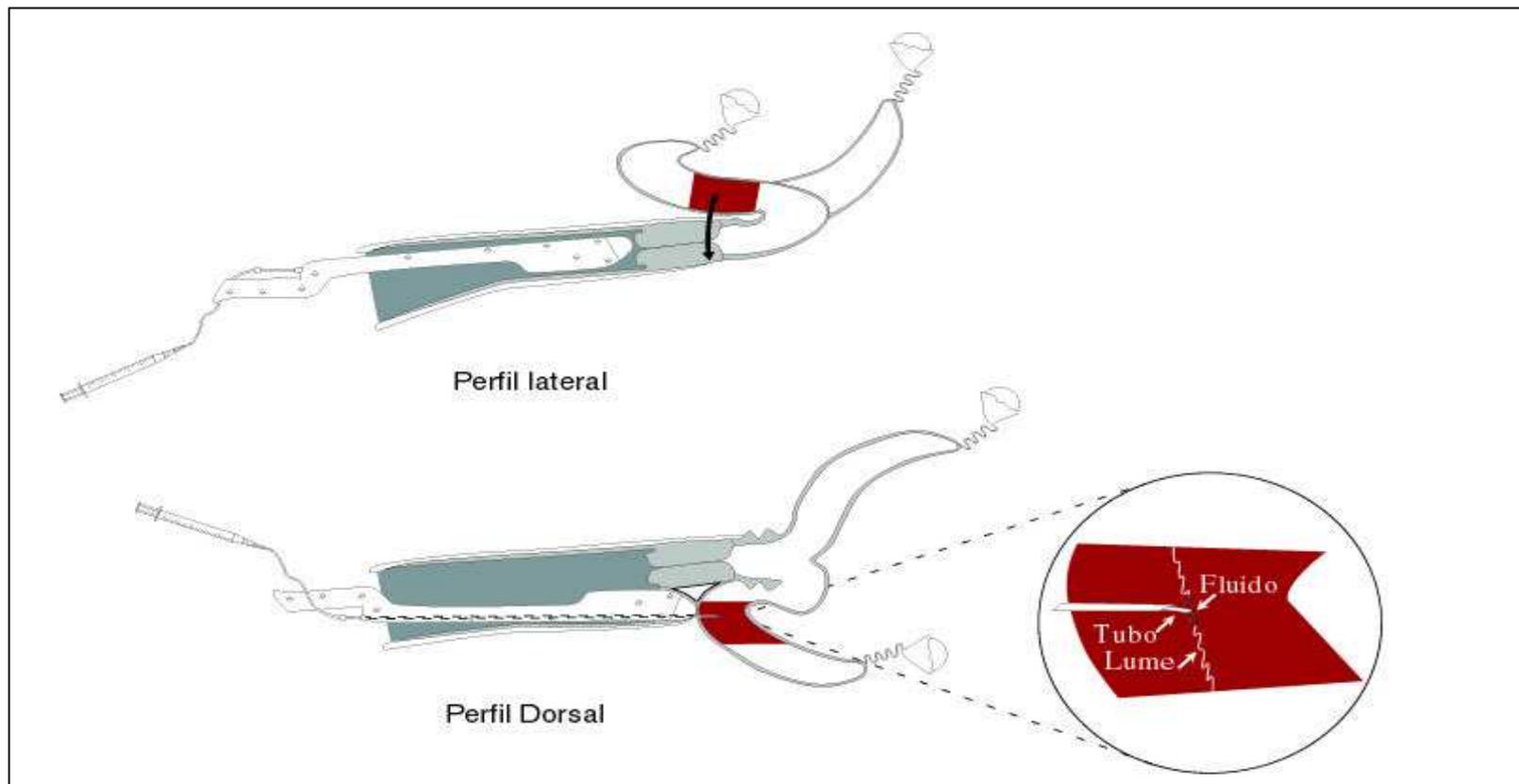


Figura 3 - Desenho esquemático da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal. O transdutor acoplado à extensão plástica para procedimentos transvaginais é introduzido na posição vertical até atingir o fônix vaginal (perfil lateral). O alvo é o segmento posterior do corno (mostrado em vermelho). O transdutor é girado no fônix vaginal do lado do corno, durante a manipulação final, antes da injeção (perfil dorsal). Adaptado de GASTAL et al., (1998b).

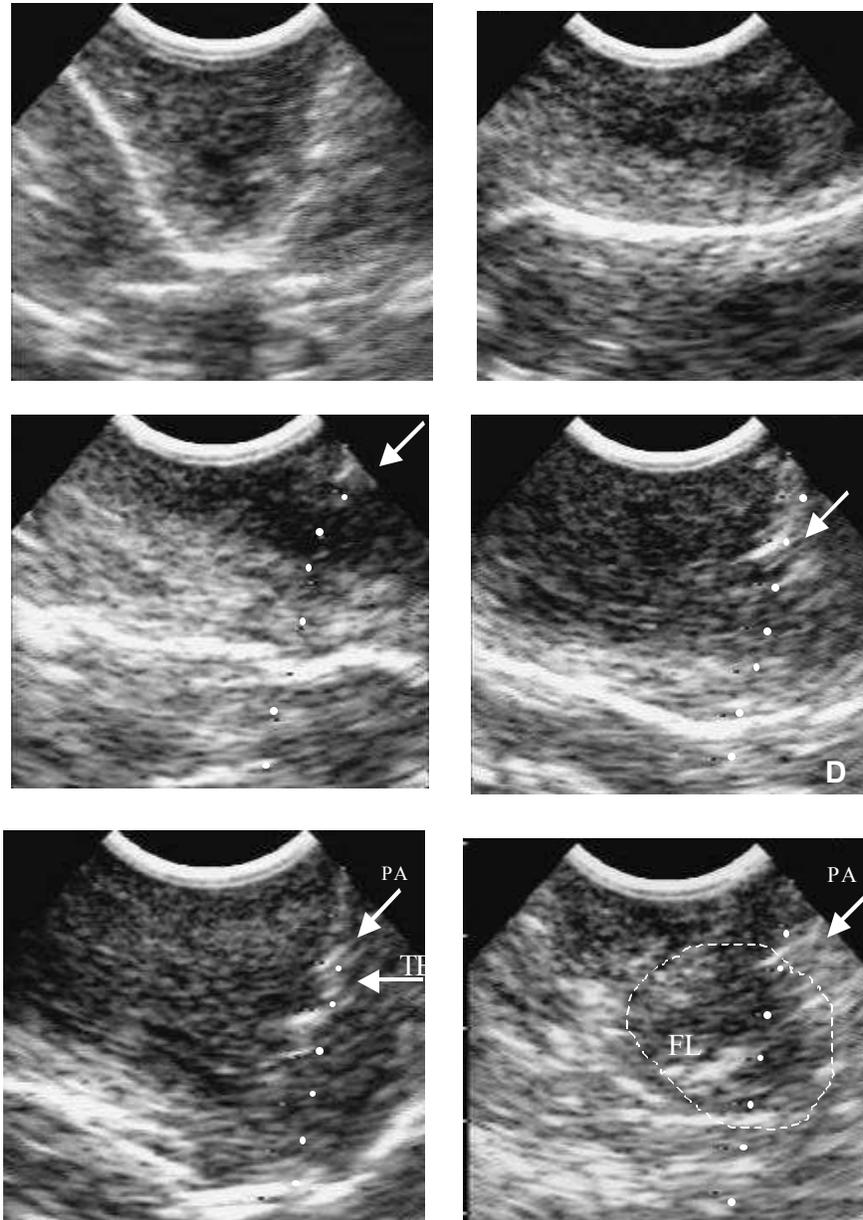


Figura 4 - Ultra-sonogramas da seqüência da injeção intra-uterina. A rota da agulha (pontos brancos) é indicada. Seção transversal do segmento caudal do corno uterino (Foto A), seção longitudinal (Foto B), ponta da agulha na parede uterina (Foto C), ponta da agulha no lume uterino (Foto D), ponta da agulha (PA) e do tubo (TB) no lume uterino (Foto E), ponta da agulha (PA) e do fluido (FL) no lume uterino (Foto F).

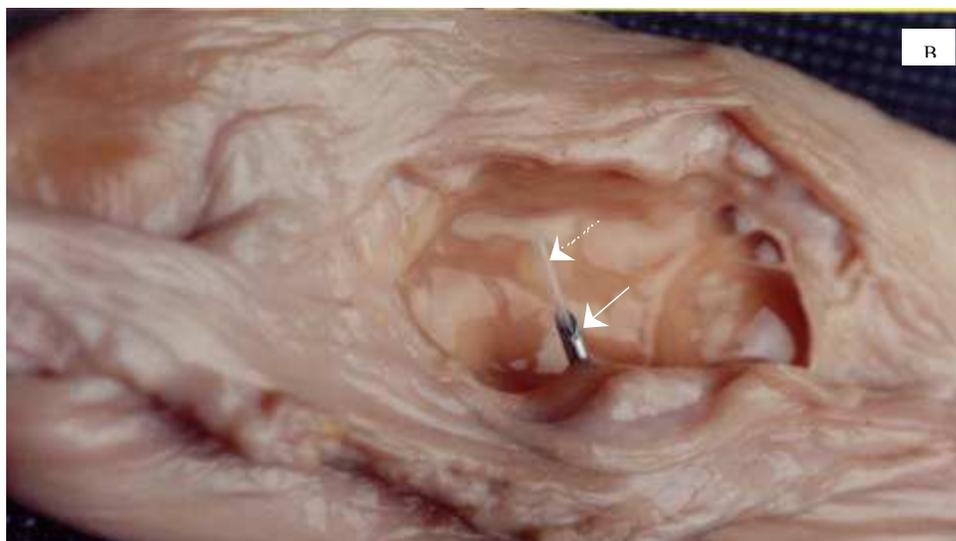
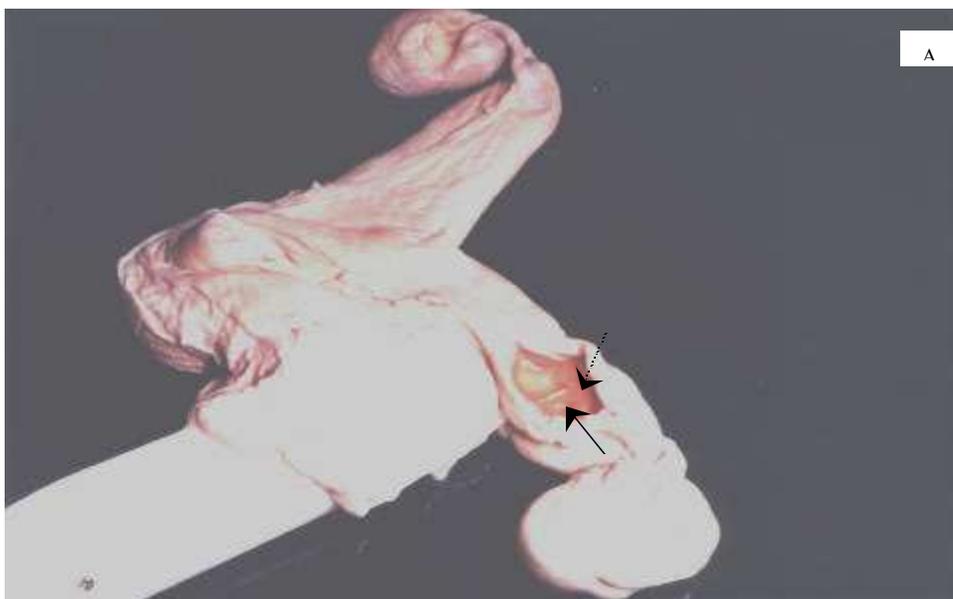


Figura 5 - Ilustração da agulha e do tubo no lume uterino, após incisão longitudinal do corno uterino (Foto A). Visualização aproximada da agulha () e do tubo () no lume uterino (Foto B).

Quando esses parâmetros foram claramente identificados pelo operador, a estimação do grau de certeza recebeu escore máximo. Registrou-se, também, o número de tentativas por injeção, o tempo gasto para cada injeção, bem como os resultados negativos, os quais foram assim descritos: a) agulha não passou o corno uterino; b) agulha ficou dentro das pregas endometriais; c) agulha ficou nas pregas opostas; e d) agulha ultrapassou o corno uterino. As injeções foram realizadas em ambos os cornos uterinos de cada genitália, sendo as mesmas utilizadas várias vezes, resultando em uma média de 30 injeções/genitália.

Antes do início do experimento, realizou-se um pré-experimento que consistiu na realização de simulação de injeções (n=1100), para capacitar o operador.

Análises estatísticas

Análise descritiva foi utilizada para a porcentagem das taxas de sucesso e insucesso da inserção da agulha e do tubo no lume uterino. Os resultados da porcentagem dos escores utilizados para cada injeção foram avaliados por meio do teste de Qui-quadrado. Os resultados de tempo gasto para cada injeção, do escore médio do grau de certeza e o número de tentativas para cada injeção entre as sessões foram analisados por ANOVA (SAS, 1996).

Experimento 2. Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de veículo (tinta guache)

O principal objetivo deste experimento foi determinar a quantidade mínima de fluido injetado no lume uterino de genitálias oriundas de frigorífico (n=40),

capaz de ser visualizada na tela do ultra-som durante e após a injeção. Para determinar a substância ideal para ser visualizada na tela do ultra-som e detectada no lume do útero aberto, foram testadas a tinta nanquim e a tinta guache. A tinta nanquim foi descartada, pelo fato de alterar a tonalidade do endométrio, não permitindo a reutilização do mesmo corno uterino para posteriores injeções, limitando, dessa forma, o número de injeções por corno, o que resultaria na utilização de maior número de genitálias necessárias para a realização do experimento. Dentre as várias tonalidades de tinta guache testadas, a cor branca foi a mais apropriada, por ser visualizada na tela do ultra-som e por não alterar a coloração do endométrio após a remoção da mesma com papel toalha, após incisão no corno uterino. Este fato permitiu a reutilização da mesma genitália para várias injeções, viabilizando, assim, maior número de injeções para o experimento.

Dez sessões foram realizadas, sendo 50 injeções na primeira sessão, e 60 injeções nas demais sessões. Utilizou-se como veículo a tinta guache de cor branca. Foram testados dois volumes do veículo: 1) 0,5 mL (n=25-30 injeções/sessão) e 2) 1,0 mL (n=25-30 injeções/sessão). Em cada corno uterino, foram feitas várias injeções, alternando-se a quantidade de volume entre as injeções (0,5 e 1,0 mL). Para se evitar a passagem de líquido de um corno para o outro, cada corno uterino foi transfixado na sua base com fio de algodão antes das injeções. A detecção do líquido no lume uterino foi confirmada na tela do ultra-som pela visualização do fluxo durante a injeção (jato) e pela formação de uma imagem escura (saculação), próximo à ponta da agulha após a injeção (Figura 4F). A confirmação “in situ” do sucesso da técnica foi realizada após incisão longitudinal próximo ao local do corno uterino injetado (Figura 6).

Para avaliação da técnica ultra-sonográfica de injeção de veículo, foram registradas as taxas de sucesso e insucesso de visualização do jato durante a injeção e do

fluido na forma de saculação (imagem escura) após a injeção, para ambos os volumes de veículo injetados. Em caso de injeções com insucesso, estas foram classificadas similamente ao Experimento 1.

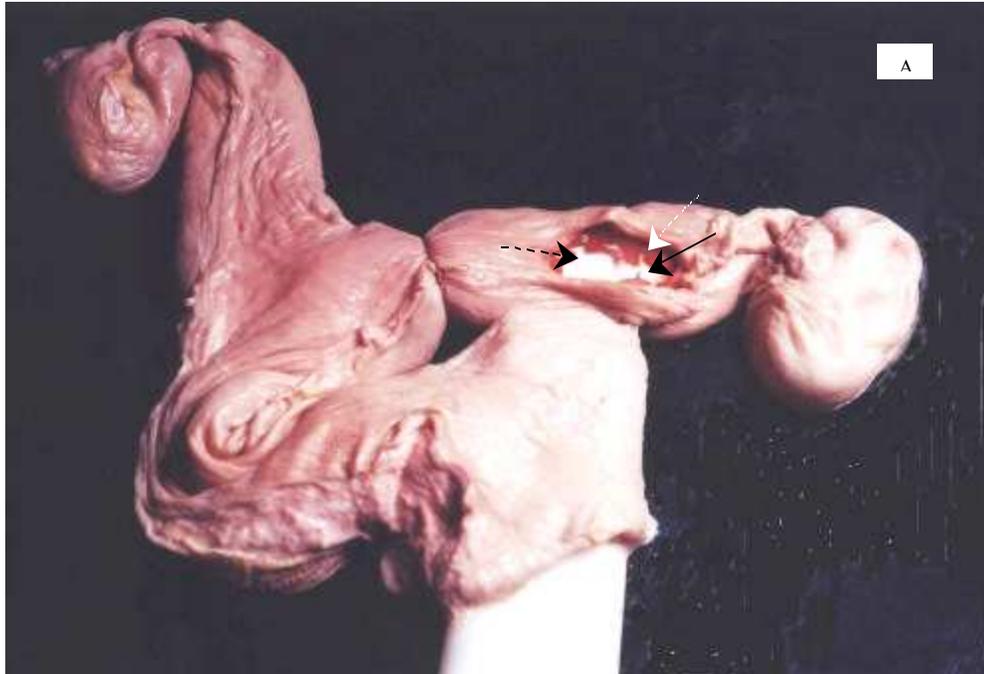


Figura 6 - Ilustração da agulha, do tubo e do fluido injetado no lume uterino, após incisão longitudinal do corno uterino (Foto A). Vista aproximada da agulha, do tubo e do fluido no lume uterino (Foto B). Agulha (), Tubo (), e Fluido ().

Análises estatísticas

Análise descritiva foi utilizada para a porcentagem das taxas de sucesso e insucesso da injeção intra-uterina pela técnica ultra-sonográfica para os dois volumes do veículo. Os resultados do jato (visualização durante a injeção) e a visualização da saculação após a injeção, para os dois volumes do veículo e entre sessões, foram avaliados por meio do teste de Qui-quadrado.

Experimento 3 - Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de oócitos

A eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro” na deposição de oócitos no lume uterino foi estudada neste experimento. Os oócitos utilizados para as injeções foram obtidos de folículos procedentes de ovários de genitálias de matadouro e, ou, aspirados de folículos de éguas “in vivo” (GASTAL et al., 1997) oriundos de outro experimento. A técnica de obtenção dos oócitos “in vitro” consistiu na aspiração de folículos ≥ 6 mm de diâmetro com agulha de 18 g acoplada à seringa de 10 ou 20 mL. Após a total aspiração do líquido folicular, foi realizada uma incisão com bisturi no folículo e raspagem da parede folicular com o auxílio de uma cureta metálica para extração de possíveis oócitos aderidos à parede folicular. Após esse procedimento, a parede interna do folículo foi cuidadosamente lavada com solução fisiológica. O fluido e o lavado folicular foram colocados em placa de petri e então

levados ao microscópio estereoscópio para a procura de oócitos. Os oócitos encontrados foram fixados em solução de formol-salina tamponada para posterior utilização nas injeções (n=60).

Cada injeção foi realizada com um pool de quatro a cinco oócitos, os quais foram colocados no tubo de teflon junto com solução salina e separados por colunas alternadas de ar e solução (Figura 7). Pelo fato de o menor volume (0,5 mL) de fluido injetado ter produzido boa visualização após a injeção, no Experimento 2, este volume foi utilizado para realizar as injeções com os oócitos, porque esse é o volume comumente utilizado em TE. O volume selecionado (0,5 mL) foi colocado numa seringa de 1,0 mL acoplada ao tubo de teflon contendo os oócitos. Antes do procedimento da injeção dos oócitos no lume uterino, inseriu-se, um cateter de Foley via transcervical no útero estendido sobre uma mesa. A ponta do cateter foi posicionada logo após a bifurcação em direção ao corno uterino a ser injetado. Após a inserção do cateter, o balão do mesmo foi inflado com 40 – 45 cc de ar. O cateter foi então conectado ao circuito (Figura 8) convencionalmente usado em lavagem para recuperação de embriões (SQUIRES et al., 1985a). Para melhor controle do líquido infundido, cada corno foi transfixado com fio de algodão na sua porção posterior antes de cada injeção (Figura 8). Após a injeção, o orifício da inserção da agulha foi fechado com o auxílio de uma pinça hemostática, para se evitar possível refluxo do fluido. Foram realizadas duas lavagens do corno uterino após cada injeção, com cada lavagem contendo de 60 a 150 mL de solução fisiológica a 0,9%. O volume infundido variou com relação ao tamanho do corno uterino utilizado. O lavado uterino foi colocado em placa de petri, e imediatamente rastreado em microscópio estereoscópio para identificação dos oócitos recuperados. Procedimento semelhante foi realizado para cada corno uterino, fazendo-se, assim, duas injeções e lavagens por genitália.

Foram registradas as taxas de sucesso e insucesso de recuperação de pelo menos um oócito, o número de oócitos injetados em cada injeção, o volume infundido e recuperado no primeiro e no segundo lavado e o número de oócitos recuperados em cada um dos lavados.

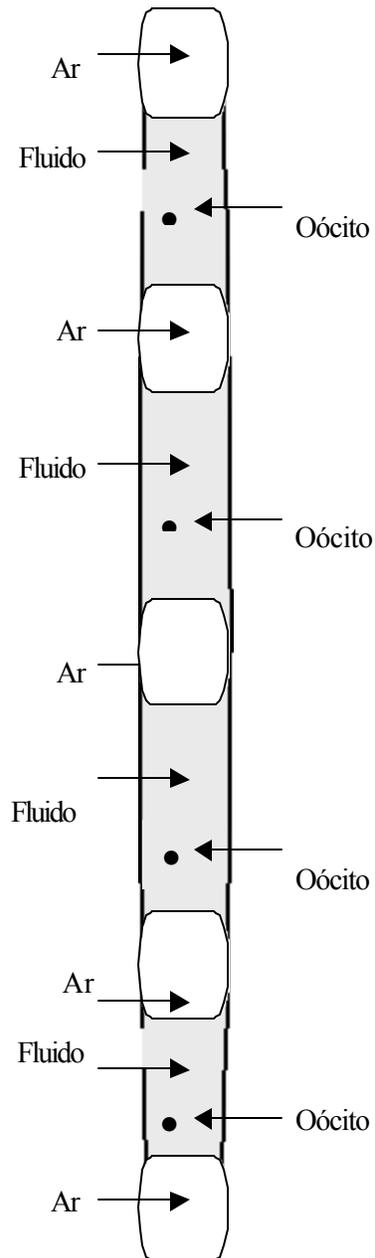


Figura 7 - Desenho esquemático da disposição das colunas de ar, solução fisiológica e oócitos dentro do tubo de

teflon (1,0 mm de diâmetro e 70 cm de comprimento).

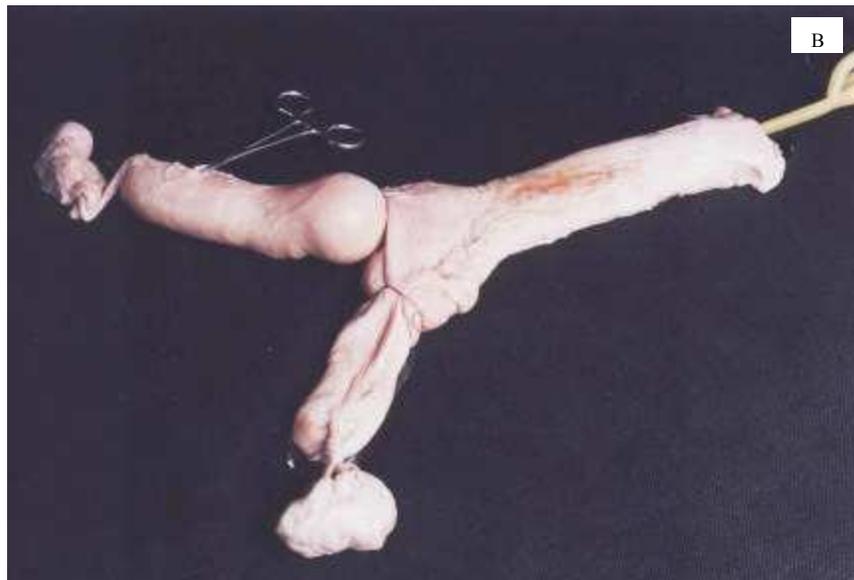
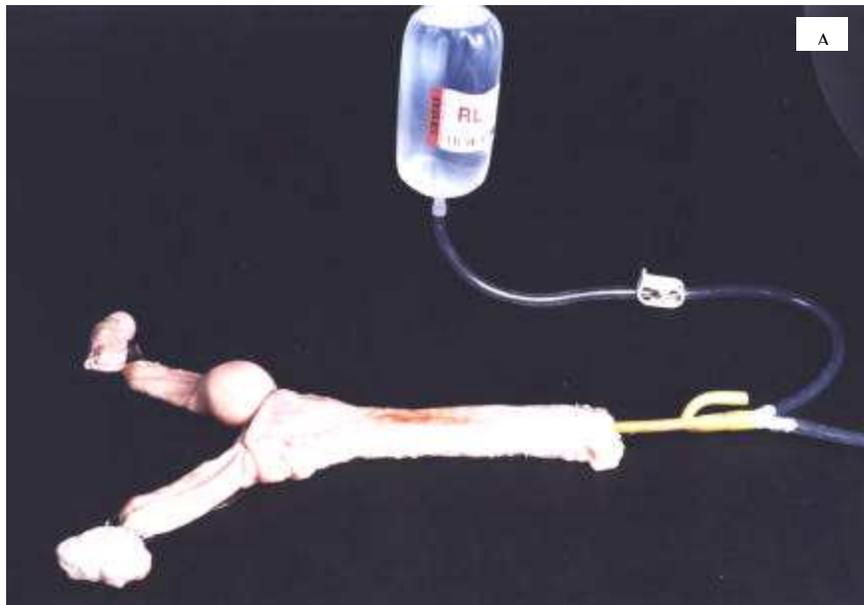


Figura 8 - Ilustração da genitália com o cateter de Foley para a recuperação dos oócitos após injeção intra-uterina. Cateter com o balão inflado (30-40 cc) na base do corno injetado (Foto A). Como uterino direito repleto de solução salina, com orifício da agulha fechado com auxílio de uma pinça hemostática (Foto B).

Análises estatísticas

Análise descritiva foi utilizada para a porcentagem das taxas de sucesso e insucesso de injeção de oócitos pela técnica ultra-sonográfica via transvaginal “in vitro”.

A quantidade de oócitos recuperados no primeiro e no segundo lavado foi analisada por ANOVA (SAS, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal

A taxa de sucesso da inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”, foi de 87,9% (879/1000). Não foi observada diferença nas taxas de sucesso entre as 10 sessões realizadas (Tabela 1). Este resultado sugere a não influência do operador no decorrer das sessões experimentais. Este fato pode ter sido devido à experiência prévia que o operador adquiriu nas 1100 injeções realizadas antes do início do experimento.

A relação entre o número médio de tentativas realizadas em cada injeção e as taxas de sucesso e insucesso são mostradas na Tabela 2. Apesar de ter havido maior número de injeções com sucesso após uma única tentativa, o teste do Qui-quadrado revelou uma tendência ($P < 0,06$) de o número de tentativas estar relacionado com o resultado de sucesso (menos tentativas) e o insucesso (mais tentativas). A relação entre o número de tentativas/injeção, que resultou em sucesso ou insucesso, foi similar, quando se realizou a análise entre sessões (Figura 9). Dessa forma, verificou-se que as sessões não influenciaram no número de tentativas realizadas sobre o resultado da injeção.

Tabela 1 - Frequência de sucesso e insucesso para cada uma das sessões de inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”

Sessão	Sucesso	Insucesso	Total
1	86	14	100
2	86	14	100
3	88	12	100
4	86	14	100
5	83	17	100
6	91	9	100
7	88	12	100
8	89	11	100
9	92	8	100
10	90	10	100
Total	879 (87,9%)	121 (12,1%)	1000 (100%)

Tabela 2 - Taxas de sucesso e insucesso relacionadas com o número de tentativas de inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”

Resultado	Número de tentativas		Total
	1	>2	
Sucesso	851 (88,3%)	28 (77,8%)	879 (87,9%)
Insucesso	113 (11,7%)	8 (22,2%)	121 (12,1%)

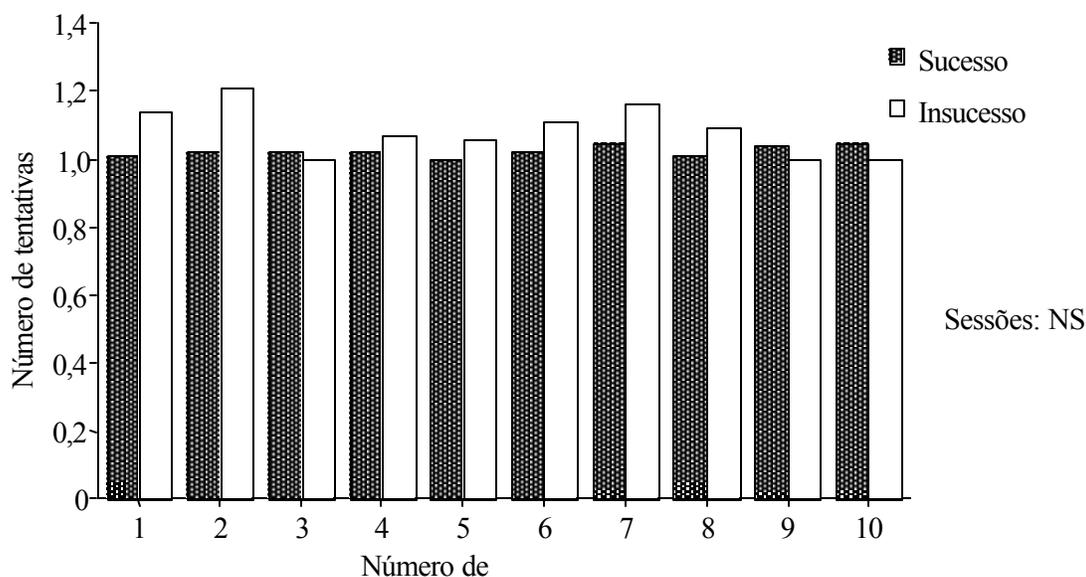


Figura 9 - Número de tentativas de inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, nas taxas de sucesso e insucesso, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”. NS= não-significativo.

As freqüências de escores atribuídos para determinação do grau de certeza e a relação com as taxas de sucesso/insucesso nas injeções intra-uterinas são mostradas na Tabela 3. As médias dos escores que resultaram em sucesso ($4,0 \pm 0,0$) e insucesso ($3,7 \pm 0,0$) foram diferentes ($P < 0,001$). O escore 1 (não diagnosticado) foi inexistente no presente estudo. Foi observada, ainda, maior freqüência de escores 4 nos resultados de sucesso (89,7%; Tabela 3). Assim sendo, verificou-se que o maior grau de certeza (escore 4) resultou em maior número de injeções com sucesso. Por outro lado, quando o grau de certeza foi baixo ou intermediário (escores 2 e 3), maior incidência de insucesso foi observada. A relação entre a freqüência de escores/injeção que resultou em sucesso ou insucesso, foi similar, quando se realizou a análise entre sessões. Dessa forma, o desenvolvimento adequado de padronização visual do grau de certeza por meio

de uma escala de escores, pode ser de muito valor para predizer a eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal.

Tabela 3 - Taxas de sucesso e insucesso e escores estimados na inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”

Resultados	Escore		
	2	3	4
Sucesso	-	45 (68,2%) ^a	834 (89,7%) ^a
Insucesso	4 (100%)	21 (31,9%) ^b	96 (10,3%) ^b
Total	4	66	930

Valores com letras distintas na mesma coluna foram diferentes (P<0,001).

O tempo médio necessário para cada injeção foi $21,7 \pm 0,3$ seg. Diferença estatística (P<0,001) foi observada entre o tempo médio gasto nas injeções com sucesso ($21,0 \pm 0,3$ seg) versus insucesso ($26,0 \pm 1,2$ seg). Na Tabela 4, podem ser vistos os tempos médios das injeções com sucesso e insucesso, os quais não apresentaram diferenças entre sessões. Esses resultados sugerem que, provavelmente, durante as injeções com insucesso, o operador, possivelmente teve maior grau de dificuldade em realizar a injeção, o que resultou em maior tempo gasto durante o procedimento (Tabela 4).

Com relação aos resultados negativos que resultaram em insucesso (12,1%), verificou-se que em 37,2% (45/121) das vezes a agulha não passou o corno uterino; em 26,4% (32/121), a agulha ficou dentro das pregas endometriais; em 15,7% (19/121), a agulha ficou nas pregas endometriais opostas; e em 20,7% (25/121) a agulha ultrapassou todo o corno uterino. As freqüências das razões de insucesso encontram-se classificadas na Tabela 5.

Tabela 4 - Tempo médio gasto (seg) nas taxas de sucesso e insucesso da inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro” em cada sessão

Sessão	Tempo (seg)	
	Sucesso	Insucesso
1	17,8	29,6
2	23,0	30,2
3	21,1	24,9
4	22,5	31,6
5	19,2	25,3
6	20,0	24,2
7	21,3	22,4
8	20,9	31,6
9	21,0	14,4
10	23,5	25,4
Média	21,0	26,0

Tabela 5 - Razões encontradas nas taxas de insucesso da inserção da agulha e do tubo de teflon no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”

Razão	Frequência
Não passou (NP)	45 (37,2%)
Pregas (Pr)	32 (26,4%)
Pregas opostas (PO)	19 (15,7%)
Passou o corno (PC)	25 (20,7%)
Total	121 (100%)

A alta taxa de sucesso (88%) obtida neste experimento “in vitro” sugere que o procedimento de inserção de agulha e de tubo de teflon no lume do útero, por meio da

técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal, é de fácil execução, o que concorda com os resultados de GASTAL et al. (1998b), os quais obtiveram sucesso de 96%, e necessitaram em média menos de um minuto para realizar a técnica “in vivo”.

Faz-se necessário salientar que a diferença de 10% para as taxas de sucesso entre o presente estudo e o de GASTAL et al. (1998b) pode ter decorrido do fato de um experimento ter sido realizado “in vitro” e outro “in vivo”. Neste estudo foram utilizadas genitálias de éguas post-mortem em diferentes fases do ciclo estral e em anestro. Já no estudo de GASTAL et al. (1998b), as éguas injetadas estavam em diestro (12º dia pós-ovulação) e apresentavam certo grau de turgidez nos cornos uterinos, o que provavelmente tenha facilitado o procedimento da injeção. Sendo assim, o fato de se ter utilizado genitálias congeladas e descongeladas, bem como oriundas de animais com diferentes status reprodutivos, deve ser considerado na interpretação dos resultados do presente trabalho.

Em função dos escassos estudos sobre essa técnica tanto “in vivo” como “in vitro”, os resultados oriundos deste experimento fornecem subsídios para que pesquisas “in vivo” sejam desenvolvidas, a fim de aprimorar o desenvolvimento desta técnica.

Experimento 2 - Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de veículo (tinta guache)

A taxa de sucesso (89,8%, 530/590) da injeção de fluido no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”, foi similar à obtida no Experimento 1. Resultados similares foram obtidos, quando foram comparadas as porcentagens de sucesso e insucesso para cada volume injetado: 0,5 mL (sucesso 88,5%, 261/295; insucesso 11,5%, 34/295), e 1,0 mL (sucesso 91,2%, 269/295; insucesso 8,8%, 26/295; Figura 10). Com base neste resultado, pode-se sugerir que os

volumes testados não interferiram nas taxas de sucesso e insucesso da injeção de fluido no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”.

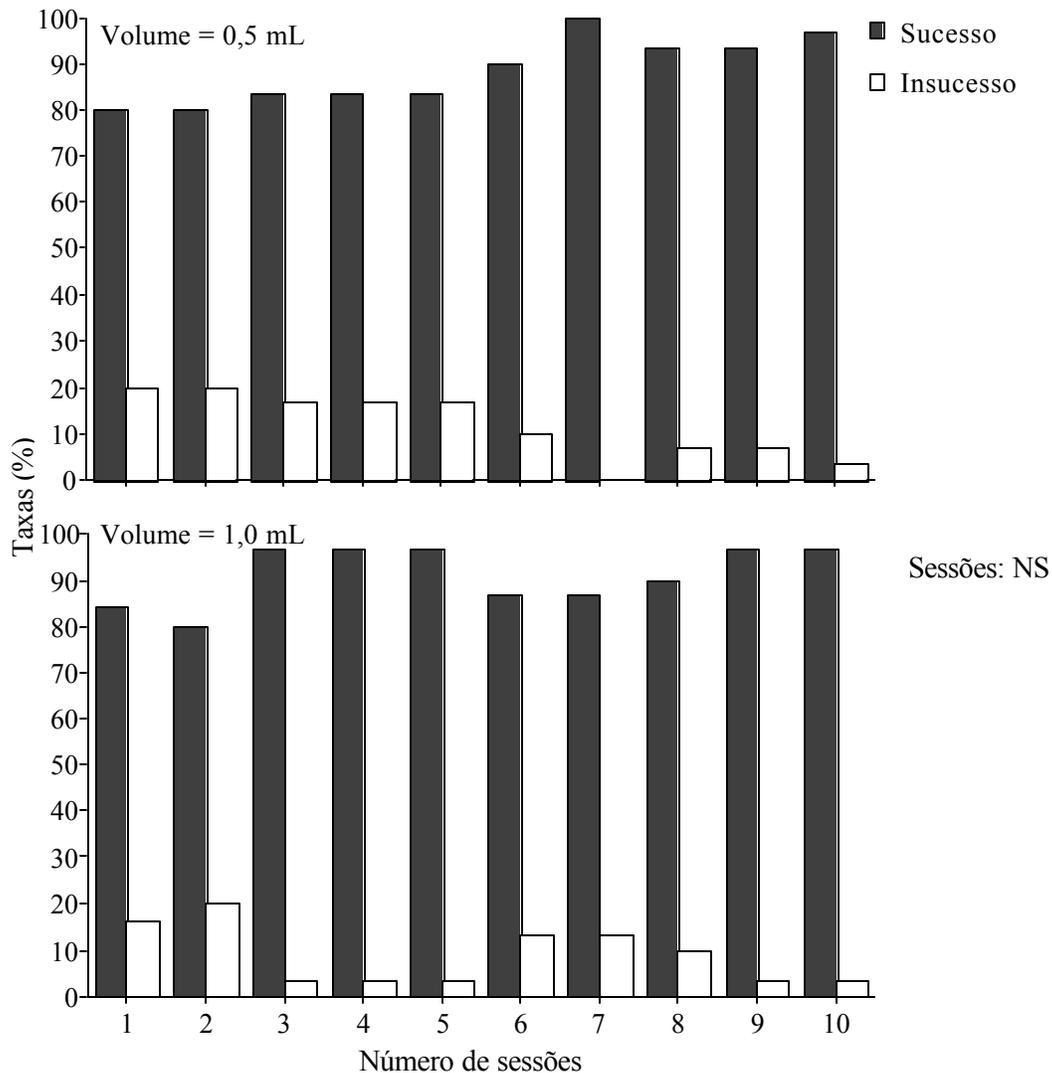


Figura 10 - Taxas de sucesso e insucesso para as duas quantidades de volume de líquido injetado no lume uterino, por meio da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”. NS=não-significativo.

A detecção de líquido durante a injeção, que foi determinada pela visualização do jato, não apresentou diferença estatística, quando foram comparados os dois volumes injetados. Quando se injetou 1,0 mL de veículo, houve maior relação ($P < 0,003$) entre a visualização do jato e o resultado de sucesso na injeção. Dessa forma, pode-se concluir

que o maior volume de fluido injetado propiciou melhor monitoramento na tela do ultra-som durante a injeção. Isto pode ser explicado, uma vez que maior quantidade de fluido a ser injetado proporciona maior tempo para identificá-lo no monitor do ultra-som durante a injeção.

A visualização do líquido injetado no corno uterino após o procedimento não foi diferente ($P>0,06$), quando comparados os dois volumes de injeção. O volume de 0,5 mL foi de mais fácil ($P<0,01$) visualização após a injeção, quando esta resultou em sucessos. Entretanto, quando foi injetado 1,0 mL de veículo, este não foi facilmente visualizado na tela do ultra-som após a injeção. Acredita-se que o pequeno volume de líquido (0,5 mL) apresente maior dificuldade em se difundir pelo lume do útero, resultando em pequena coleção de fluido, a qual pode ser visualizada como uma saculação (imagem preta) na tela do ultra-som. Por outro lado, o volume de 1,0 mL, pareceu se dissipar mais rapidamente ao longo do corno, o que, provavelmente, impediu sua posterior visualização no monitor do aparelho de ultra-sonografia.

Experimento 3 - Desenvolvimento “in vitro” da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina de oócitos

As taxas de sucesso e insucesso da injeção intra-uterina de oócitos, por meio da técnica ultra-sonográfica via transvaginal “in vitro”, nas diferentes sessões estão ilustradas na Figura 11. A taxa de sucesso média (75%; 45/60) foi porcentualmente menor, quando comparada aos experimentos anteriores. No entanto, faz-se necessário salientar que a taxa de sucesso neste experimento baseou-se na recuperação de pelo menos um oócito, após duas lavagens uterinas e não no sucesso em depositar os oócitos de forma adequada no lume uterino. Dessa forma, provavelmente, outros fatores envolvidos na recuperação dos oócitos podem ter contribuído com os resultados de sucesso neste experimento.

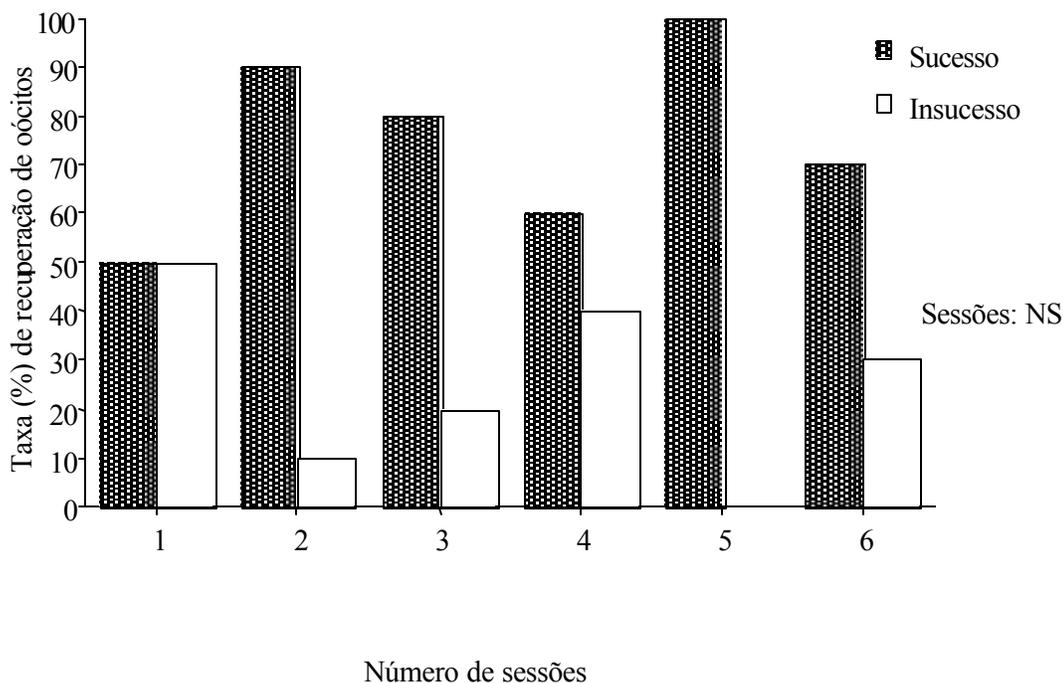


Figura 11 - Taxas de sucesso e insucesso da injeção intrauterina de oócitos por meio da técnica ultra-sonográfica via transvaginal “in vitro”. NS= não-significativo.

Para a primeira e a segunda lavagens uterinas, foram infundidos em média $101,6 \pm 23,1$ mL e $91,9 \pm 32,1$ mL, sendo menor quantidade para o segundo lavado, provavelmente, pela presença de líquido residual do primeiro lavado. Foram recuperados $95,0 \pm 22,2$ mL (93%) e $87,4 \pm 30,5$ mL (95%), para o primeiro e o segundo lavado, respectivamente. Foram injetados em média $4,9 \pm 0,3$ oócitos por injeção, com recuperação de $2,1 \pm 1,5$ (73,3%) e $0,1 \pm 0,4$ (6,7%) oócitos no primeiro e segundo lavados, respectivamente (Figura 12). A taxa de recuperação de oócitos diferiu significativamente entre lavados. No primeiro lavado foram encontrados um, dois, três e quatro oócitos em 8,3%, 16,7%, 30,0% e 15,0% das vezes, respectivamente. Já para o segundo lavado, foi recuperado um e três oócitos em 5,0% e 1,7% das vezes, respectivamente.

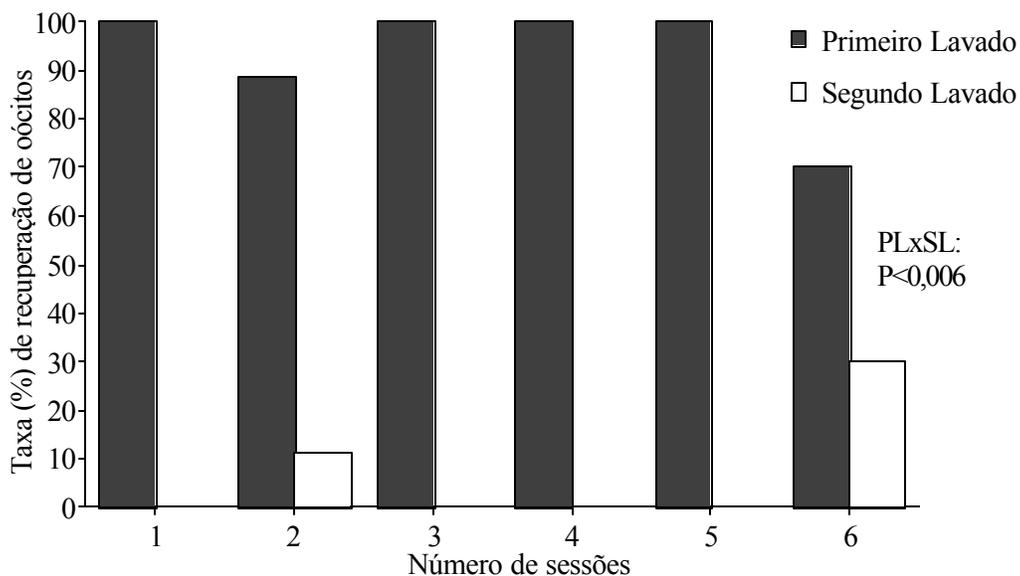


Figura 12 - Taxa de recuperação de pelo menos um oócito em cada lavado/sessão com a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”. PL=primeiro lavado, SL=segundo lavado, NS= não-significativo.

Os resultados deste experimento sugerem, mais uma vez, que a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro” é facilmente executável, e apresenta bons resultados.

O principal objetivo das pesquisas com o intuito de testar métodos alternativos para TE não-cirúrgica é desenvolver técnicas que evitem ou minimizem o manuseio e a dilatação da cérvix durante o procedimento. A manipulação excessiva do sistema genital da fêmea, durante transferência não-cirúrgica de embriões (SQUIRES et al., 1985a; KASK et al., 1997; SIROIS et al., 1987) tem sido sugerida estar relacionada com a liberação de prostaglandina F₂α (PGF₂α) e ocitocina (HANDLER et al., 2001). Apesar da inexistência de estudos específicos em éguas demonstrando o aumento da PGF₂α, dada a manipulação excessiva da cérvix durante a transferência não-cirúrgica,

a função biológica desse hormônio em estimular a musculatura lisa do útero, possivelmente, seja um dos fatores responsáveis pelas baixas e inconstantes taxas de prenhez após a transferência não-cirúrgica de embriões em éguas (SQUIRES et al., 1985b; KASK et al., 1997; SIROIS et al., 1987).

Vale ressaltar que, na adaptação da referida técnica para TE, deve-se considerar a idade (dia de coleta) do embrião, visto que pode existir uma variação muito ampla no diâmetro do embrião equino (ex. 132 a 5.500 μm) a ser transferido (SQUIRES et al., 1989; VANDERWALL, 1996; FLEURY, 1998; HUHTINEN, 1999). Este fato irá interferir definitivamente no diâmetro do tubo e da agulha a serem utilizados. Neste estudo, o diâmetro dos tubos utilizados variaram de 100 a 700 μm , os quais, provavelmente, poderão ser usados para alguns embriões, mas não para todos os embriões colhidos entre os dias 6 e 8 pós-ovulação.

Como visto anteriormente, esta técnica pode se tornar mais uma alternativa para a transferência de embriões, pelo fato de evitar manipulações cervicais, liberação de $\text{PGF2}\alpha$, infecção uterina e refluxo de embriões, comumente suspeitos de interferirem negativamente nas taxas de prenhez, no ato da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas (SQUIRES et al., 1982a,b, 1999).

Sendo assim, o presente trabalho demonstrou que essa técnica tem potencial promissor para ser adaptada para procedimentos “in vivo”, como, por exemplo, em transferência de embriões em espécies como a equina e a bovina.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, com taxas de sucesso variando de 75,0% a 89,8%, pode-se sugerir que a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro” é um procedimento viável e que o reduzido número de tentativas/injeção e o tempo médio gasto para a execução da técnica podem representar um papel importante para que esse procedimento seja adaptado para possível utilização como método alternativo de transferência de embriões em éguas.

A técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal “in vitro”, desenvolvida no presente estudo, pode-se tornar mais eficiente, caso adote um sistema de avaliação do grau de certeza da visualização da agulha, do tubo e do líquido na tela do ultra-som, no momento e após a injeção.

A principal vantagem da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal é o aspecto da ausência de manipulação e dilatação cervical, além de tratar-se de um procedimento rápido.

Adicionalmente, os resultados aqui apresentados também demonstraram a importância do volume a ser injetado e sua visualização na tela do ultra-som durante e após a injeção. Este fator pode representar um papel fundamental, na avaliação do grau

de certeza do sucesso da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal.

Finalmente, estudos específicos “in vivo” fazem-se necessários para validação desta técnica para transferência de embriões em animais domésticos, visto que se trata de um procedimento rápido, pouco invasivo, com reduzida manipulação do útero e com quase ou nenhuma manipulação cervical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, B.A., LITTLE, T.V., WEBER, J.A., WOOD, G.L. Survival of Day-4 embryos from young, normal and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J. Reprod. Fert.**, 85: 187-209, 1989.
- BERGFELT, D.R., BROGLIATTI, G.M., ADAMS, G.P. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, 50:15-25, 1998.
- BETTERIDGE, K.J., RENARD, A., GOFF, A.K. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. **Equine Vet. J.**, 3 (Suppl):25-33, 1985.
- BRUCK, I., RAUN, K., SYNNESTVEDT, B., GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Vet. J.**; 24:58-59, 1992.
- BUCKRELL, B.C. Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, 29:71, 1988.
- CARNEVALE, E.M. Gamete Intrafallopian Transfer. In: Squires E.L. (ed) **Vet. Clin. North Am., Equine practice: Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology**, 12(1):47-60, 1996.
- CARNEVALE, E.M., e GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **J. Equine Vet. Sci.**, 13(6):331-333, 1993.
- CARNEVALE, E.M., McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L. Ultrasonographic characteristics of preovulatory follicles preceding and during ovulation in mares. **J. Equine Vet. Sci.**, 8:428-431, 1988.
- CARNEVALE, E.M., RAMIREZ R.J., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A., VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, 54:965-979, 2000.

- CARTEE, R.E. Ultrasonography: a new diagnostic technique for veterinary medicine. **Vet. Med. Sm. Anim. Clin.**, 75:1524-1533, 1980.
- COOK, N.L., SQUIRES, E.L., RAY, B.S., JASKO, D.J. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. **Equine Vet. Sci.**, (Suppl. 15): 71-74, 1993.
- CROSS, D.T., e GINTHER, O.J. The effect of estrogen, progesterone and prostaglandin F₂α on uterine contractions in seasonally anovulatory mares. **Dom. Anim. Endocr.** 4:271-278, 1987.
- CROSS, D.T., e GINTHER, O.J. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. **J. Anim. Sci.**, 66:250-254, 1988.
- EAST, L.M., VAN SAUN, R.J., VANDERWALL, D.K. Equine Embryo Transfer. Part 1: Donor and Recipient Selection and Preparation. **Equine Practice**, 20 (8): 16-20, 1998.
- FLEURY, J.J. Transferência não cirúrgica de embriões equinos colhidos no oitavo dia pós-ovulação. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, 26 (Supl. 1): 266, 1998.
- FLINT, A.P.F., SHELDRIK, E.L., THEODOSIS, D.T., WOODING, F.B.P. Ovarian peptides: role of luteal oxytocin in the control of estrous cyclicity in ruminants. **J. Anim. Sci.**, 62 (Suppl. 2):62-71, 1986.
- GASTAL, E.L. Selection of the Dominant Follicle in Mares: Role of Follicle-diameter Differences, Gonadotropins, and Estradiol. PhD Thesis. University of Wisconsin-Madison, EUA, 234 pp, 1999.
- GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biol. Reprod.**, 57:1320-1327, 1997.
- GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., GINTHER, O.J. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, 50:1025-1038, 1998a.
- GASTAL, E.L., SANTOS, G.F., HENRY, M., PIEDADE, H.M. Embryonic and early foetal development in donkeys. Embryo Transfer III. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15):10-13, 1993.
- GASTAL, M.O. **Estudo da Função Uterina no Fenômeno de Fixação da Vesícula Embrionária em Éguas: Contribuição da Contratilidade e do Tônus Uterino.** DS. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG, Brasil, 90 pp, 1998.
- GASTAL, M.O., GASTAL, E.L., GINTHER, O.J. Effect of PGF₂α on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, 50:989-999, 1998b.

- GINTHER, O.J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, 19:603-623, 1983a.
- GINTHER, O.J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, 19:613-623, 1983b.
- GINTHER, O.J. Dynamic physical interactions between equine embryo and uterus. **Equine Vet. J.**, (Suppl 3):41-47, 1985.
- GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare.** Cross Plains, WI: Equiservices, 1986.
- GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. **Vet. Clin. North Am.**, 4:197, 1988.
- GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.** Equiservices, Cross Plains, WI, 2^a ed, 642 pp, 1993.
- GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses. Book 2.** Cross Plains, WI: Equiservices, 394 pp, 1995.
- GINTHER, O.J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. **Am. Assoc. Equine Pract.**, 44:73-104, 1998.
- GINTHER, O.J., e KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, 42:987-1001, 1994.
- GINTHER, O.J., e KOT, K., WILTBANK, M.C. Associations between follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, 43:713-721, 1995.
- GINTHER, O.J., e PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, 21:505-515, 1984.
- GRIFFIN, P.G., e GINTHER, O.J. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, 34:47-56, 1990.
- GRIFFIN, P.G., e GINTHER, O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. **J. Anim. Sci.**, 70:953-972, 1992.
- HANDLER, J., KÖNIGSHOFER, M., KINDADL, H., AURICH, J.E., AURICH, C. Prostaglandin release and cycle length in mares after cervical manipulation. 14 **Inter. Congr. Anim. Reprod.**, 1:30 (Abstr.), 2000.

- HANDLER, J., KÖNIGSHOFER, M., SCHAMS, D., AURICH, C. Secretion of oxytocin caused by cervical dilatation in the horse mare. Society for the Study of Fertility. **Annual Conference. University of Reproduction Cambridge**, 27: 11 (abst), 2001.
- HAYES, K.E.N., PIERSON, R.A., SCRABA, S.T., GINTHER, O.J. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, 24:465-477, 1985.
- HIGGINS, A.J. e LEES, P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of antiinflammatory drugs. **Equine Vet. J.**, 16:163-175, 1984.
- HUHTINEN M. **Viability of Equine Embryos with Special Reference to Manipulation and Insemination Timing.** PhD Thesis. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Ypäjä, 66 pp, 1999.
- HURTGEN J.P. e GANJAM V.K. The effect of intrauterine and cervical manipulation on the equine oestrus cycle and hormone profiles. **J. Reprod. Fert.**, (Suppl. 27): 191-197, 1979.
- IMEL, K.J. **Recovery, culture and transfer of equine embryos.** MS Thesis. Fort Collins, Colorado State University, 90 pp, 1981.
- IMEL, K.J., SQUIRES E.L., ELSDEN, R.P., SHIDELER, R.K. Collection and transfer of equine embryos. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 179: 987, 1981.
- IULIANO, M.S., SQUIRES, E.L., COOK, V.M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **J. Anim. Sci.**, 60 (1): 258-263, 1985.
- KÄHN, W. e LEIDI, W. Ultrasonic characteristics of pathological conditions of the bovine uterus and ovaries. In: TAVERNE, M.A.M., WILLEMSE, A.H. (ed) **Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction.** Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 53-65, 1989.
- KANITZ, W., BECKER F., SPITSCHAK, M., TORNER, H. Method and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. In: **9th Scientific Meeting AETE**, Lyon, 10-11, 1993.
- KASK, K., MALMGREM, L., ODENSVIK, K. Prostaglandin F_{2α} metabolite levels following an embryo transfer procedure in the mare. **Acta Vet. Scand.** 36:145-147, 1995.
- KASK, K., ODENSVIK, K., KINDAHL, H. Prostaglandin F_{2α} release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Vet. J.**, 29 (4):286-289, 1997.
- KAWARABAYASHI, T., SHOJO, H., TSUKAMOTO, T. Effects of oxytocin, prostaglandin F_{2α} e prostaglandin E₂ on intracellular free calcium concentration of longitudinal muscle cells isolated from term pregnant rat myometrium. **Gynecol. Obstet. Invest.**, 43:145-149, 1997.

- KASTELIC, J.P., CURRAN, S., PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. **Theriogenology**, 29:39, 1988.
- KIRTON, K.T. Biochemical effects of prostaglandins as they might relate to uterine contraction. In: JOSIMOVICH J.B. **Uterine contraction-side effects of steroidal contraceptives**. New York, Willey-Interscience Publication, p. 193-203, 1973.
- LAGNEAUX, D., e PALMER, E. Are pony and larger mares similar as recipients for nonsurgical transfer of day 7 embryos? **Equine Vet. J.**, (Suppl. 32):47-51, 1989.
- McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L. **Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract. Part I**, 9:336-345, 1987a.
- McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L. **Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract. Part II**, 9:472-481, 1987b.
- McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L., COOK, V.M. Equine embryo transfer. **Cont. Educ. Pract. Vet.**, 10:343-355, 1988.
- MEINTJES, M., BELLOWS, M.S., PAUL, J.B. Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval in cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. **Biol. Reprod., Monograph.**, 1:281, 1995.
- MULLER, Z., e CUNAT, L. Special surgical transfers of horse embryos. Embryo Transfer III. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15): 113-115, 1993.
- PALMER, E., e DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, 13:203-216, 1980.
- PASCOE, D.R., STABENFELDT, G.H., HUGHES, J.P., KINDAHL, H. Endogenous prostaglandin F_{2α} release induced by physiologic saline solution infusion in uterus in the mare: effect of temperature, osmolarity, and pH. **Am. J. Vet. Res.**, 50:1080-1083, 1989.
- PIERSON, R.A., e GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, 29:21, 1988.
- PIETERSE, M.C., VOS, P., KRUIP, T.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, 35:857-861, 1991.
- RIERA, F.L. Equine Embryo Transfer. In: Samper, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Pennsylvania: Saunders Company, p. 229-246, 2000.
- RIERA, F.L., e MCDONOUGH, J. Comercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15): 116-119, 1993.
- SAS Procedures Guides, vers ion 6.12**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996.

- SIROIS, J., BETTERIDGE, K.J., GOFF, A.K. PGF-2 α release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. **J. Reprod. Fert.**, (Suppl. 35): 419-427, 1987.
- SQUIRES, E.L., COOK, V. M., VOSS, J.L. **Collection and Transfer of equine embryos. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory.** Colorado State University, Colorado, 37 pp, 1985a.
- SQUIRES, E.L., IMEL, K.J., IULIANO, M.F. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program. **J. Reprod. Fert.**, (Suppl. 30): 409-414, 1982a.
- SQUIRES, E.L., IMEL, K.J., IULIANO, M.F., SHIDELER, R.K. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. **J. Reprod. Fert.**, (Suppl. 32): 409-414, 1982b.
- SQUIRES, E.L., IULIANO, M.F., SHIDELER, R.K. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, 13: 90 (Abstr.), 1982c.
- SQUIRES, E.L., GARCIA, R.H., GINTHER, O.J. Factors affecting success of equine embryo transfer. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 3): 92-95, 1985b.
- SQUIRES, E.L., McCUE, P.M., VANDERWAL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, 51 (1): 91-104, 1999.
- SQUIRES, E.L., MCKINNON, A.O., SHIDELER, R.K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, 29:55-70, 1988.
- SQUIRES, E.L., e SEIDEL, G.E. Jr. **Collection and transfer of equine embryos. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin No. 11.** Fort Collins, Colorado State University, 32 pp, 1995.
- SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E, Jr, MCKINNON, A.O. Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomised mares. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 8): 89-91, 1989.
- TOWNSON, D.H., e GINTHER, O.J. Duration and pattern of follicular evacuation during ovulation in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, 15:131-138, 1987.
- VANDERWALL, D.K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Vet. Clin. Am: Equine Pract**, 12 (1):61-84, 1996.
- VOGELANG, S.G., BONDIOLI, K. R., MASSEY, J. M. Commercial application of equine embryo transfer. **Equine Vet. J.**, 3: 89-91, 1985.
- WEBER, J.A., FREEMAN D.A., VANDERWALL, D.K., WOODS, G.L. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biol. Reprod**, 45:544-546, 1991a.

WEBER, J.A., FREEMAN, D.A., VANDERWALL, D.K., WOODS, G.L.
Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biol.**
Reprod., 45:540-543, 1991b.