Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA EQUINA E DO ACETATO DE DESLORELINA NA DINÂMICA FOLICULAR, RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM ÉGUAS IDOSAS

RAIANE SILVA MIRANDA

Botucatu, SP
Agosto – 2026

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA EQUINA E DO ACETATO DE DESLORELINA NA DINÂMICA FOLICULAR, RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM ÉGUAS IDOSAS

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de DOUTOR.

Raiane Silva Miranda
Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Botucatu, SP
Agosto – 2026

M672e

Miranda, Raiane Silva
Efeito da síndrome metabólica equina e do acetato de deslorelina na dinâmica folicular, recuperação e maturação oocitária em éguas idosas / Raiane Silva Miranda. -- Botucatu, 2026
86 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Cezinande de Meira
Coorientadora: Fernanda de Saules Ignácio

1. desregulação insulínica. 2. ovum pick-up. 3. reprodução assistida equina. 4. competência oocitária. 5. aspiração folicular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Nome do autor (a): Raiane Silva Miranda

Título: EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA EQUINA E DO ACETATO DE DESLORELINA NA DINÂMICA FOLICULAR, RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM ÉGUAS IDOSAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira
Presidente e Orientador
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira
Membro
Departamento de Clínicas Veterinárias – UFPel – Pelotas/RS

Dra. Fernanda Jordão Affonso
Membro
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única – UNESP – Jaboticabal/SP

Dra. Thaisy Tino Dellaqua
Membro
TransOva Genetics – Uberaba/MG

Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes
Membro
Departamento de Ciências Biológicas – UNIFESP – São Paulo/SP

Data da defesa: 28 de agosto de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, saúde e sabedoria concedida em todos os momentos.

Aos meus pais, Ely e Lourdes, e aos meus irmãos, Raíssa e Ely Junio, que são a base de tudo. Este trabalho também é de vocês.

Ao meu orientador, Dr. Cezinande de Meira, pela confiança depositada em mim ao me aceitar sob sua orientação.

À minha coorientadora, Dra. Fernanda Saules Ignácio, por ter estado ao meu lado desde o início. Obrigada por compartilhar seu conhecimento teórico e prático, e por ter vibrado a cada conquista minha durante o doutorado como se fosse uma conquista pessoal sua. Você é minha maior referência na reprodução equina e boa parte da veterinária que sou hoje é graças a você.

A toda equipe de pós graduandos e alunos de iniciação científica do Posto de Monta: Ana Julia, Beatriz Lippe, Bianca Miranda, Giovana Camargo, Giovanna Brito, Giullia Dall'Amico, João Brugnaro, Julia Zeitel, Leonardo Siqueira, Letícia Sayuri, Lorena Haddad e Maria Eduarda Hurtado. O convívio diário e o auxílio mútuo tornaram o ambiente de trabalho mais leve.

À Dra Raquel Puelker e à Dra Carol Soares por gentilmente terem fornecido o meio utilizado para maturação oocitária nesse experimento.

A todos os membros do Departamento de Reprodução Animal que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos, que entenderam as ausências e ofereceram o apoio emocional necessário para que eu não desanimasse.

Agradeço às éguas do Posto de Monta - o centro desse experimento. Sem elas, este estudo não existiria.

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

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

“[...] porque existe uma grande verdade neste planeta:
seja você quem for, quando quer com vontade alguma
coisa, é porque este desejo nasceu na alma do Universo.
É sua missão na Terra.”

Paulo Coelho

RESUMO

MIRANDA, R.S. **EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA EQUINA E DO ACETATO DE DESLORELINA NA DINÂMICA FOLICULAR, RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM ÉGUAS IDOSAS**. Botucatu – SP. 2026. 86p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da Síndrome Metabólica Equina (SME) sobre a dinâmica folicular, a recuperação de oócitos por meio da aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) e maturação oocitária *in vitro*, além de verificar se a estimulação com acetato de deslorelina poderia modular esses parâmetros em éguas idosas. Foram utilizadas sete éguas com idade média de 24,29 ± 1,60 anos, classificadas como SME positivo (n=4) ou negativo (n=3), alocadas em delineamento *cross-over* sequencial, recebendo ou não a administração de 125 µg de acetato de deslorelina IM a cada 12h. O tratamento foi iniciado quando o maior folículo atingiu entre 11 e 13 mm e mantido até 22 a 24 mm. A OPU foi realizada quando o maior folículo atingiu entre 25 e 27 mm, e os oócitos recuperados foram maturados *in vitro*. Foram realizadas 63 sessões de OPU, sendo 37 no grupo Controle e 26 no grupo Deslorelina. A análise estatística mostrou que éguas com SME apresentaram tendência de maior intervalo entre sessões de OPU (11,87 vs. 9,26 dias; P=0,079), e a deslorelina aumentou o intervalo entre sessões de OPU (12,06 vs. 10,19 dias; P=0,027) e apresentou tendência de aumento no intervalo entre o surgimento do primeiro folículo ≥10 mm e a OPU (7,74 vs. 6,55 dias; P=0,076). Os demais parâmetros reprodutivos não atingiram significância estatística. Quanto à dinâmica folicular, tanto a SME (P<0,001) quanto a deslorelina (P=0,039) alteraram significativamente a curvatura do maior folículo. Na análise estratificada, houve diferença significativa no diâmetro do maior folículo (P=0,004) e do terceiro maior folículo (P=0,027) ao final do tratamento, com o subgrupo Deslorelina SME positivo apresentando os menores valores. Entretanto, a estimativa para o maior folículo apresentou variância entre-éguas colapsada, o que fragiliza a inferência. A deslorelina, como efeito principal do tratamento, reduziu o diâmetro do segundo maior folículo (18,37 vs. 21,62 mm; P=0,033) e ampliou a assimetria entre o maior e o segundo maior folículo no dia da OPU (8,63 vs. 4,64 mm; P=0,008), sem interação com o *status* metabólico. Os resultados indicam que a deslorelina não reverteu os possíveis efeitos da SME sobre a função reprodutiva e que seu impacto esteve mais associado a alterações específicas da dinâmica folicular do que a um comprometimento generalizado dos índices reprodutivos.

Palavras-chave: desregulação insulínica; *ovum pick-up*; reprodução assistida equina; competência oocitária.

ABSTRACT

MIRANDA, R.S. **EFFECT OF EQUINE METABOLIC SYNDROME AND DESLORELIN ACETATE ON FOLLICULAR DYNAMICS, OOCYTE RECOVERY AND MATURATION IN AGED MARES**. Botucatu – SP. 2026. 86p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The present study aimed to evaluate the effect of Equine Metabolic Syndrome (EMS) on follicular dynamics, oocyte recovery through ultrasound-guided follicular aspiration (ovum pick-up, OPU), and *in vitro* oocyte maturation, as well as to verify whether stimulation with deslorelin acetate could modulate these parameters in aged mares. Seven mares with a mean age of 24.29 ± 1.60 years were used, classified as EMS positive (n=4) or negative (n=3), allocated in a sequential cross-over design, receiving or not 125 µg of deslorelin acetate IM every 12h. Treatment was initiated when the largest follicle reached between 11 to 13 mm and maintained until 22 to 24 mm. OPU was performed when the largest follicle reached between 25 to 27 mm, and the recovered oocytes were matured *in vitro*. A total of 63 OPU sessions were performed, 37 in the Control group and 26 in the Deslorelin group. Statistical analyses showed that mares with EMS tended to have a longer interval between OPU sessions (11.87 vs. 9.26 days; P=0.079), and deslorelin increased the interval between OPU sessions (12.06 vs. 10.19 days; P=0.027) and showed a trend toward an increased interval between the emergence of the first follicle ≥10 mm and OPU (7.74 vs. 6.55 days; P=0.076). The other reproductive parameters did not reach statistical significance. Regarding follicular dynamics, both EMS (P<0.001) and deslorelin (P=0.039) significantly altered the curvature of the largest follicle. In the stratified analysis, there was a significant difference in the diameter of the largest follicule (P=0.004) and the third largest follicle (P=0.027) at the end of treatment, with the EMS-positive Deslorelin subgroup presenting the lowest values. However, the estimate for the largest follicle showed a collapsed between-mare variance, which weakens the inference. Deslorelin, as the main treatment effect, reduced the diameter of the second largest follicle (18.37 vs. 21.62 mm; P=0.033) and increased the asymmetry between the largest and second largest follicles on the day of OPU (8.63 vs. 4.64 mm; P=0.008), without interaction with metabolic status. The results indicate that deslorelin did not reverse the possible effects of EMS on reproductive function and that its impact was more associated with specific alterations in follicular dynamics than with a generalized impairment of reproductive indices

Keywords: insulin dysregulation; ovum pick-up; oocyte competence; equine assisted reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinâmica de crescimento (média predita ± IC 95%) dos três maiores folículos nos quatro subgrupos experimentais (SME positivo/negativo x Controle/Deslorelina). (a) maior folículo (F1); (b) segundo maior folículo (F2); (c) terceiro maior folículo (F3).....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias marginais ± Erro Padrão dos parâmetros foliculares e oocitários de éguas idosas submetidas à OPU, segregadas por tratamento (Controle e Deslorelina).....55

Tabela 2. Médias marginais ± Erro Padrão dos parâmetros foliculares e oocitários de éguas idosas submetidas à OPU, segregadas por *status* metabólico (Negativo= sem SME; Positivo= com SME).....56

Tabela 3. Comparações das médias marginais (mm) ± Erro Padrão dos diâmetros dos folículos F1, F2 e F3 no início e no fim do tratamento, entre os subgrupos experimentais.....59

Tabela 4. Comparações das médias marginais (mm) ± Erro Padrão dos diâmetros dos folículos F1, F2 e F3 no dia da OPU, entre os subgrupos experimentais.....59

Tabela 5. Média (mm/dia) ± Erro Padrão das taxas de crescimento folicular nos últimos 10 dias antes da OPU por grupo experimental.....59

Tabela 6. Intervalo médio (dias) ± Erro Padrão entre a emergência da onda até o início do tratamento (Deslorelina ou NaCl 0,9%), emergência da onda até término do tratamento, início do tratamento até a OPU e fim do tratamento até a OPU.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH: hormônio antimulleriano

ATP: adenosina trifosfato

BMP-15: proteína morfogenética 15

DI: desregulação insulínica

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

ECC: escore de condição corporal

FSH: hormônio folículo estimulante

GDF-9: fator de diferenciação de crescimento 9

GMOPS: meio de cultivo tamponado com MOPS

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

hCG: gonadotrofina coriônica humana

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL-1β: interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

IM: intramuscular

IV: intravenoso

LH: hormônio luteinizante

MII: metáfase II

MIV: maturação *in vitro*

mtDNA: DNA mitocondrial

OPU: *ovum pick up*, ou aspiração folicular transvaginal

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PGE2: prostaglandina E2

PGF2α: prostaglandina F2 alfa

PIVE: produção *in vitro* de embriões

PVP: álcool polivinilpirrolidona

RI: resistência à insulina

RNAm: RNA mensageiro

ROS: espécies reativas de oxigênio

SFB: soro fetal bovino

SME: síndrome metabólica equina

SOF: fluído ovidutal sintético

TGF-β: fator de crescimento transformador beta

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

ZP: zona pelúcida

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....3
2.1. *Alterações hormonais e na dinâmica folicular* 4
2.2. *Alterações oocitárias*.....8
2.3. *Alterações metabólicas – Síndrome Metabólica Equina*.....11
2.4 *Uso do acetato de deslorelina na reprodução equina*.....14
2.5 *Aspiração folicular em éguas*.....16
2.5.1 *Ovum pick-up*.....18
2.6 *Maturação in vitro*.....21
2.7 *Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide*.....22
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS 24
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS 25
4.1. Hipóteses.....25
4.2. Objetivo geral.....26
4.3. Objetivos específicos 26
5. REFERÊNCIAS.....26
CAPÍTULO 2.....45
ARTIGO CIENTÍFICO 46
Resumo.....46
1. Introdução.....48
2. Material e métodos.....49
2.1. Animais.....49
2.2. *Grupos experimentais e parâmetros avaliados*.....51
2.3. *Coleta de oócitos e maturação oocitária (in vitro)*.....52
2.5. Análise estatística.....54
3. RESULTADOS 55
3.1 *Efeito do acetato de deslorelina sobre os parâmetros foliculares e oocitários*...55
3.2 *Efeito da SME sobre os parâmetros foliculares e oocitários* …….....56
3.3 *Efeitos da SME e do acetato de deslorelina sobre a dinâmica folicular* ……57
3.4 *Efeitos da SME e do acetato de deslorelina sobre os intervalos temporais da dinâmica folicular ……..…….…….....*60
4. DISCUSSÃO.....60
5. CONCLUSÃO 68

AGRADECIMENTOS.....68
COMPETING INTERESTS STATEMENT 69
CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STETAMENT.....69
REFERÊNCIAS 69

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A maioria dos equinos é criada para esporte ou lazer e, dependendo de sua utilização, a reprodução ocorrerá após o animal atingir seu potencial máximo, seja como atleta (por exemplo, em corridas, enduro, salto) ou como cavalo de lazer (por exemplo, clubes de pôneis e equitação, turismo equestre). A seleção reprodutiva nesta espécie fundamenta-se no desempenho dos indivíduos. Conforme a raça, o propósito de utilização e a região geográfica, pode-se empregar ou não índices genéticos como critérios para o processo seletivo. Muitos cavalos machos são castrados em idade precoce para fins de manejo, de modo que apenas os animais de alto valor sejam mantidos para reprodução. Assim, tanto machos quanto fêmeas podem ser usados para reprodução até atingirem idade avançada. Nestes casos, quando permitido pelo livro genealógico da raça, as técnicas de reprodução assistida são usadas para reproduzir animais de elite inférteis por causas adquiridas e/ou de idade avançada (Palmer, Chavatte-Palmer, 2020).

Nesse contexto, a técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia associada à injeção intracitoplasmática de espermatozoide (OPU-ICSI) atingiu um nível de eficiência na produção de embriões, além de proporcionar maior flexibilidade, permitindo a produção de embriões em qualquer época do ano e a utilização de sêmen com qualidade e/ou quantidade reduzidas, além de apresentar consistência nas taxas de prenhez (Claes et al., 2019). Mais do que nunca, esta tecnologia está sendo rapidamente adotada pela indústria equina (Stout, 2019; Squires, 2019), uma vez que abre novas oportunidades tanto para o melhoramento genético das populações equinas como para o potencial comercial oferecido por um embrião congelado de qualidade, que pode ser comercializado em todo o mundo (Lazzari et al., 2020).

Entretanto, estudos apontam que éguas idosas utilizadas como doadoras de oócitos para ICSI apresentam taxas de prenhez reduzidas e índices mais elevados de perda embrionária (Frank et al., 2019). Além disso, o avanço da idade está associado à diminuição no número de folículos aspirados, redução da quantidade de oócitos recuperados e uma tendência à menor produção de blastocisto por égua (Cuervo-Arango et al., 2019a). Paralelamente às alterações resultantes do envelhecimento reprodutivo, alterações metabólicas também podem interferir no ambiente ovariano. Éguas com Síndrome Metabólica Equina

(SME) apresentam alterações no ambiente intrafolicular, como modificações nas concentrações de insulina, adiponectina, leptina e citocinas (Sessions-Bresnahan, Carnevale, 2014). Entretanto, os efeitos da desregulação insulínica sobre a dinâmica folicular, a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário em éguas ainda não estão completamente elucidados.

Utilizar um fármaco que aumente as taxas de maturação *in vitro* de oócitos nas éguas é de grande interesse, uma vez que pode incrementar significativamente o número de embriões obtidos por ICSI, otimizando assim os resultados da técnica. Diferentemente de outras espécies, a égua apresenta resposta limitada a protocolos de superovulação. Assim, os fármacos são utilizados com o objetivo de levar à codominância entre os folículos e aumentar a frequência de duplas ou triplas ovulações (Squires, McCue, 2007). Nesse sentido, o acetato de deslorelina é uma alternativa para estimular a secreção endógena do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), uma vez que o FSH promove o crescimento folicular (Ginther, Bergfeldt, 1990). Contudo, há uma lacuna na literatura sobre os efeitos de baixas doses de deslorelina especificamente em éguas idosas doadoras de oócitos com SME. Portanto, investigar se esse protocolo farmacológico pode favorecer a dinâmica folicular, a qualidade oocitária e o perfil hormonal desses animais é importante para aumentar as taxas de produção de embriões através da reprodução assistida e garantir a viabilidade comercial de doadoras em idade avançada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O avanço da idade compromete o sucesso reprodutivo de éguas por vários fatores, muitos deles bastante complexos, que contribuem para a diminuição da fertilidade à medida que envelhecem (Scoggin, 2015). Entre os principais fatores, destacam-se a redução da qualidade oocitária (Carnevale et al., 1999) e a diminuição na população de folículos antrais e primordiais (Carnevale, 2008; Claes et al., 2017), além de alterações degenerativas no útero e de conformação vulvar. Somam-se a isso falhas no desenvolvimento das membranas fetais (Scoggin, 2015), aumento das taxas de perda embrionária precoce (Ball et al., 1986) e, consequentemente, menor índice de nascimento de potros vivos (Scoggin, 2015). Contudo, éguas idosas são frequentemente mantidas na reprodução por seus elevados valores genéticos e/ou de

performance, e não propriamente pela sua fertilidade (Claes et al., 2017).

A égua é considerada um excelente modelo animal para estudo da reprodução humana. O trato reprodutivo da fêmea equina é facilmente acessível para monitoramento e manipulações. Além disso, as características do desenvolvimento folicular na égua são semelhantes às observadas em mulheres, culminando na ovulação de um único folículo após uma longa fase folicular. Alterações na fertilidade e na ciclicidade associadas à senescência na égua são semelhantes às observadas em mulheres, atribuindo-se a redução da atividade ovariana como a principal causa. Assim, a égua fornece um modelo para integrar pesquisas sobre a maturação oocitária *in vivo* e sobre as alterações associadas à idade no ciclo, no folículo e no oócito (Carnevale, 2008).

2.1 Alterações hormonais e na dinâmica folicular

Em éguas e mulheres, a população total de folículos primordiais está presente antes do nascimento e há um declínio progressivo conforme a fêmea envelhece devido à atresia e ovulação. Acredita-se que a redução do número de folículos em crescimento e subsequente cessação da atividade reprodutiva sejam consequências diretas do esgotamento dessa reserva ovariana (Monget et al., 2012; Monniaux et al., 2014). Embora o encerramento da atividade ovariana varie entre indivíduos, ocorrendo geralmente após os 20 anos em éguas (Carnevale et al., 1994; Wesson e Ginther, 1981; Vanderwall e Woods, 1991) e após os 50 anos em mulheres (te Velde et al., 1998), a subfertilidade manifesta-se antes do esgotamento total dos folículos.

Nas fêmeas equinas observa-se redução da fertilidade a partir dos 10 anos de idade (Scoggin, 2015), sendo esta redução provavelmente mais relacionada com a queda na qualidade dos oócitos (Carnevale, Ginther, 1995). Estudos comparativos indicam que, em ambas as espécies, o início da subfertilidade ocorre aproximadamente uma década antes do fim da fertilidade, tornando-se mais acentuada em mulheres a partir dos 35 anos (Healy et al., 1994; Buratini et al., 2022).

A reserva folicular ovariana sofre um declínio quantitativo progressivo ao longo da vida. Em mulheres, o número de folículos primordiais foi estimado em 300.000 na fase pré-púbere (Baker, 1963), reduzindo-se a algumas centenas ou milhares à medida que a menopausa se aproxima. Após a menopausa, ocorre

uma perda relativamente completa desses folículos (Richardson et al., 1987). De forma análoga, em fêmeas equinas e pôneis entre 2 e 4 anos, o número médio de folículos primordiais foi estimado em 35.950, com ampla variação individual, de 5.600 a 75.000 (Driancourt et al., 1982), sendo observada a queda do número de folículos antrais em éguas com idade média de 23 anos (Claes et al., 2017). Hyde et al. (2022) observaram um efeito da idade na população folicular pré-antral, no qual éguas entre 4 e 9 anos apresentavam 152.664 folículos pré-antrais por ovário enquanto acima de 20 anos apresentavam 11.750.

O envelhecimento reprodutivo em mulheres manifesta-se inicialmente pela redução do ciclo menstrual (Treloar et al., 1967; Sherman et al., 1976; Vermeulen, 1993; Mobbs, 1998; Johannes, Crawford, 1999), alteração atribuída à diminuição da fase folicular, com fases lúteas e concentrações de progesterona semelhantes. As concentrações de FSH estão aumentadas em mulheres mais velhas durante a fase folicular inicial e diminuem à medida que as concentrações de estradiol aumentam, enquanto as concentrações de LH não sofrem alterações significativas (Sherman et al., 1976). Alterações no desenvolvimento folicular em mulheres entre 40-45 anos foram atribuídas a um recrutamento e seleção mais precoces do folículo dominante, estimulado pelo aumento do FSH durante a fase lútea tardia do ciclo anterior. O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi de 19,8 mm em mulheres entre 40-45 anos e de 21,9 mm em mulheres entre 20-25 anos (Soules et al., 2000).

Em geral, a égua apresenta uma progressão da vida reprodutiva após a puberdade que compreende ciclos normais, encurtados, alongados, intermitentes e, por fim, a senescência reprodutiva. A progressão dessas fases e a idade de cessação da reprodução dependem de cada égua, com um possível componente genético associado (Carnevale, 2017).

Assim como em mulheres, éguas de meia-idade entre 15 e 19 anos apresentam uma redução de 15% na duração da fase folicular e ovulam folículos significativamente menores, sem alteração na duração da fase lútea. Esses efeitos no ciclo parecem decorrer de alterações nas concentrações de FSH, que aumentam mais cedo na fase lútea e atingem níveis mais elevados em éguas de meia-idade. Apesar do estímulo hormonal, a taxa de crescimento folicular nessas fêmeas foi significativamente menor que a observada em éguas jovens (Carnevale et al., 1993).

Aumento nos níveis de FSH, sem alterações nas concentrações de LH, parece ser o sinal inicial do envelhecimento reprodutivo em ambas as espécies. Hipotetiza-se que essas alterações hormonais reflitam falha nas secreções ovarianas de hormônios que modulam o FSH, como a inibina, ativina, estradiol e folistatina (Soules et al., 2000), o que aceleraria o esgotamento da reserva ovariana ao estimular maior proporção de folículos primordiais a entrar no *pool* de folículos em desenvolvimento e atresia posterior (Richardson et al., 1987). Entretanto, Ginther et al. (2009) não encontraram diferenças nas concentrações sistêmicas de estradiol, no diâmetro do folículo pré-ovulatório e no fluxo sanguíneo folicular antes da ovulação de éguas idosas, de meia-idade e jovens.

Com o avanço da senescência, a duração do ciclo e as concentrações de gonadotrofinas aumentam. Éguas com 20 anos apresentaram intervalos interovulatórios e fases foliculares mais longos do que éguas jovens (Carnevale et al., 1993), sendo associado a um atraso de 3 dias no surgimento do folículo dominante (Ginther et al., 1993) e redução na taxa de crescimento do folículo ovulatório (Carnevale et al., 1993), podendo evoluir para inatividade ovariana em 37% das éguas acima de 24 anos (Vanderwall, Woods, 1991). Somente 50% de éguas pôneis com 20 anos apresentaram ovulações sequenciais, enquanto 19% não apresentaram desenvolvimento folicular ou ovulação durante 60 dias de monitoramento (Carnevale et al., 1994).

O envelhecimento em éguas também está associado a uma redução na população de folículos antrais (Ginther et al., 2008, 2009; Claes et al., 2017), embora exista uma variação ampla entre éguas de diferentes idades (Claes et al., 2015). Além disso, o número de folículos primordiais, que representam a reserva ovariana, reduz com a idade devido à atresia e ovulação durante cada onda folicular. O esgotamento do "*pool*" de folículos resulta em falhas ovulatórias e cessação dos ciclos estrais (Carnevale, 2008). Todavia, a idade em que a senescência ovariana se estabelece é variável (Vanderwall, Woods, 1991), sugerindo que existam diferenças inerentes no número de folículos primordiais entre éguas da mesma idade (Claes et al., 2017).

Com o avanço da idade, éguas com baixa contagem de folículos antrais apresentaram intervalos interovulatórios e fases foliculares mais longas quando comparado às éguas com média ou alta contagem. Isto sugere que a reserva folicular em éguas mais velhas pode influenciar as alterações nos parâmetros de

fase folicular e corrobora com o conceito de que a idade reprodutiva e a idade cronológica são variáveis distintas na égua (Claes et al., 2017). Tais diferenças são bem descritas na espécie humana, na qual a taxa de envelhecimento ovariano varia entre indivíduos, de modo que mulheres com a mesma idade cronológica podem apresentar diferentes graus de envelhecimento reprodutivo (Broekmans et al., 2007; Alviggi et al., 2009). Essas diferenças são atribuídas tanto ao número de folículos primordiais presentes ao nascimento, bem como às variações na taxa de depleção folicular ao longo da vida, processo que determina a duração da vida reprodutiva e o momento da menopausa (Thomas et al., 2001; Broekmans et al., 2007).

A depleção da reserva folicular parece ser um dos fatores determinantes da senescência ovariana em éguas idosas. Um menor número de folículos primordiais em éguas idosas indica que a reserva ovariana diminui com a idade (Haag et al., 2013; Claes et al., 2017). Independentemente da redução dos folículos primordiais associada à idade, o número desses folículos varia amplamente entre éguas da mesma faixa etária, sugerindo que há diferenças entre as éguas na população de folículos primordiais (Driancourt et al., 1982). Embora a depleção total de oócitos não tenha sido verificada em éguas idosas sem atividade reprodutiva, o declínio e a subsequente falência de folículos antrais foram documentados (Vanderwall, Woods, 1991; Carnevale et al., 1994), e sugerem fortemente o esgotamento da reserva ovariana, assim como acontece em mulheres (Monniaux et al., 2014). Apesar da vida reprodutiva da égua ser aproximadamente metade da mulher, a espécie equina parece ter menos folículos pré-antrais e uma progressão de depleção ovariana semelhante (Carnevale et al., 2020).

Nesse contexto, o hormônio antimulleriano (AMH), membro da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) (Claes et al., 2015; Scarlet et al., 2018), exerce papel regulador crentral na foliculogênese. Secretado pelas células da granulosa (Visser, Themmen, 2005), o AMH atua inibindo tanto o recrutamento de folículos primordiais (Durlinger et al., 1999), quanto o crescimento de folículos responsivos ao FSH (Durlinger et al., 2001; Pellatt et al., 2011), impedindo que muitos folículos primordiais iniciem o crescimento simultaneamente (Vernunft et al., 2011). Em diversas espécies, como bovinos e camundongos, as concentrações de AMH refletem na população

de folículos primordiais e antrais, servindo como biomarcador da reserva folicular (Kevenaar et al., 2006; Ireland et al., 2008). No entanto, as concentrações de AMH variam amplamente entre indivíduos de idade semelhante (Ireland et al., 2008).

Em éguas, as concentrações de AMH apresentam correlação positiva com a população de folículos antrais (Claes et al., 2015; Scarlet et al., 2018) e sua concentração não é influenciada pela fase do ciclo ou gestação (Claes et al., 2015), embora exista uma variação substancial entre as éguas (Almeida et al., 2011). Vernunft et al. (2011) demonstraram que fêmeas com maior número de folículos aspiráveis apresentaram níveis significativamente maiores de AMH do que éguas com poucos folículos.

Claes et al. (2015) observaram que as concentrações plasmáticas de AMH variam amplamente entre as éguas de grupos etários semelhantes. Além disso, tanto a população folicular quanto as concentrações de AMH foram significativamente menores em éguas idosas. Os autores concluíram que a mensuração desse hormônio representa um indicador mais fidedigno da idade reprodutiva do que a idade cronológica da égua. Contudo, é importante destacar que, em mulheres, o AMH é um marcador confiável da reserva ovariana, mas não deve ser utilizado como um indicador da qualidade oocitária (Buratini et al., 2022).

2.2 Alterações oocitárias

Segundo Carnevale et al. (2010), a qualidade e a competência oocitária diminuem à medida que aumenta a idade das éguas, devido à permanência desses gametas na fase diplóteno da prófase I da meiose até o momento em que forem recrutados. Este fato foi evidenciado durante a transferência de oócitos para receptoras jovens, nos quais oócitos de éguas doadoras idosas resultaram em menor taxa de gestação (31%) em comparação com oócitos de éguas doadoras jovens (92%) (Carnevale, Ginther, 1995). Tais resultados podem ser atribuídos a alterações morfológicas associadas à idade (Scoggin, 2015). Sob microscopia óptica e eletrônica, oócitos de éguas idosas apresentam maior vacuolização e alterações de forma (Carnevale et al., 1999). Além disso, a aparência do ooplasma e a expansão das células do *cumulus* mostraram-se inferiores em animais senescentes (Carnevale et al., 2005).

Altermatt et al. (2009) avaliaram a morfologia de oócitos coletados de folículos em maturação durante o estro de éguas jovens e idosas. Nos oócitos de éguas idosas, embora o tamanho do ooplasma fosse semelhante, a zona pelúcida (ZP) era significativamente mais fina, enquanto o volume interno da ZP e o espaço perivitelino eram maiores. Esses achados são compatíveis com o aumento de tamanho dos oócitos de éguas idosas antes da maturação, potencialmente associado a alterações em fatores específicos do oócito (Campos-Chillon et al., 2015). O maior volume interno de ZP e espaço perivitelino aumentado estão associadas a menor potencial dos oócitos resultarem em gestação (Altermatt et al., 2009). Não se sabe se a qualidade oocitária é afetada por fatores ovarianos alterados durante o crescimento do oócito ou se as morfologias anormais refletem folículos insuficientes para um processo de seleção adequado (Carnevale, 2017).

Entretanto, Frank et al. (2019) avaliaram oócitos equinos de um programa de reprodução assistida e não observaram associação clara entre a idade e a morfologia oocitária ou potencial de desenvolvimento do oócito. Em humanos, há estudos que comparam a morfologia oocitária, mas não está elucidado se morfologias específicas são preditivas do desenvolvimento embrionário (Balaban, Urman, 2006; Yu et al., 2015). Por outro lado, alterações cromossômicas relacionadas ao envelhecimento reprodutivo parecem constituir um mecanismo mais consistente. Em éguas, o avanço da idade foi associado a maior frequência de desalinhamento cromossômico em oócitos maturados *in vitro* e a alterações na coesão centromérica, incluindo maior incidência de aneuploidia e separação prematura de cromátides-irmãs (Rizzo et al., 2019; 2020). Na espécie humana, a associação entre idade materna avançada e aumento da aneuploidia está bem estabelecida, sendo atribuída principalmente a erros de segregação cromossômica durante a meiose (Pellestor et al., 2006; Nagaoka et al., 2012).

No nível molecular, a comunicação entre o oócito e o ambiente folicular também é afetada. O fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética 15 (BMP-15), pertencentes à família TGF-β, são secretados exclusivamente pelo oócito em várias espécies, como coelhos, camundongos, ovelhas e vacas (El-Fouly et al., 1970; Dong et al., 1996; Galloway et al., 2000; Juengel et al., 2009), e podem refletir de forma mais

precisa na qualidade oocitária e/ou função ovariana (Scarlet et al., 2025).

O BMP-15 é responsável pela sinalização oocitária, participando do recrutamento do folículo primordial, proliferação das células da granulosa e da teca, e na comunicação com as células do *cumulus*, além de influenciar na maturação e qualidade oocitária (Wu et al., 2007; Sanfins et al., 2018). Já o GDF-9 está relacionado com a expansão das células do *cumulus*, atuando através da regulação de enzimas envolvidas neste processo e criando um ambiente adequado para o desenvolvimento oocitário (Yan et al., 2001; Pangas, Matzuk, 2005). Ambos se relacionam com a competência oocitária ao final da maturação (Rodriguez, Farin, 2004; Feuerstein et al., 2006).

Em humanos, a expressão do GDF-9 e BMP-15 nas células do *cumulus* está diretamente relacionada à maturação oocitária, fertilização, qualidade do embrião e resultado da gestação (Li et al., 2014), enquanto em equinos, sua expressão está associada ao desenvolvimento do oócito (Scarlet et al., 2017) e à idade da égua (Campos-Chillon et al., 2015).

Um estudo realizado por Campos-Chillon et al. (2015) visou comparar a expressão gênica durante a maturação folicular em éguas jovens e idosas. Nos oócitos, os transcritos de BMP-15 e o GDF-9 foram quantitativamente menores em éguas idosas, sugerindo diferenças entre os grupos etários na fisiologia folicular e competência oocitária. Somado a isso, o aumento precoce do transcrito da fosfodiesterase 4D nas células do *cumulus* sugere que a maturação oocitária pode ser iniciada mais cedo nos folículos de éguas idosas.

Além dessas alterações morfológicas e moleculares, oócitos de éguas idosas também sofrem alterações mitocondriais, com redução numérica e alterações estruturais, como edema e perda da arquitetura interna (Rambags et al., 2006; 2014). Essas alterações podem modificar eventos complexos e altamente dependentes de energia envolvidos na maturação oocitária, reduzindo sua viabilidade (Scoggin, 2015).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um processo normal durante a fosforilação oxidativa mitocondrial (Carnevale et al., 2020). Respostas enzimáticas redox naturais e defesas antioxidantes previnem o acúmulo excessivo de ROS nas células (Winyard et al., 2005). Entretanto, o envelhecimento ocasiona a redução destes mecanismos de defesa (Sasaki et al., 2019), podendo levar ao estresse oxidativo, potencial disfunção mitocondrial

e mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) (Bentov, Casper, 2013). A exposição prolongada a ROS, aliada à ausência de histonas protetoras, torna o mtDNA mais propenso a mutações (Bentov et al., 2011; Babayev, Seli, 2015).

Oócitos de fêmeas idosas são expostos por períodos mais longos a níveis elevados de ROS, o que leva a mais mutações no mtDNA e a uma falha progressiva no metabolismo oxidativo mitocondrial (Eichenlaub-Ritter et al., 2004). Isso pode contribuir para doenças metabólicas e infertilidade em gerações subsequentes (Rebolledo-Jaramillo et al., 2014).

A redução do fornecimento local de adenosina trifosfato (ATP) pelas mitocôndrias pode afetar a formação do fuso meiótico e a regulação da meiose em fêmeas idosas (Eichenlaub-Ritter, 2012; Krisher, 2019). Alterações mitocondriais nos oócitos associadas ao envelhecimento ocorrem tanto em éguas quanto em mulheres e causam não apenas redução da fertilidade em fêmeas idosas, mas também potenciais alterações nas mitocôndrias da prole (Carnevale et al., 2020).

2.3 Alterações metabólicas – Síndrome Metabólica Equina

Diferente de uma patologia específica, a Síndrome Metabólica Equina (SME) é definida pelo Consenso do Colégio Europeu de Medicina Interna Equina como um conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento da laminite endocrinopática (Frank et al., 2010; Durham et al., 2019). A característica central e o achado mais consistente da SME é a desregulação insulínica (DI), caracterizada pelo desequilíbrio entre as concentrações plasmáticas de glicose, insulina e lipídios (Durham et al., 2019), frequentemente associada à obesidade (Johnson, 2002). Embora a laminite seja a principal consequência clínica da SME, os animais acometidos podem manifestar outros distúrbios metabólicos, como hiperlipidemia, hiperglicemia e hipertrigliceridemia (Durham et al., 2019).

A DI pode se manifestar de diversas maneiras, como hiperinsulinemia basal; resposta insulinêmica excessiva ou prolongada à administração oral ou intravenosa de carboidratos, com ou sem hiperglicemia excessiva ou prolongada ("intolerância à glicose"); e resistência à insulina (RI). Além disso, a hipertrigliceridemia também pode surgir como consequência da RI (Durham et al., 2019).

A obesidade é definida como o aumento da adiposidade regional ou generalizada. Em equinos, a adiposidade regional caracteriza-se pelo aumento do tecido adiposo subcutâneo ao redor do ligamento nucal, base da cauda, região escapular, glândulas mamárias e prepúcio (Frank et al., 2010). Embora a obesidade seja observada na maioria dos casos, alguns equídeos acometidos apresentam uma condição corporal mais magra aliada à adiposidade regional, enquanto outros mantêm um escore de condição corporal normal (Bailey et al., 2008; Frank et al., 2010). Esses animais acometidos aparentam ser geneticamente predispostos a necessitar de menos calorias para manter um peso corporal adequado, fenótipo conhecido como "*easy keepers*" (Frank, 2008; Argo et al., 2012).

Outras características variáveis da SME incluem alterações cardiovasculares, como aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e das dimensões cardíacas (Bailey et al., 2008; Heliczer et al., 2017), além da desregulação do tecido adiposo. Essa última manifesta-se por concentrações plasmáticas anormais de adipocinas, incluindo hipoadiponectinemia, hiperleptinemia (Carter et al., 2009; Menzies-Gow et al., 2017), e por aumento de citocinas pró-inflamatórias (Vick et al., 2007; Durham et al., 2019). A leptina é um hormônio responsável por manter a condição corporal através da regulação do apetite, enquanto a adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina e reduz a inflamação (Durham et al., 2019).

Estudos indicam que pôneis e animais das raças como "Welsh", "Morgans", Quarto de Milha, Árabe, Crioula, Mangalarga Marchador, Campolina e raças de origem britânica são mais predispostos à síndrome devido à susceptibilidade genética (Frank, 2008; Manso Filho et al., 2009; Karikoski et al., 2011; Geor et al., 2013; Magalhães et al., 2014; Drumond et al., 2016). A idade também é um fator determinante, já que alguns autores relataram que aproximadamente 15% dos animais acima de 15 anos desenvolveram a síndrome (Schott et al., 2001; Donaldson et al., 2002; McGowan e Neiger, 2003). Além disso, as concentrações de insulina são significativamente maiores em cavalos e pôneis mais velhos (Nielsen et al., 2010; Morgan et al., 2014; Hart et al., 2016; Rapson et al., 2018), o que, somado à redução nas concentrações de adiponectina em animais mais velhos, corrobora a associação da idade com a DI (Kawasumi et al., 2015).

A SME, RI e/ou hiperinsulinemia têm sido relacionadas à subfertilidade em éguas. Acredita-se que os sinais enviados ao cérebro sobre o *status* metabólico podem controlar a sazonalidade, especialmente a ocorrência e duração do anestro sazonal (Burns, 2016). Um estudo realizado por Fitzgerald et al. (2002) demonstrou que uma grande proporção de éguas obesas permaneceu ciclando durante o inverno, em comparação com éguas em adequado escore de condição corporal (ECC). Estudos subsequentes concluíram que o fator determinante para a ausência de anestro sazonal não foi a concentração sérica de leptina, mas sim o excesso de balanço energético (Cadario, Archbald, 2022).

Em éguas, obesidade e a RI estão associadas a alterações nos ciclos estrais (Sessions et al., 2004), folículos anovulatórios (Vick et al., 2006) e aumento dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1 beta (IL-1β) e interleucina-6 (IL-6) (Vick et al., 2007). Em mulheres, a obesidade está igualmente associada à diminuição da fertilidade relacionada à anovulação (Rich-Edwards et al., 2002) e à redução das taxas de concepção e gravidez quando ocorre a ovulação (Gesink Law et al., 2007).

Pesquisas apontam que os hormônios metabólicos e as citocinas envolvidas na SME estão associados a distúrbios do desenvolvimento folicular em outras espécies. A presença de receptores de insulina em diferentes locais no ovário, como oócitos e células da teca e da granulosa, torna o ovário um órgão-alvo da ação desse hormônio (Dupont, Scaramuzzi, 2016). Em ratas, a administração de leptina exógena interfere no desenvolvimento do folículo dominante e na sua ovulação (Duggal et al., 2000). Já a adiponectina diminui a esteroidogênese induzida por insulina e aumenta a proliferação de células da granulosa bovina cultivadas induzida por fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (Maillard et al., 2010). Além disso, concentrações elevadas de ácidos graxos livres no fluido folicular estão associadas à redução das taxas de maturação e fertilização dos oócitos e baixa qualidade de embriões em bovinos (Leroy et al., 2005), camundongos (Wu et al., 2010) e humanos (Jungheim et al., 2011).

Embora o aumento de triglicerídeos intracelulares possa ser benéfico para a criotolerância (Carro et al., 2013), o excesso de lipídios pode levar ao estresse do retículo endoplasmático, à redução da função mitocondrial e à

lipotoxicidade (Wu et al., 2010). O estresse do retículo endoplasmático, por sua vez, prejudica a maturação oocitária (Yang et al., 2012), o potencial mitocondrial e o desenvolvimento embrionário (Wu et al., 2012).

Quanto às citocinas, o aumento nos níveis de TNF-α inibe a esteroidogênese e a ovulação em diversas espécies (Terranova, Rice, 1997). O aumento de IL-1β em folículos de mulheres com luteinização prematura, em comparação com folículos normais (Chen et al., 1995), bem como o efeito estimulatório dessa citocina na biossíntese ovariana de prostaglandina E2 (PGE2) e prostaglandina F2 alfa (PGF2α) em dispersos ovarianos de ratas (Kokia et al., 1992) indicam sua participação na ovulação e na luteinização (Sessions-Bresnahan, Carnevale, 2014). Paralelamente, o excesso de IL-6 suprime a função reprodutiva, inibindo a ovulação, a síntese de estradiol e a atividade da aromatase em células da granulosa de ratas e mulheres (Gosman et al., 2006).

Por fim, o estudo de Sessions-Bresnahan e Carnevale (2014) demonstrou que éguas com SME apresentam ou tendem a apresentar aumento nos níveis de insulina, leptina, IL-1β e TNF-α, e redução da adiponectina, tanto no soro quanto no fluido folicular. Esses achados indicam que o ambiente intrafolicular na égua é fortemente influenciado por doenças metabólicas. Entretanto, não foram investigados nesse estudo os possíveis impactos da SME no desenvolvimento folicular e na maturação oocitária. Cabe notar que, em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*, concentrações mais baixas de leptina no fluido folicular são um marcador de sucesso na reprodução assistida (Spicer et al., 1993).

2.4 Uso do acetato de deslorelina na reprodução equina

A acentuada variabilidade na duração do estro e a dificuldade em predizer com precisão o momento da ovulação na égua levaram ao desenvolvimento de métodos para o controle do ciclo estral e da ovulação (Melo et al., 2012). Tais métodos baseiam-se na administração de agentes indutores da ovulação quando é detectada a presença de um folículo dominante de pelo menos 35 mm e edema uterino de graus 3 e 4 (Silva et al., 2016).

Os principais agentes indutores da ovulação em éguas são a gonadotrofina coriônica humana (hCG), o acetato de deslorelina (Greco, 2016)

e o acetato de histrelina (Morrissey et al., 2019). A hCG atua mimetizando as ações biológicas do LH, enquanto os acetatos de deslorelina e histrelina classificam-se como análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e estimulam a liberação de LH pela adeno-hipófise (Alvarenga et al., 2001; Gomes et al., 2014; Morrissey et al., 2019).

Quimicamente, o acetato de deslorelina é um hormônio peptídico análogo do GnRH (Gomes et al., 2014), eficaz na indução da ovulação de folículos pré-ovulatórios por estimular a liberação de LH na hipófise anterior (Campbell, 2012). Trata-se de um fármaco amplamente utilizado que apresenta a vantagem de manter sua eficácia mesmo após administrações repetidas (Ferris et al., 2012). Essa característica o diferencia da hCG, que pode induzir a formação de anticorpos anti-hCG, com consequente perda da eficácia farmacológica em tratamentos subsequentes (Figueiredo et al., 2011).

Protocolos experimentais com GnRH para indução do estro e da ciclicidade em éguas em anestro tem sido associados a ovulações múltiplas em parte das éguas tratadas. Nesse sentido, a administração de 100 µg intramuscular (IM) de acetato de deslorelina a cada 12 horas, na presença de pelo menos dois folículos com diâmetro entre 20 e 24 mm, foi capaz de induzir dupla ovulação em 82% das éguas, em comparação com 0% do grupo controle (Nagao et al., 2012). Posteriormente, a administração de baixas doses de deslorelina também foi associada à indução de múltiplas ovulações em éguas, com ocorrência de ovulações múltiplas em 100% dos animais tratados (Azevedo et al., 2015). Além disso, Bertoldi et al. (2018) observaram ovulação dupla em 70% das éguas tratadas exclusivamente com deslorelina.

A resposta ao acetato de deslorelina fundamenta-se no aumento da secreção endógena de FSH e LH, sendo que o aumento nos níveis de FSH promove o crescimento folicular, uma vez que este hormônio é responsivo a aplicações exógenas de análogos de GnRH (Ginther, Bergfeldt, 1990).

Entretanto, em diversas espécies, a administração contínua de altas doses de um agonista de GnRH induz uma hipersecreção inicial de gonadotrofinas, seguida pela dessensibilização da hipófise e redução da secreção hormonal - fenômeno conhecido como *downregulation* (Irvine, Alexander, 1993). Nagao et al. (2012) observaram que tratamentos por período mais curto (3 dias) favoreceram a ocorrência de ovulações duplas sem

desencadear o *downregulation.*

Em razão desse fenômeno, implantes de liberação lenta de deslorelina estimulam uma liberação inicial de gonadotrofinas, mas a subsequente regulação negativa dos receptores de GnRH na hipófise pode suprimir a função sexual (Goericke-Pesch, 2017). Estudos com pôneis da raça Shetland demonstraram supressão do estro e comportamento estral após tratamento com tais implantes. O intervalo médio entre a colocação do dispositivo e a primeira ovulação foi de 40 dias para o implante de 4,7 mg e de 90 dias para o de 9,4 mg, em comparação com apenas 20 dias no grupo controle (Kaps et al., 2021).

De maneira semelhante, intervalos interovulatórios prolongados podem ocorrer em éguas tratadas com implante de 2,1 mg de deslorelina para indução da ovulação (Farquhar et al., 2001; Johnson et al., 2002; McCue et al., 2002). Esse tratamento também foi associado à redução nas concentrações plasmáticas de FSH e alterações significativas na população folicular ovariana, com predominância de folículos com diâmetro inferior a 15 mm (Farquhar et al., 2002). Tais resultados são interessantes para a técnica de aspiração transvaginal (OPU) e subsequente ICSI, já que, em equinos, as taxas de recuperação de oócitos são consideravelmente maiores em folículos com diâmetro <15mm do que em folículos maiores (Alm et al., 1997).

Contudo, ainda não há estudos sobre os efeitos da administração de doses baixas de acetato de deslorelina a cada 12 horas sobre a população de folículos antrais e os níveis séricos de FSH em éguas idosas submetidas à OPU.

2.5 Aspiração folicular em éguas

Historicamente, diferentes técnicas de coleta de oócitos *in vivo* foram propostas, incluindo a aspiração do folículo pré-ovulatório através da exteriorização dos ovários (Vogelsang et al., 1988) e a aspiração por via transcutânea pelo flanco (McKinnon et al., 1986; Palmer et al., 1987). Contudo, um marco importante ocorreu quando Bruck et al. (1992) demonstraram a viabilidade da técnica de lavagem e aspiração folicular guiada por ultrassonografia via transvaginal em éguas. Nesse estudo, os autores realizaram a punção de quatro folículos pré-ovulatórios e, embora apenas um oócito tenha sido recuperado, o método foi considerado adequado para recuperação oocitária *in vivo*.

O uso de técnicas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) favorece o aproveitamento de fêmeas subférteis que não alcançam êxito na produção de embriões *in vivo*, de fêmeas em idade avançada (Fernandes et al., 2006; McKinnon, Squires, 2007) e de animais que não podem ter a atividade atlética interrompida, maximizando a eficiência reprodutiva (McKinnon, Squires, 2007).

Procedimentos de reprodução assistida, como a coleta de oócitos, a ICSI e o cultivo de embriões, foram desenvolvidos para uso clínico em equinos e humanos. Esses avanços permitem o estudo detalhado do oócito e fornecem oportunidades para avaliar os efeitos deletérios do envelhecimento materno sobre os gametas (Carnevale et al., 2020).

Atualmente, a coleta de oócitos associada à ICSI é utilizada rotineiramente para a obtenção de proles de éguas geneticamente valiosas e/ou de baixa fertilidade (Scarlet et al., 2025). Com os avanços recentes, cerca de 60 a 70% dos oócitos recuperados atingem a metáfase II (MII) após a maturação *in vitro* (MIV) (Papas et al., 2021; Fonte et al., 2024). Posteriormente, cerca de 20 a 30% desses oócitos em MII se tornam blastocistos após a ICSI (Lazzari et al., 2020; Fonte et al., 2024). Devido à grande variabilidade interindividual nos resultados, a própria égua é considerada o preditor de sucesso mais confiável (Cuervo-Arango et al., 2019a), embora o fator garanhão também influencie os índices de produção e não deva ser ignorado (Galli et al., 2016a).

A eficiência da OPU está relacionada à disponibilidade de folículos para aspiração, às taxas de recuperação oocitária, maturação *in vitro* e formação de blastocistos. O número total de oócitos submetidos à maturação *in vitro* correlaciona-se com o número de folículos aspirados, sendo esse um dos principais fatores associados ao rendimento da produção *in vitro* de embriões. Além disso, a taxa de recuperação oocitária é influenciada principalmente pelo tamanho dos folículos e pela experiência da equipe responsável pelo procedimento (Le Breton, Lewis, 2024).

O tamanho folicular, além de influenciar a taxa de recuperação oocitária, também está relacionado à maturação dos oócitos. Goudet et al. (1997) verificaram que a taxa de maturação nuclear e citoplasmática aumenta significativamente com o diâmetro folicular. Cuervo-Arango et al. (2019b) relataram que éguas cujos folículos aspirados eram todos menores que 10 mm apresentaram menor taxa de maturação oocitária (49,9%) em comparação com

éguas com maior proporção de folículos ≥10 mm (57-62%).

2.5.1 *Ovum pick-up*

Existem duas abordagens principais para a obtenção de oócitos da égua doadora: aspiração do folículo dominante estimulado, para recuperar um oócito maturado *in vivo* pouco antes da ovulação; ou a aspiração de todos os folículos imaturos nos ovários, sem necessidade de estimulação ovariana prévia. Nesse último caso, os oócitos imaturos recuperados devem ser submetidos à maturação *in vitro*. Biologicamente, o termo "maturado" refere-se ao oócito que retomou a meiose e atingiu a metáfase II, estágio em que adquire competência para fertilização. O oócito retoma a meiose em resposta ao sinal endógeno do LH ou após estimulação exógena com um análogo de GnRH ou de LH. Atualmente, a aspiração de folículos imaturos é o método mais eficiente para a rotina de ICSI (Hinrichs, 2018).

Para a seleção de doadoras, Lazzari et al. (2020) recomendaram a realização de ultrassonografia transretal 1 a 3 dias antes da OPU para avaliar o número e o tamanho dos folículos presentes nos ovários. Os autores relataram a importância de no mínimo 8 a 10 folículos >10 mm como limiar para a realização da OPU. No entanto, em algumas éguas idosas, esse número pode estar reduzido e, após algumas semanas de monitoramento, a OPU será realizada mesmo com a presença de apenas um folículo viável. Cabe ressaltar que a raça da égua influencia tanto a contagem folicular quanto as taxas de produção de embriões (Galli *et al*., 2014).

A aspiração de folículos imaturos pode ser realizada durante todo o ano. Embora os folículos sejam menores na estação não reprodutiva, o número de folículos presentes não difere daquele na estação reprodutiva (Hinrichs, Schmidt, 2000; Choi et al., 2016), e taxas normais de maturação e de blastocistos podem ser obtidas a partir de oócitos recuperados na estação não reprodutiva (Choi et al., 2016).

O protocolo para a realização da OPU exige que a fêmea esteja devidamente contida e em estação, sedada e com o reto vazio e o períneo higienizado (Carnevale et al., 2004; Rodrigues, 2006). Segundo Ramírez-Agámez et al. (2025), a higienização da região perineal deve ser rigorosa, utilizando solução de iodopovidona a 7,5%. A sedação consiste na combinação

de cloridrato de detomidina (0,04 mg/kg, intravenoso (IV), dose única) e tartarato de butorfanol (0,1 mg/kg, IV, dose única), podendo ser complementada com bolus de cloridrato de xilazina (0,6 mg/kg, IV) e maleato de acepromazina (0,05 mg/kg, IV) para prolongar a sedação (Ramírez-Agámez et al., 2025). Flunixina meglumina (1 mg/kg, IV) é administrada antes do procedimento devido à sua ação anti-inflamatória e analgésica (Branden et al., 2025), juntamente com o brometo de N-butil-hioscina (0,3 mg/kg, IV), que ser repetido conforme necessário para promover o relaxamento retal e auxiliar na manipulação dos ovários (Ramírez-Agámez et al., 2025).

Durante o procedimento, cada ovário é posicionado contra o fundo da parede vaginal para visualização dos folículos via transdutor ultrassonográfico convexo acoplada a uma guia de suporte, juntamente com a agulha de aspiração (Carnevale et al., 2004; Rodrigues, 2006). Os folículos são puncionados com agulha de aspiração calibre 12G (Lazzari et al., 2020) ou 16G (Mari et al., 2005), de duplo fluxo, sendo lavados repetidamente (8 a 10 vezes) com meio suplementado com heparina (5 UI/mL) para prevenir a coagulação do fluido folicular e do sangue (Lazzari et al., 2020). Uma particularidade da espécie equina é a forte adesão do complexo *cumulus*-oócito à parede folicular; portanto, em folículos imaturos, é necessário escarificar repetidamente a parede folicular para aumentar a recuperação oocitária (Hinrichs, 2018). A bomba de aspiração é calibrada com pressão variando entre 90 a 400 mmHg. Entretanto, pressão muito alta pode causar lesão e desnudamento nos oócitos (Rodrigues, 2006).

Após a coleta, o fluido é filtrado com um filtro para embriões (Lazzari et al., 2020), clarificado com 150 a 200 ml de meio (Rodriguez et al., 2021) e colocado em placa de Petri para rastreamento e classificação dos oócitos em estereomicroscópio. Após o rastreamento, os oócitos são transferidos para meios de cultura específicos, para posterior maturação *in vitro* (Carnevale et al., 2001; Preis et al., 2004). O transporte de oócitos imaturos é realizado a 22ºC por até 24 horas em meios de manutenção tamponados, sem perda da viabilidade (Choi et al., 2006; Galli et al., 2016b; Lazzari et al., 2020), permitindo que a coleta ocorra a campo e o envio seja feito a laboratórios distantes (Foss et al., 2013; Galli et al., 2016b). Contudo, deve-se evitar tanto o resfriamento excessivo (4-7ºC), que prejudica as taxas de maturação e de blastocisto (Diaw et al., 2018), quanto temperaturas acima de 30ºC, que induzem maturação precoce e deletéria

no meio de manutenção (Martino et al., 2014). Já os oócitos oriundos de folículos pré-ovulatórios precisam ser mantidos a 37ºC para evitar danos (Foss et al., 2013).

Os oócitos recuperados dos folículos imaturos encontram-se na prófase I da meiose, e podem ser manipulados e mantidos durante a noite em temperatura ambiente em meio de cultura simples, sem afetar a viabilidade ou o desenvolvimento do blastocisto (Choi et al., 2006; Foss et al., 2013). Devido a isso, há grande flexibilidade no momento de trabalhar com oócitos imaturos — eles podem ser colocados em maturação imediatamente ou mantidos durante a noite, ou até mesmo por até duas noites (Foss et al., 2013), antes de serem colocados em maturação, permitindo assim que a ICSI seja agendada em um momento conveniente (Hinrichs, 2018).

Diversos fatores influenciam as taxas de recuperação oocitária, como terapias hormonais com gonadotrofinas, fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra, tamanho do folículo e a experiência do profissional que irá realizar a técnica (Fernandes et al., 2006). Os oócitos de folículos em desenvolvimento resultam em baixos índices de recuperação (Deleuze et al., 2009) porque, em equinos, há uma camada de células da teca localizada abaixo da junção com o *cumulus*, gerando uma maior aderência do oócito à parede folicular (Carnevale et al., 2004). No entanto, à medida que o folículo se desenvolve, o índice de recuperação aumenta devido ao afrouxamento das junções entre as células do *cumulus* e a parede folicular (Fernandes et al., 2006). Isso ocorre devido ao aumento dos níveis de LH quando há folículos pré-ovulatórios ou pela administração exógena de hormônios (Carnevale et al., 2004).

O procedimento de OPU geralmente é bem tolerado em éguas (Jacobson et al., 2010; Lazzari et al., 2020), podendo ser repetido a cada duas semanas no manejo de rotina (Jacobson et al., 2010). Hinrichs (2018) relata não administrar antibióticos nas éguas de pesquisa, as quais são aspiradas a cada 14 dias durante todo o ano, para prevenir o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos. No entanto, éguas de clientes que são aspiradas poucas vezes ao ano recebem antibiótico de amplo espectro. Complicações como abscesso ovariano, peritonite e óbito são possíveis após a OPU (Vanderwall, Woods, 2002; Bøgh et al., 2003; Velez et al., 2012) devido à translocação bacteriana da vagina para o peritônio e ovário durante as múltiplas

punções. Todavia, tentativas de “limpar” a vagina, por exemplo, com iodopovidona diluído, não devem ser realizadas, pois os antimicrobianos são tóxicos para os oócitos (Hinrichs, 2018).

2.6 Maturação *in vitro*

Os primeiros registros de maturação *in vitro* de oócitos equinos foram relatados por Fulka e Okolski (1981), onde coletaram oócitos de ovários oriundos de abatedouros e maturaram *in vitro* em intervalos de cultivo de 20 a 24 horas e 40 horas, sendo que esse último apresentou melhores resultados.

Para que ocorra o desenvolvimento embrionário, é necessário que o oócito passe pelo processo de maturação, que envolve alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, incluindo a retomada da meiose até a fase de MII (Landim-Alvarenga, Maziero, 2014). O processo de maturação citoplasmática envolve redistribuição e mudanças morfológicas das organelas celulares (Crocomo et al., 2011), enquanto a maturação molecular caracteriza-se pela produção e armazenamento de RNA mensageiro (RNAm), essencial para a síntese proteica futura (Landim-Alvarenga, Maziero, 2014). A maturação nuclear compreende a quebra da vesícula germinativa, a reorganização e a segregação cromossômica (Crocomo et al., 2011), resultando na formação do primeiro corpúsculo polar. A presença desse corpúsculo é um dos critérios para identificar o oócito que atingiu a MII (Grøndahl, 1995; Curcio et al., 2006).

Em muitas espécies de mamíferos, incluindo equinos e humanos, os oócitos oriundos de folículos imaturos cultivados *in vitro* levam de 24 a 38 horas para atingir a MII, dependendo da espécie, por meio do procedimento conhecido como MIV (Benammar et al., 2021). No entanto, oócitos de humanos destinados à FIV convencional são normalmente maturados *in vivo*, após a estimulação hormonal (Youssef et al., 2016).

De acordo com Lazzari et al. (2020), os oócitos equinos transportados em temperaturas de 18 a 22ºC por 18 a 24 horas são imediatamente transferidos para o meio de maturação por 26 a 30 horas, a 38ºC com 5% de CO_2. De acordo com Hinrichs et al. (2005), a duração necessária da cultura de MIV é de 24 a 30 horas para oócitos com *cumulus* expandido e de 30 a 36 horas para oócitos com *cumulus* compacto. Entretanto, como a técnica de OPU frequentemente ocasiona a perda parcial dessas células, dificultando a classificação morfológica

(Dell'Aquila et al., 2001), a maioria dos protocolos padroniza um período de maturação de 28 a 30 horas para todos os oócitos coletados (Dell'Aquila et al., 2003; Choi et al., 2007; Nelis et al., 2012; Foss et al., 2013; Hinrichs et al., 2014; Martino et al., 2014).

Em equinos, a composição dos meios de maturação difere entre laboratórios (Hinrichs, 2018; Lazzari et al., 2020). Lazzari et al. (2020) descrevem o meio de maturação como uma mistura (1:1) de Ham's F12 e *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com gonadotrofinas (0,1 UI/mL de FSH e 0,1 UI/mL de LH), fator de crescimento epidérmico (EGF) (50 ng/mL), 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino e suplemento de insulina-transferrina-selênio. Hinrichs (2018) utilizou o meio de cultura celular TCM-199 com 10% de soro fetal bovino e 5 mU/ml de FSH. Galli et al. (2007) encontraram uma taxa de blastocisto mais alta quando um meio de maturação à base de DMEM/F-12 foi usado. Mesmo com as variações laboratoriais, Maserati e Mutto (2016) observaram em sua pesquisa que todos os meios continham pelo menos FSH. O meio usado pelos autores continha LH (0,5 µg/mL), FSH (0,5 µg/mL), EGF (0,5 ng/mL) e IGF-1 (100 ng/mL).

Os complexos *cumulus*-oócito são cultivados em gotas de 150 µL de meio de maturação equilibrado, sob óleo mineral leve, respeitando-se a densidade de no máximo 15 oócitos por gota (Salgado et al., 2018). Após a incubação, os oócitos são submetidos ao desnudamento em meio contendo hialuronidase (2,5 µg/mL) e, em seguida, pipetados para remoção mecânica das células do *cumulus*. Os oócitos desnudos que se encontrem em MII retornam ao meio de lavagem até o momento da ICSI (Lazzari et al., 2020).

Por fim, uma característica relevante é que, embora possuam diâmetro similar aos humanos (110-120 µm) (Kiessling, 2007; Altermatt et al., 2009), os oócitos equinos apresentam quantidade elevada de lipídios intracitoplasmáticos. Esses lipídios tendem a se polarizar durante a maturação nuclear (Ambruosi et al., 2009), conferindo ao citoplasma uma aparência mais escura, o que dificulta a obtenção de imagens (Carnevale et al., 2020).

2.7 Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

A ICSI consolidou-se como procedimento de reprodução assistida de eleição em equinos (Benammar et al., 2021), devido às particularidades

biológicas da espécie, como o endurecimento da ZP em oócitos maturados *in vitro*, além da incidência de poliespermia após a retração da ZP (Choi et al., 1994) e a dificuldade em obter espermatozoides capacitados que consigam penetrar os oócitos maturados *in vitro* (Alm et al., 2001). Assim, a microinjeção se torna essencial para viabilizar a produção *in vitro*, especialmente em casos de subfertilidade de machos ou fêmeas, ou disponibilidade limitada de sêmen (Benammar et al., 2021). O primeiro relato da técnica na espécie foi realizado por Squires et al. (1996), enquanto a eficácia no cultivo até o estágio de blastocisto foi descrita por Hinrichs et al. (2005) e sua aplicação clínica por Colleoni et al. (2007).

A técnica otimiza o aproveitamento de sêmen congelado, uma vez que apenas um espermatozoide é selecionado para fertilizar cada oócito (Hinrichs, 2018). A preparação das amostras pode ser realizada por *swim-up* ou centrifugação em gradiente de densidade, dependendo da tolerância individual do garanhão ao processamento (Lazzari et al., 2020). Independentemente do método, o *pellet* resultante é ressuspendido em meios específicos, como o fluido ovidutal sintético (SOF-FIV) modificado ou meio de cultivo tamponado com MOPS (GMOPS) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Lazzari et al., 2002; Salgado et al., 2018).

Para a execução da microinjeção, a motilidade espermática é reduzida pela imersão em uma solução de álcool polivinilpirrolidona (PVP) (7%–10%) permitindo a seleção de gametas móveis e morfologicamente normais (Hinrichs, 2018), o que favorece a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Maserati, Mutto, 2016). Uma etapa importante que antecede a injeção é a ruptura da membrana plasmática do espermatozoide através da manipulação da cauda com a micropipeta. Esse procedimento é importante para a imobilização e liberação de fatores de ativação oocitária presentes no colo e na cauda do espermatozoide (Saunders et al., 2002; Hinrichs et al., 2007; Kashir et al., 2011; Sanusi et al., 2015).

A ICSI equina pode ser realizada com uma micropipeta convencional (biselada) ou piezoelétrica (Hinrichs, 2018). Na abordagem convencional, a agulha perfura a ZP e penetra no oolema, sendo então realizada uma aspiração delicada para romper a membrana plasmática antes da injeção (Maserati, Mutto, 2016). Já o sistema piezoelétrico, mais comum atualmente, utiliza pulsos

elétricos para causar mudanças conformacionais em cristais na agulha romba. O resultado final dessas mudanças é um impulso para frente que causa uma perfuração na zona pelúcida e na membrana citoplasmática (Choi et al., 2002; Lazzari et al., 2020). Embora as taxas de blastocistos sejam similares entre os métodos, a ICSI piezoelétrica tem demonstrado produzir embriões com melhor qualidade (Salgado et al., 2018).

Durante o procedimento, o oócito é fixado por uma agulha de retenção e orientado de forma que o corpúsculo polar fique na posição de 6 ou 12 horas (Salgado et al., 2018). Esse posicionamento é importante para garantir que o fuso meiótico, localizado próximo ao corpúsculo, não seja danificado quando a agulha de injeção penetrar lateralmente, na posição de 3 ou 9 horas (Palermo et al., 1995; Maserati, Mutto, 2016).

Após a injeção, os oócitos são transferidos para meios de cultura embrionária, como o meio Global ou SOF-CIV modificado, sob atmosfera controlada (5 a 6% de CO_2 e 5% de O_2) a 38,2ºC (Lazzari et al., 2002; Salgado et al., 2018). A clivagem é avaliada entre os dias 2 e 5 (Salgado et al., 2018; Lazzari et al., 2020), e o desenvolvimento até blastocisto é monitorado até o dia 9, momento em que os embriões com boa morfologia e trofoblasto nítido são selecionados para transferência ou criopreservação (Lazzari et al., 2020).

Contudo, a eficiência final de todo o processo é influenciada pela idade da doadora. O impacto negativo do envelhecimento materno é evidente quando as mulheres doam oócitos para a ICSI ou para a fertilização *in vitro* (FIV) convencional (Grøndal et al., 2017). Assim como em humanos, o envelhecimento materno em equinos compromete o potencial de desenvolvimento dos gametas. Frank et al. (2019) observaram que, embora as taxas de clivagem inicial possam não ser afetadas pela idade da doadora, as taxas de gestação reduziram e as perdas gestacionais aumentaram linearmente com o avançar da idade. A perda de gestação foi aproximadamente 60% maior em éguas de 24 a 27 anos em comparação com éguas de 3 a 13 anos, sugerindo que embriões de éguas idosas têm potencial de desenvolvimento comprometido.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A senescência reprodutiva na égua não é um evento isolado, mas uma combinação multifatorial em que o declínio da reserva ovariana é agravado por

alterações metabólicas sistêmicas. A SME é um fator crítico, uma vez que a desregulação insulínica e o estado inflamatório crônico afetam não apenas a saúde da égua, mas também exercem efeitos deletérios diretos sobre o ambiente folicular e a competência meiótica oocitária. Assim, a subfertilidade observada em doadoras idosas com SME é o reflexo de alterações na sinalização hormonal e na qualidade dos gametas, o que exige o desenvolvimento de protocolos específicos de reprodução assistida.

A liberação de FSH e LH por meio da administração de análogos de GnRH, como o acetato de deslorelina, tem se mostrado uma estratégia promissora para controlar a dinâmica folicular em éguas. A administração de doses baixas e fracionadas, por até 5 dias, surge como uma estratégia para estimular o crescimento folicular sem comprometer a responsividade da hipófise a longo prazo através do *downregulation*.

Por fim, o estudo de protocolos hormonais, aliado à ICSI, é um possível caminho para contornar os efeitos deletérios da senescência reprodutiva e aumentar as taxas de maturação oocitária e de blastocisto em éguas idosas.

4. HIPÓTESE E OBJETIVOS

4.1. Hipóteses

A Síndrome Metabólica Equina (SME) altera a dinâmica de crescimento folicular em éguas idosas, o que se reflete no número de folículos disponíveis para aspiração, na taxa de crescimento folicular e nos intervalos entre aspirações.

A SME reduz a eficiência de recuperação oocitária e a taxa de maturação oocitária *in vitro* em éguas idosas.

A administração de baixas doses de acetato de deslorelina (125 µg a cada 12 horas), após a emergência da onda e mantida durante o crescimento folicular comum, modifica a dinâmica folicular. Espera-se que esse tratamento aumente a disponibilidade de folículos para aspiração, altere os intervalos entre a emergência da onda, o tratamento e a OPU e favoreça a maturação oocitária *in vitro*.

A resposta à administração de deslorelina difere entre éguas com e sem SME, o que resulta em alterações distintas na dinâmica folicular, na recuperação oocitária e na taxa de maturação oocitária *in vitro*.

4.2. Objetivo geral

Avaliar o efeito de baixas doses de acetato de deslorelina sobre a dinâmica folicular e as taxas de recuperação e maturação oocitária *in vitro* em éguas idosas com e sem SME.

4.3. Objetivos específicos

Monitorar a dinâmica folicular por meio de ultrassonografia transretal para determinar o efeito do *status* metabólico e do protocolo de baixas doses de deslorelina sobre o recrutamento e a dinâmica de crescimento dos três maiores folículos;

Comparar os índices de eficiência da OPU: número de folículos aspirados, número de oócitos recuperado e taxa de recuperação oocitária entre éguas com e sem SME, submetidas ou não ao tratamento com deslorelina;

Comparar a taxa de maturação oocitária *in vitro* entre éguas com e sem SME, submetidas ou não ao tratamento com deslorelina;

5. REFERÊNCIAS*

ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S.; NURNBERG, G.; KANITZ, W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 56, p. 817-829, 2001.

ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; BECKER, F.; HINRICHS, K. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. **Equine Veterinary Journal Suppl**., v. 25, p. 47-50, 1997.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A.; CONLEY, A.J.; PLACE, N.J.; LIU, I.K.; SCHOLTZ, E.L.; MATHEWSON, L.; STANLEY, S.D.; MOELLER, B.C. Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. **Theriogenology**, v. 76, p. 1393-1403, 2011.

ALTERMATT, J.L.; SUH, T.K.; STOKES, J.E.; CARNEVALE, E.M. Effects of age and equine follicle-stimulating hormone (eFSH) on collection and viability of equine oocytes assessed by morphology and developmental competency after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 615-623, 2009.

ALVARENGA, M.A.; MCCUE P.M; BRUEMMER J.; NEVES NETO, J.R.; SQUIRE, E.R. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v. 56, p. 879-887, 2001.

* Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 74p.

ALVIGGI, C.; HUMAIDAN, P.; HOWLES, C.M.; TREDWAY, D.; HILLIER, S.G. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 101, 2009.

AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G.M.; IORGA, A.I.; DE SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, v. 71, p. 1093-1104, 2009.

ARGO, C.M.; CURTIS, G.C.; GROVE-WHITE, D.; DUGDALE, A.H.A.; BARFOOT, C.F.; HARRIS, P.A. Weight loss resistance: a further consideration for the nutritional management of obese Equidae. **The Veterinary Journal**, v. 194, p. 179-188.

AZEVEDO, M.V., SOUZA, N.M.; FERREIRA-SILVA, J.C.; BATISTA, I.O.; MOURA, M.T.; OLIVEIRA, M.A.L.; ALVARENGA, M.A.; LIMA, P.F. 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.

BABAYEV, E.; SELI, E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. **Current Opinion Obstetric and Gynecology**, v. 27, p. 175-181, 2015.

BAILEY, S.R.; HABERSHON-BUTCHER, J.L.; RANSOM, K.J.; ELLIOT, J.; MENZIES-GOW, N.J. Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 122-129, 2008.

BAKER T. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 158, p. 417-433, 1963.

BALABAN, B.; URMAN, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p. 608-615, 2006.

BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; HILLMAN, R.B.; WOODS, G.L. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v. 26, p. 611-619, 1986.

BENAMMAR, A.; DERISOUD, E.; VIALARD, F.; PALMER, E.; AYOUBI, J.M.; POULAIN, M.; CHAVATTE-PALMER, P. The mare: a pertinent model for human assisted reproductive technologies? **Animals**, v.11, p. 2304, 2021.

BENTOV, Y.; CASPER, R.F. The aging oocytedcan mitochondrial function be improved? **Fertility and Sterility**, v. 99, p. 18-22, 2013.

BENTOV, Y.; YAVORSKA, T.; ESFANDIARI, N.; JURISICOVA, A.; CASPER, R.F. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v. 28, p. 773-783, 2011.

BERTOLDI, A.; SEGABINAZZI, L.G.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Association of deslorelin and sulpiride for double ovulation induction in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 70, p. 48-51, 2018.

BØGH, I.B.; BRINK, P.; JENSEN, H.E.; LEHN-JENSEN, H.; GREVE, T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 575–579, 2003.

BRANDEN, E.V.; SALAMONE, M.; BROOTHAERS, K.; PEERE, S.; POLFLIET, E.; DEWULF, M.; STEENKISTE, G.V.; VAN LOON, G.; SMITS, K.; GOVAERE, J. Physiological and behavioral parameters of pain and stress in mares during and after transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration. **Frontiers in Veterinary Science**, v.12, p.1574351, 2025.

BROEKMANS, F.J.; KNAUFF, E.A.H.; VELDE, E.R.T.; MACKLON, N.S.; FAUSER, B.C. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 18, p. 58-65, 2007.

BRÜCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Veterinary Journal**., v. 24, p. 58-59, 1992.

BURATINI, J.; DELLAQUA, T.T.; DAL CANTO, M.; LA MARCA, A.; CARONE, D.; RENZINI, M.M.; WEBB, R. The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence: from fertility prognosis to mechanisms underlying age-related subfertility. **Human Reproduction Update**, v. 28, p. 232-254, 2022.

BURNS, T. Effects of common Equine endocrine diseases on reproduction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 32, p. 435-449, 2016.

CADARIO, M.; ARCHBALD L. Effect of endocrinopathies on fertility in the mare. Part 1: Equine metabolic syndrome. **Clinical Theriogenology**, v. 14, p. 219-223, 2022.

CAMPBELL, M. It is all in the timing: ovulation induction in the mare. **Veterinary Record**, v.170, p. 538-539, 2012.

CAMPOS-CHILLON, F.; FARMERIE, T.A.; BOUMA, G.J.; CLAY, C.M.; CARNEVALE, E.M. Effects of aging on gene expression and mitochondrial DNA in the equine oocyte and follicle cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 925-933, 2015.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 31, p. 287-299, 1993.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.; GINTHER, O.J. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 231-246, 1994.

CARNEVALE, E.M.; CATANDI, G.D.; FRESA, K. Equine Aging and the Oocyte: A Potential Model for Reproductive Aging in Women. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103022, 2020.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 519–527, 2005.

CARNEVALE, E.M.; FRANK-GUEST, B.L.; STOKES, J.E. Effect of equine

oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 258-259, 2010.

CARNEVALE, E.M.; GINTER O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 209-214, 1995.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.; SILVA, M.; CHECURA, C.; SCOGGIN, C.; SQUIRES, E. Equine sperm–oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 305-314, 2001.

CARNEVALE, E.M.; SILVA, M.A.C.; MACLELLAN, L.J.; SEIDEL, G.E.; SQUIRES, E.L. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. **Reproduction**, v. 128, p. 623-628, 2004.

CARNEVALE, E.M. The Mare as an Animal Model for Reproductive Aging in the Woman. In: SCHATTEN, H.; CONSTANTINESCU, G.M. **Animal models and human reproduction**. 1ª ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2017, p. 235-242.

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.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; KING, S.S.; SCHMITT, S.J.; GATES, H.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. **Theriogenology**, v. 51, p. 299, 1999.

CARRO, M.; BUSCHIAZZO, J.; RIOS, G.L.; ORESTI, G.M.; ALBERIO, R.H. Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, p. 687-694, 2013.

CARTER, R.A.; TREIBER, K.H.; GEOR, R.J.; DOUGLASS, L.; HARRIS, P.A. Prediction of incipient pasture- associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, p. 171-178, 2009.

CHEN, H.F.; HO, H.N.; CHEN, S.U.; CHAO, K.H.; LIN, H.R.; HUANG, S.C.; LEE, T.Y.; YANG, Y.S. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) is increased in the follicular fluids of patients with premature luteinization. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 34, p. 356–362, 1995.

CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; CHUNG, Y.G.; VARNER, D.D.; WESTHUSIN, M.E.; BURGHARDT, R.C.; HINRICHS, K. Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 561-567, 2002.

CHOI, Y.H.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 38-47, 2007.

CHOI, Y.H.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection.

Theriogenology, v. 66, p. 955-963, 2006.

CHOI, Y.H.; OKADA, Y.; HOCHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI, N. In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. **Theriogenology**, v. 42, p. 795-802, 1994.

CHOI, Y.H.; VELEZ, I.C.; MACIAS-GARCIA, B.; RIERA, F.L.; BALLARD, C.S.; HINRICHS, K. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. **Theriogenology**, v. 85, p. 1289–1296, 2016.

CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J.J.; CONLEY, A.J.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The interrelationship between anti-müllerian hormone, ovarian follicular populations, and age in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, p. 537-541, 2015.

CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ROSER, J.F.; WOODWARD, E.M.; DAVOLLI, G.M.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. **Theriogenology**, v. 97, p. 34-40, 2017.

CLAES, A.; CUERVO-ARANGO, J. VAN DEN BROEK, J.; GALLI, C.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; DEELEN, C.; BEITSMA, M.; STOUT, A. Factors affecting the likelihood of pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved in vitro produced equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, p. 446-450, 2019.

COLLEONI, S.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; DUCHI, R.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 554–559, 2007.

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 542-552, 2011.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.N.; STOUT, T.A. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. **Theriogenology**, v. 132, p. 36–44, 2019a.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, p. 1894-1903, 2019b.

CURCIO, B.R.; FREY JR., F.; BOFF, A.L.N.; LEON, P.M.M.; LINS, L.A.; ALBUQUERQUE, L.P.; RAMBO, G.; NOGUEIRA, C.A.W.; DESCHAMPS, J.C. Recuperação de oócitos eqüinos com *Cumulus* oophorus compacto por curetagem da parede folicular. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 417-422, 2006.

DELEUZE, S.; GOUDET, G.; CAILLAUD, M.; LAHUEC, C.; DUCHAMP, G. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. **Theriogenology**, v. 72, p. 203-209, 2009.

DELL'AQUILA, M.E.; ALBRIZIO, M.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; HINRICHS, K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (icsi) as related to granulosa cell apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2065-2072, 2003.

DELL'AQUILA, M.E.; MASTERSON, M.; MARITATO, F.; HINRICHS, K. Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 79-88, 2001.

DIAW, M; SALGADO, R.M.; CANESIN, H.S.; GRIDLEY, N.; HINRICHS, K. Effect of different shipping temperatures (~22ºC vs. ~7ºC) and holding media on blastocyst development after overnight holding of immature equine *cumulus*-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 111, p. 62–68, 2018.

DONALDSON, M.T.; LAMONTE, B.H.; MORRESEY, P.; SMITH, G.; BEECH, J. Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). **Journal of Veterinary Internal Medicine**., v. 16, p.742–746, 2002.

DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, 1996.

DRIANCOURT, M.A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J.C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 22, p. 1035-1047, 1982.

DRUMOND, B.; GINELLI, A. M. G.; FALEIROS, R. R.; MAGALHÃES, J.F.; COELHO, C.S. Hoof capsule distortion and radiographic measurements of the front feet in Mangalarga Marchador horeses subjected to athletic training. **Pferdeheilkundle**, v. 31, p. 110–118, 2016.

DUGGAL, P.S.; VAN DER HOEK, K.H.; MILNER, C.R.; RYAN, N.K.; ARMSTRONG, D.T.; MAGOFFIN, D.A.; NORMAN, R.J. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. **Endocrinology**, v. 141, p.1971–1976, 2000.

DUPONT, J.; SCARAMUZZI, R. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. **Biochemical Journal**, v.473, p. 1483-1501, 2016.

DURHAM, A.E.; FRANK, N.; MCGOWAN, C.; MENZIES-GOW, N.J.; ROELFSEMA, E.; VERVUERT, I., FEIGE, K.; FEY, K. ECEIM consensus statement on Equine Metabolic Syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, p. 335-349, 2019.

DURLINGER, A.L.L.; GRUIJTERS, M.J.G.; KRAMER, P.; KARELS, B.; KUMAR, T.R.; MATZUK, M.M.; ROSE, U.M.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.J.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P.N. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 142, p. 4891-4899, 2001.

DURLINGER, A.L.L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F.H.;

UILENBROEK, J.T.J.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P.N. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, p. 5789-5796, 1999.

EICHENLAUB-RITTER, U. Oocyte ageing and its cellular basis. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, p. 841-852, 2012.

EICHENLAUB-RITTER, U. VOGT, E.; YIN, H.; GOSDEN, R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 8, p. 45-58, 2004.

EL-FOULY, M.A.; COOK, B.; NEKOLA, M.; NALBANDOV, A.V. Role of the ovum in folicular luteinization. **Endocrinology**, v. 87, p. 286–293, 1970.

FARQUHAR, V.J.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Deslorelin acetate (Ovuplant) therapy in cycling mares: Effect of implant removal on FSH secretion and ovarian function. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 417-420, 2002.

FARQUHAR, V.J.; MCCUE, P.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Effect of deslorelin acetate on gonadotropin secretion and ovarian follicle development in cycling mares. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 749-752, 2001.

FERNANDES, C.; PERES, K.; ALVARENGA, M.; LANDIM-ALVARENGA, F. The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, p. 159-167, 2006.

FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, A.R.G.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Efficacy of deslorelin acetate (sucromate) on induction of ovulation in American Quarter Horse mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 285-288, 2012.

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUÉRIF, F.; ROYÈRE, D. Le dialogue ovocyte–*cumulus*. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, p. 793-800, 2006.

FIGUEIREDO, T.; PAIVA, R.; KOZICKI, L.E.; KAERCHER, F.; WEISS, R.R.; DOS SANTOS, I.W.; MURADAS, P. Induction of ovulation in quarter horse mares through the use of deslorelin acetate and human chorionic gonadotrophin (hCG). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 5, p. 517-521, 2011.

FITZGERALD, B.P.; REEDY, S.E.; SESSIONS-BRESNAHAN, D.R.; POWELL, D.M.; MCMANUS, C.J. Potential signals mediating the maintenance of reproductive activity during the non-breeding season of the mare. Reproduction Supplement, v. 59, p. 115-129, 2002.

FONTE, J.S.; ALONSO, M.A.; MASERATI JUNIOR, M.P.; GONÇALVES, M.A.; PONTES, J.H.; BORDIGNON, V.; DAGHER, P. Successful equine in vitro embryo production by ICSI – effect of season, mares' age, breed, and phase of the estrous cycle on embryo production. **Theriogenology**, v. 23, p. 47–52, 2024.

FOSS, R.; ORTIS, H.; HINRICHS, K. Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse: Transport

of equine oocytes for ICSI. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, p. 39-43, 2013.

FRANK, B.L.; DODDMAN, C.D.; STOKES, J.E.; CARNEVALE, E.M. Association of equine oocyte and cleavage stage embryo morphology with maternal age and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, p. 1812-1822, 2019.

FRANK, N.; ELLIOTT, S.B.; BRANDT, L.E.; KEISLER, D.H. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, p. 1383-1390, 2006.

FRANK, N. Managing equine metabolic syndrome. **Compendium Equine**, v. 3, p. 348-355, 2008.

FRANK, N.; GEOR, R. J.; BAILEY, S. R.; DURHAM, A.E.; JOHNSON, P.J. Equine Metabolic Syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 467–475, 2010.

FULKA, J.; OKOLSKI, A. Culture of horse oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 213-215, 1981.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; CLAES, A.; BEITSMA, M.; DEELEN, C.; NECCHI, D.; DUCHI, R.; LAZZARI, G.; STOUT, T.A.E. Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of Ovum Pick Up-ICSI and embryo cryopreservation technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 82, 2016b.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 39–55, 2007.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Male factors affecting the success of equine in vitro embryo production by ovum pickup-intracytoplasmic sperm injection in a clinical setting. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 43, p. S6–S10, 2016a.

GALLI, C.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G.; DUCHAMP, G.; DAELS, P.; LAZZARI, G. 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.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v. 81, p. 138–151, 2014.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W.; BEATTIE, A.E.; DAVIS, G.H.; RITVOS, O. Mutations in na oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, p. 279–283, 2000.

GEOR, R.J.; McCUE, M.E.; SCHULTZ, N. Current understanding of the equine metabolic syndrome phenotype. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 841-842, 2013.

GESINK LAW, D.C.; MACLEHOSE, R.F.; LONGNECKER, M.P. Obesity and time to pregnancy. **Human Reproduction**, v. 22, p. 414-420, 2007.

GINTHER, O.J., BERGFELDT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development during the existing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 119- 126, 1990.

GINTHER, O.J.; CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R. Delay in emergence of the ovulatory follicular wave in old mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, p. 75-79, 1993.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v. 71, p. 780-788, 2009.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 955-963, 2008.

GOERICKE-PESCH, S. Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behaviour. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 336-347, 2017.

GOMES, R.G.; OLIVEIRA, R.L.; SCHUTZER, C.GC.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M. M. Effect of deslorelin and/or human chorionic gonadotropin on inducing ovultion in mares during the transition period versus ovulatory season. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1140-1142, 2014.

GOSMAN, G.G.; KATCHER, H.I.; LEGRO, R.S. Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 585–601, 2006.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. 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.

GRECO, G.M. **Eficiência de diferentes agentes indutores da ovulação e associações sobre as características uterinas, ovarianas e concentrações plasmáticas de LH em éguas**. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinaria - Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

GRØNDAHL, M.L.; CHRISTIANSEN, S.L.; KESMODEL, U.S.; AGERHOLM, I.E.; LEMMEN, J.G.; LUNDSTRØM, P.; BOGSTAD, J.; RAASCHOU-JENSEN, M.; LADELUND, S. Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competenceda multicenter cohort study. **PLOS One**, v. 12, p. e0172456, 2017.

GRØNDAHL, C.; HØST, T.; BRÜCK, I.; VIUFF, D.; BEZARD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. In vitro production of equine embryos. Biology of

Reproduction, v. 1, p. 299-307, 1995.

HAAG, K.T.; MAGALHAES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, E.L.; GASTAL, E.L. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method. **Theriogenology**, v. 79, p. 599-609, 2013.

HART, K.A.; WOCHELE, D.M.; NORTON, N.A.; MCFARLANE, D.; WOOLDRIDGE, A.A.; FRANK, N. Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. **Journal of Veterinary Internal Medical**, v. 30, p. 653-663, 2016.

HEALY, D.L.; TROUNSON, A.O.; ANDERSEN, A.N. Female infertility: causes and treatment. **Lancet**, v. 343, p. 1539–44, 1994.

HELICZER, N.; GERBER, V.; BRUCKMAIER, R.; VAN DER KOLK, J.H.; DE SOLIS, C.N. Cardiovascular findings in ponies with equine metabolic syndrome. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 250, p. 1027-1035, 2017.

HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 4-13, 2018.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.; LOVE, C.; SPACEK, S. Use of in vitro maturation of oocytes, intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture to the blastocyst stage in a commercial equine assisted reproduction program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 176, 2014.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.; LOVE, L.; VARNER, D.; LOVE, C.; WALCKENAER, B. 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.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; VARNER, D.; HARTMAN, D.L. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. **Reproduction**, v. 134, p. 319-325, 2007.

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.

HYDE, K.A.; AGUIAR, F.L.N.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; GASTAL, G.D.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Preantral follicle population and distribution in the horse ovary. **Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 90-102, 2022.

IRELAND, J.L.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMMEN, A.P.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1219-1225, 2008.

IRVINE, C.H.G.; ALEXANDER, S.L. GnRH. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Filadelfia: Lea & Febiger, 1993, v. 25, p. 37–44.

JACOBSON, C.C.; CHOI, Y.-H.; HAYDEN, S.S.; HINRICHS, K. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation

after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 73, p. 1116-1126, 2010.

JOHANNES, C.B.; CRAWFORD, S.L. Menstrual bleeding, hormones, and the menopausal transition. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 17, p. 299-309, 1999.

JOHNSON, C.A.; THOMPSON, D.L.; CARTMILL, J.A. Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2681-2687, 2002.

JOHNSON, P.J. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. The Veterinary Clinics of North America Equine Practice, v. 18, p. 271–293, 2002.

JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; BERG, M.; HAMEL, K.; SMITH, P.; LAWRENCE, S.B.; WHITING, L.; MCNATTY, K.P. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. **Reproduction**, v. 138, p. 107–114, 2009.

JUNGHEIM, E.S.; MACONES, G.A.; ODEM, R.R.; PATTERSON, B.W.; LANZENDORF. S.E.; RATTS, V.S.; MOLEY, K.H. Associations between free fatty acids, *cumulus* oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 95, p. 1970-1974, 2011.

KAPS, M.; OKADA, C.T.C.; GAUTIER, C.; AURICH, J.; SCARLET, D.; KUHL, J.; AURICH, C. Transient suppression of ovulatory ovarian function in pony mares after treatment with slow-release deslorelin implants. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 74, p. 106505, 2021.

KARIKOSKI, N.P.; HORN, I.; MCGOWAN, T.W.; MCGOWAN, C. M. The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first opinion/referral equine hospital. Domestic Animals Endocrinology, v. 41, p. 111-117, 2011.

KASHIR, J.; JONES, C.; LEE, H.C.; RIETDORF, K.; NIKIFIRAKI, D.; DURRANS, C.; RUAS, M.; TEE, S.T.; HEINDRYCKX, B.; GALIONE, A.; DE SUTTER, P.; FISSORE, R.A.; PARRINGTON, J.; COWARD, K. Loss of activity mutations in phospholipase C zeta abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes. **Human Reproduction**, v. 26, p. 3372-3387, 2011.

KAWASUMI, K.; YAMAMOTO, M.; KOIDE, M.; OKADA, Y.; MORI, N.; YAMAMOTO, I.; ARAI, T. Aging effect on plasma metabolites and hormones concentrations in riding horses. **Open Veterinary Journal**, v. 5, p. 154-157, 2015.

KEVENAAR, M.E.; MEERASAHIB, M.F.; KRAMER, P.; VAN DE LANG-BORN, B.M.; DE JONG, F.H.; GROOME, N.P.; THEMMEN, A.P.; VISSER, J.A. Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. **Endocrinology**, v. 147, p. 3228-3234, 2006.

KIESSLING, A.A. Human eggs: the need, the risks, the politics. **Burrill Stem Cell Report**, p. 38-45, 2007.

KOKIA, E.; HURWITZ, A.; RICCIARELLI, E.; TEDESCHI, C.; RESNICK, C.E.; MITCHELL, M.D.; ADASHI, E.Y. Interleukin-1 stimulates ovarian prostaglandin biosynthesis: Evidence for heterologous contactindependent cell-cell interaction. **Endocrinology**, v. 130, p. 3095–3097, 1992.

KRISHER, R.L. Maternal age affects oocyte developmental potential at both ends of the age spectrum. Reproduction, Fertility and Development, v.31, p. 1-9, 2019.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MAZIERO, R.R.D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v.11, p.150-158, 2014.

LAZZARI, G.; COLLEONI, S.; CROTTI, G.; TURINI, P.; FIORINI, G.; BARANDALLA, M.; LANDRISCINA, L.; DOLCI, G.; BENEDETTI, M.; DUCHI, R.; GALLI, C. Laboratory production of equine embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103097, 2020.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 767–775, 2002.

LE BRETON, A.; LEWIS, N. Equine ART and antral follicle count: can we deepen our understanding to improve outcomes? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 59, p.1-7, 2024.

LEROY, J.L.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, p. 485-495, 2005.

LI, Y.; LI, R.Q.; OU, S.B.; ZHANG, N.F.; REN, L.; WEI, L.N.; ZHANG, Q.X.; YANG, D.Z. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in *cumulus* granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 1-9, 2014.

MAGALHÃES, J. F.; LIMA, I. R.; LIMA, L. R.; VARELA, J.A.R.C.; VIEIRA, R.A.M.; ALVES, G.E.S.; FALEIROS, R.R. Estudo da correlação de medidas radiográficas indicadoras de laminite em éguas da raça Mangalarga Marchador com e sem sinais de sobrepeso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1032-1032, 2014.

MAILLARD, V.; UZBEKOVA, S.; GUIGNOT, F.; PERREAU, C.; RAME, C.; COYRAL-CASTEL, S.; DUPONT, J. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 1-15, 2010.

MANSO FILHO, H.C.; MANSO, H.E.C.C.; FERREIRA, L.M.C.; SANTIAGO, T.A.; WANDERLEY, E.K.; ABREU, J.M.G. Percentagem de gordura de cavalos criados em região tropical. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 239–243, 2009.

MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, I.; STEFANO, B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 299-308, 2005.

MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; URANIO, M.F.; RUTIGLIANO, L.;

NICASSIO, M.; LACALANDRA, G. M.; HINRICHS, K. Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and mitochondrial energy/redox potential. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, p.1-12, 2014

MASERATI, M.; MUTTO, A. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.41, p. 42-50, 2016.

McCUE, P.M.; FARQUHAR, V.J.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Removal of deslorelin (Ovuplant™) implant 48 h after administration results in normal interovulatory intervals in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 865-870, 2002.

McGOWAN, C.M.; NEIGER, R. Efficacy of trilostane for the treatment of equine Cushing's syndrome. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 414-418, 2003.

McKINNON, A.O.; WHEELER, M.B.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Oocyte transfer in the mare: preliminar observations. **Equine Veterinary Science**, v.6, p.306-309, 1986.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo transfer and related technologies. In: SAMPER, J.C.; PUCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. Philadelphia: W.B. Sounders., 2007, 51, p.319-334.

MELO, C.M; PAPA, F.O; PUOLI FILHO, J.N.P; ARAUJO, G.H.M; DELL'AQUA JUNIOR, J.A; ALVARENGA, M.A. Eficiência do acetato dedeslorelina e do extrato de 95 pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 392-398, 2012.

MENZIES-GOW, N.J.; HARRIS, P.A.; ELLIOTT, J. Prospective cohort study evaluating risk factors for the development of pasture-associated laminitis in the United Kingdom. **Equine Veterinary Journal**, v. 49, p. 300-306, 2017.

MOBBS, C.V. Reproductive senescence, human. In: KNOBIL, E. **Encyclopedia of reproduction**, vol. 4. San Diego: Academic Press, 1998. p. 231–8.

MONGET, P.; BOBE, J.; GOUGEON, A.; FABRE, S.; MONNIAUX, D.; DALBIES-TRAN, R. The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 2-12, 2012.

MONNIAUX, D.; CLEMENT, F.; DALBIES-TRAN, R.; ESTIENNE, A.; FABRE, S.; MANSANET, C.; MONGET, P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the Link? **Biology of Reproduction**, v. 90, p. 1-11, 2014.

MORGAN, R.A.; MCGOWAN, T.W.; MCGOWAN, C.M. Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in Queensland, Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 92, p. 101-106, 2014.

MORRISSEY, J.; FERRIS, R.; MCCUE, P. Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. **Clinical Theriogenology**, v.11, p.123-126, 2019.

NAGAO, J.F.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 69-73, 2012.

NAGAOKA, S.I.; HASSOLD, T.J.; HUNT, P.A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 493-504, 2012.

NELIS, H.; LEEMANS, B.; VAN SOOM, A. Culturing horse oocytes and embryos at the physiological temperature of the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 410, 2012.

NIELSEN, B.D.; O'CONNOR-ROBISON, C.I.; SPOONER, H.S.; SHELTON, J. Glycemic and insulinemic responses are affected by age of horse and method of feed processing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, p. 249-258, 2010.

PALERMO, G.D.; COHEN, J.; ALIKANI, M.; ADLER, A.; ROSENWAKS, Z. Development and implementation of intracytoplasmatic sperm injection (ICSI). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 211-218, 1995.

PALMER, E.; DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; KING, W.A.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K.J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p. 689-690, 1987.

PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P. Contribution of reproduction management and technologies to genetic progress in horse breeding. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103016, 2020.

PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. The art and artifact of GDF9 activity: *cumulus* expansion and the *cumulus* expansion-enabling factor. **Biology of reproduction**, v. 73, p. 582-585, 2005.

PAPAS, M.; GOVAERE, J.; PEERE, S.; GERITS, I.; VAN DE VELDE, M.; ANGEL-VELEZ, D.; COSTER, T.D.; SOOM, A.V.; SMITS, K. Anti-müllerian hormone and OPUICSIboutcome in the mare. **Animals**, v. 11, p. 2004, 2021.

PELLATT, L.; RICE, S.; DILAVER, N.; HESHRI, A.; GALEA, R.; BRINCAT, M.; BROWN, K.; SIMPSON, E.R.; MASON, H.D. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 96, p. 1246-1251, 2011.

PELLESTOR, F.; ANDRÉO, B.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S. The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. **Europian Journal of Medical Genetics**, v. 49, p. 103-116, 2006.

PREIS, K.A.; CARNEVALE, E.; SILVA, M.C.; BRIENZA, V.C.; GOMES, G.; MACLELLAN, L.; SQUIRES, E. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22ºC. **Theriogenology**, v. 61, p. 1215-1223, 2004.

RAMBAGS, B.P.; VAN BOXTEL, D.C.J.; THARASANIT, T.; LENSTRA, J.A.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 81, p. 959–965, 2014.

RAMBAGS, B.P.B.; VAN BOXTEL, D.C.J.; THARASANIT, T.; LENSTRA, J.A.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Oocyte mitochondrial degeneration

during reproductive ageing in the mare. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v. 18, p. 25–27, 2006.

RAMÍREZ-AGÁMEZ, L.; CROWLEY, J.B.; LOVE, C.C.; HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. Blastocyst production by conventional *in vitro* fertilization (cIVF) in horses: Effects of sperm storage method, incubation timing of cool-stored semen before gamete co-incubation, and comparisons between cIVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Theriogenology**, v. 248, p. 1-13, 2025.

RAPSON, J.L.; SCHOTT, H.C.; NIELSEN, B.D.; MCCUTCHEON, L.J.; HARRIS, P.A.; GEOR, R.J. Effects of age and diet on glucose and insulin dynamics in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, p. 690-696, 2018.

REBOLLEDO-JARAMILLO, B.; SU, M.S.W.; STOLER, N.; MCELHOE, J.A.; DICKINS, B.; BLANKENBERG, D.; KORNELIUSSEN, T.; CHIAROMONTE, F.; NIELSEN, R.; HOLLAND, M.M.; PAUL, I.M.; NEKRUTENKO, A.; MAKOVA, K.D. Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 15474-15479, 2014.

RICHARDSON, S.J.; SENIKAS, V.; NELSON, J.F. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 65, p. 1231-1237, 1987.

RICH-EDWARDS, J.W.; SPIEGELMAN, D.; GARLAND, M.; HERTZMARK, E.; HUNTER, D.J.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C.; WAND, H.; MANSON, J.E. Physical activity, body mass index, and ovulatory disorder infertility. **Epidemiology**, v. 13, p. 184-190, 2002.

RIZZO, M.; DUCHEYNE, K.D.; DEELEN, C.; BEITSMA, M.M.; CRISTARELLA, L.; QUARTUCCIO, M. et al. Advanced mare age impairs the ability of in vitro-matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, p. 252-257, 2019.

RIZZO, M.; du PREEZ, N.; DUCHEYNE, K.D.; DEELEN, C.; BEITSMA, M.M.; STOUT, T.A.E. et al. The horse as a natural model to study reproductive aging-induced aneuploidy and weakened centromeric cohesion in oocytes. **Aging**, v. 12, p. 22220–22232, 2020.

RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultrassom em equinos**. 2006. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

RODRIGUEZ, J.; MASERATI, M.; ROBILOTTA, T.; AUGUSTO, G.; ALONSO, M.A.; REDOAN, M.; TIBARY, A.; FLEURY, P. Recovery of Equine Oocytes in Ambulatory Practice and Potential Complications. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.98, p. 103324, 2021.

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 55-67, 2004.

SALGADO, R.M.; BROM-DE-LUNA, J.G.; RESENDE, H.L.; CANESIN, H.S.; HINRICHS, K. Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the

horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, p. 825-840, 2018.

SANFINS, A.; RODRIGUES, P; ALBERTINI, D. F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, p. 1741-1750, 2018.

SANUSI, R.; YU, Y.; NOMMIKOS, M.; LAI, A.F.; SWANN, K. Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C zeta. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, p. 783-791, 2015.

SASAKI, H.; HAMATANI, T.; KAMIJO, S.; IWAI, M.; KOBANAWA, M.; OGAWA, S.; MIYADO, K.; TANAKA, M. Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1-7, 2019.

SAUNDERS, C.M.; LARMAN, M.G.; PARRINGTOM, J.; COX, L.J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L.M.; SWANN, K.; LAI, F.A. PLCzeta: a sperm-specific trigger of Ca2+ oscillations in eggs and embryo development. **Development**, v. 129, p. 3533-3544, 2002.

SCARLET, D.; ILLE, N.; ERTL, R.; ALVES, B.G.; GASTAL, G.D.A.; PAIVA, S.O.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; AURICH, C. Glucocorticoid metabolism in equine follicles and oocytes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 59, p. 11–22, 2017.

SCARLET, D.; SCHULER, G.; MALAMA, E.; BOLLWEIN, H.; BOCCI, C.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; KOWALEWSKI, M.P. Endocrine profile and OPU-ICSI outcomes in mares: a comparative study. **Reproduction and Fertility**, v.3, p.1-13, 2025.

SCARLET D.; WULF, M.; KUHL, J.; KOHNE, M.; ILLE, N.; CONLEY, A.J.; AURICH, C. Anti-Müllerian hormone profiling in prepubertal horses and its relationship with gonadal function. **Theriogenology**, v. 117, p. 72–77, 2018.

SCHOTT, H.C.; COURSEN, C.L.; EBERHART, S.W.; NACHREINER, R.J.; REFSAL, K.R.; EWART, S.L.; MARTENIUK, J.V. The Michigan Cushing's project. In: Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2001. **Anais...**. San Diego: AAEP, 2001, p. 22–24.

SCOGGIN, C.F. Not just a number: effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in Thoroughbred brood-mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 872–879, 2015.

SESSIONS, D. R.; REEDY, S.E.; VICK, M.M.; MURPHY, B.A.; FITZGERALD, B.P. Development of a model for inducing transient insulin resistance in the mare: Preliminary implications regarding the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 2321–2328, 2004.

SESSIONS-BRESNAHAN, D.R.; CARNEVALE, E.M. The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 1485-1494, 2014.

SHERMAN, B.M.; WEST, J.H.; KORENMAN, S.G. The menopausal transition:

analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 42, p. 629-636, 1976.

SILVA, P.C.A.; OLIVEIRA, J.P.; PAIVA, S.O.; CARAM, D.F.; JUNQUEIRA, R.G.C.; JACOB, J.C.F.; SÁ, M.A.F. Comparação entre dois agentes indutores da ovulação em éguas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p.45-48, 2016.

SOULES, M.R.; BATTAGLIA, D.E.; KLEIN, N.A. The endocrinology of ovarian (reproductive) aging in women. In: TE VELDE, E.R.; PEARSON, P.L.; BROEKMANS, F.J. **Female reproductive aging**. 1ª ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000. p. 79–100.

SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1232-1241, 1993.

STOUT, T.A.E. Clinical insights: assisted reproductive technologies. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, p. 427-428, 2019.

SQUIRES, E.L. Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, p. 1753-1557, 2019.

SQUIRES, E.; MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 1-8, 2007.

SQUIRES, E.; WILSON, J.; KATO, H.; BLASZCZYK, A.; KANITZ, W. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 45, p. 306, 1996.

TERRANOVA, P.F.; RICE, V.M. review: Cytokine involvement in ovarian processes. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, p. 50–63, 1997.

TE VELDE, E.R.; SCHEFFER, G.J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F.J.; FAUSER, B.C.J.M. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 67-73, 1998.

THOMAS, F.; RENAUD, F.; BENEFICE, E.; DE MEEUS, T.; GUEGAN, J.F. International variability of ages at menarche and menopause: patterns and main determinants. **Human Biology**, v. 73, p. 271-290, 2001.

TRELOAR, A.E.; BOYNTON, R.E.; BEHN, B.G.; BROWN, B.W. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. **International Journal of Fertility**, v. 12, p. 77-126, 1967.

VANDERWALL, D.; WOODS, G. Age-related subfertility in the mare. In: In: Proceedings of the 36th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 1991, **Anais...** Lexington, Kentucky: AAEP, 1991, p. 85-89.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, p. 84–86, 2002.

VELEZ, I.C.; ARNOLD, C.; JACOBSON, C.C.; NORRIS, J.D.; CHOI, Y.H; EDWARDS, J.F.; HINRICHS, K. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 44, p. 78–83, 2012.

VERMEULEN, A. Environment, human reproduction, menopause, and andropause. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 91-100, 1993.

VERNUNFT, A.; SCHNEIDER, F.; TUCHSCHERER, A.; BECKER, F.; KANITZ, W. Anti-Muellerian Hormone (AMH) can help to predict follicular growth in mares. **Pferdeheilkunde**, v. 27, p. 293-296, 2011.

VICK, M.M.; ADAMS, A.A.; MURPHY, B.A.; SESSIONS, D.R.; HOROHOV, D.W.; COOK, R.F.; SHELTON, B.J.; FITZGERALD, B.P. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1144–1155, 2007.

VICK, M.M.; SESSIONS, D.R.; MURPHY, B.A.; KENNEDY, E.L.; REEDY, S.E.; FITZGERALD, B.P. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: Effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 609–617, 2006.

VISSER, J.A.; THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 81-86, 2005.

VOGELSANG, M.M.; KREIDER, J.L.; BOWEN, M.J. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v. 29, p. 1007-1018, 1988.

WESSON, J.A.; GINTHER, O.J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of as laughter house survey. **Journal of Animal Science**, v. 52, p. 119-129, 1981.

WINYARD, P.G.; MOODY, C.J.; JACOB, C. Oxidative activation of antioxidant defence. **Trends in Biochemical Science**, v. 30, p. 453-461, 2005.

WU, L.L.; DUNNING, K.R.; YANG, X.; RUSSELL, D.L.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in *cumulus*-oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, p. 5438-5445, 2010.

WU, L.L.; RUSSELL, D.L.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Endoplasmic reticulum (ER) stress in *cumulus*oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential (DeltaPsi m), and embryo development. **Molecular Endocrinology**, v. 26, p. 562-573, 2012.

WU, Y.T.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X.E.; XU, J.; ZHU, X.M.; LUO, Q.; HUANG, H.F. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1526-1531, 2007.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, p.

854-866, 2001.

YANG, X.; WU, L.L.; CHURA, L.R.; LIANG, X.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Exposure to lipidrich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in *cumulus*-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 97, p. 1438-1443, 2012.

YOUSSEF, M.A.; ABOU-SETTA, A.M.; LAM, W.S. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, p. 1-66, 2016.

YU, E.J.; AHN, H.; LEE, J.M.; JEE, B.C.; KIM, S.H. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, p. 156-162, 2015.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito da Síndrome Metabólica Equina na dinâmica folicular e nos índices reprodutivos de éguas idosas e a sua modulação pelo acetato de deslorelina[2]

Effect of Equine Metabolic Syndrome on follicular dynamics and reproductive indices in aged mares and its modulation by deslorelin acetate

Raiane S. Miranda[a]; Fernanda S. Ignácio[a]; Cezinande de Meira[a]

[a]Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente:
E-mail: fernanda.s.ignacio@unesp.br (Fernanda S. Ignácio)

Resumo

O envelhecimento reprodutivo em éguas é agravado por condições metabólicas, como a Síndrome Metabólica Equina (SME), cujo impacto sobre a eficiência da aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) permanece pouco compreendido. Este estudo avaliou o efeito da SME sobre a dinâmica folicular, a recuperação de oócitos e a maturação oocitária *in vitro,* e verificou se a deslorelina modularia esses parâmetros em éguas idosas. Utilizaram-se sete éguas (24,29 ± 1,60 anos), SME positivo (n=4) ou negativo (n=3), em delineamento *cross-over* sequencial, recebendo ou não 125 µg de deslorelina IM a cada 12h, iniciado quando o maior folículo atingiu 11-13 mm e mantido até 22-24 mm, com a OPU entre 25-27 mm, seguida da maturação *in vitro* dos oócitos. A SME não afetou significativamente os índices reprodutivos (P>0,05), exceto por tendência de maior intervalo entre sessões de OPU (11,87 vs. 9,26 dias; P=0,079). A SME alterou a curvatura de crescimento do maior folículo (P<0,001) e, em interação com a deslorelina, reduziu o diâmetro do terceiro maior folículo ao final do tratamento (P=0,027). A deslorelina aumentou o intervalo entre sessões de OPU

[2] Manuscrito elaborado de acordo com as *Guide for Authors* da Theriogenology.

(P=0,027), reduziu o diâmetro (P=0,033) e a taxa de crescimento do segundo maior folículo (P=0,041) e aumentou a assimetria entre o maior e o segundo maior folículo (P=0,008), como efeito principal do tratamento, independentemente do *status* metabólico. Conclui-se que a deslorelina não trouxe benefício reprodutivo nos índices avaliados, e o impacto da SME esteve mais associado a alterações específicas da dinâmica folicular do que a um comprometimento generalizado dos índices reprodutivos.

Palavras-chave: desregulação insulínica; *ovum pick-up*; competência oocitária; reprodução assistida equina.

1. Introdução

O mercado equino depende da eficiência reprodutiva de éguas de alto valor genético, muitas das quais permanecem na reprodução até a senilidade[1]. Assim como em mulheres, as éguas apresentam declínio progressivo na eficiência reprodutiva com o avanço da idade, caracterizado por redução das taxas de gestação e aumento das taxas de perda embrionária[2-5]. Devido às similaridades reprodutivas entre éguas e mulheres em relação à dinâmica folicular, aos padrões hormonais e à senescência reprodutiva, a égua é considerada um modelo translacional para o estudo do envelhecimento reprodutivo[6,7]. Em ambas as espécies, os oócitos permanecem em parada meiótica por décadas e a redução da qualidade oocitária é um fator limitante da fertilidade associada à idade avançada[8].

Estudos com transferência de oócitos de éguas jovens e idosas para o oviduto de receptoras jovens, inseminadas via transcervical, demonstraram que a redução da qualidade oocitária representa um fator importante na subfertilidade relacionada à idade em éguas[3]. A senescência oocitária manifesta-se por meio de alterações celulares e moleculares, como aumento da incidência de aneuploidia[7,9], degeneração mitocondrial caracterizada por edema mitocondrial e redução do número de cópias de DNA mitocondrial[10] e comprometimento da função metabólica aeróbica e anaeróbica[11]. Além disso, oócitos de éguas idosas apresentam alterações no perfil de ácidos graxos livres, triglicerídeos e ceramidas, sugerindo disfunção no metabolismo lipídico e energético[12]. Essas alterações metabólicas e mitocondriais contribuem para a redução da competência oocitária, manifestada por menores taxas de maturação nuclear, fertilização e desenvolvimento até a fase de blastocisto[11,13].

A senescência reprodutiva inclui também a interferência sobre a atividade reprodutiva mediada tanto pelos hormônios primários quanto secundários da reprodução. A menor liberação das gonadotrofinas resulta no declínio progressivo da população ovariana com o avanço da idade[14,15]. Somado a isso, sabe-se que hormônios relacionados ao metabolismo atuam como moduladores secundários do controle neuroendócrino da reprodução[16]. A Síndrome Metabólica Equina (SME) é caracterizada por resistência à insulina, adiposidade regional e predisposição à laminite[17]. Afeta uma parcela significativa da população equina, e a idade é um fator determinante, já que alguns autores

relatam que aproximadamente 15% dos animais acima de 15 anos desenvolvem a síndrome[18-20]. A prevalência de obesidade equina é estimada entre 19 e 40%[21-23], enquanto a hiperinsulinemia é encontrada entre 22 e 29% da população equina suscetível[24,25]. Animais com SME apresentam hiperinsulinemia basal e/ou resposta exacerbada da insulina após administração de glicose[17]. O impacto da SME sobre a função reprodutiva ainda não foi elucidado.

Uma alternativa para ampliar as possibilidades de obtenção de produtos de indivíduos idosos é a aplicação das biotécnicas reprodutivas associadas à produção *in vitro* de embriões. A aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (*ovum pick-up,* OPU) associada à injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) representa atualmente o procedimento de reprodução assistida mais eficiente em equinos, possibilitando a produção média de 2,12 embriões por sessão de OPU-ICSI[26]. No entanto, a eficiência da OPU é afetada pela população folicular, que é significantemente reduzida em indivíduos idosos[1], o que torna o uso de protocolos de estimulação hormonal que promovam o desenvolvimento de múltiplos folículos uma opção interessante. O acetato de deslorelina, agonista do GnRH, promove aumento nas concentrações de FSH e LH[27], e seu uso está associado à estimulação do crescimento folicular e à indução de múltiplas ovulações em éguas[28,29]. Contudo, seus efeitos sobre a qualidade oocitária de éguas idosas ou com condições metabólicas alteradas permanecem desconhecidos.

Portanto, o presente estudo teve como objetivos: (1) avaliar o efeito da estimulação com acetato de deslorelina sobre os parâmetros de dinâmica folicular e as taxas de recuperação e maturação oocitária *in vitro* em éguas idosas; (2) investigar o efeito da SME sobre os mesmos parâmetros.

2. Material e métodos

2.1 Animais

O presente estudo foi realizado em conformidade com os princípios de ética na experimentação animal e aprovado pela Comissão Institucional de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 000.019/2024) da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP (Botucatu, São Paulo, Brasil). O desenho experimental foi inicialmente pensado para avaliar o efeito do acetato de deslorelina sobre a dinâmica folicular e os índices reprodutivos de éguas idosas, em delineamento

cross-over sequencial (ciclo Controle seguido do ciclo Deslorelina), com sete doadoras homogêneas quanto à idade. Durante o experimento, as éguas passaram pelo diagnóstico de Síndrome Metabólica Equina (SME), não previsto no desenho original do estudo. Esse diagnóstico revelou que quatro das sete éguas eram SME positivas, classificadas com base em hiperinsulinemia basal (≥20 µUI/mL) e/ou resposta exacerbada e prolongada de insulina (≥45 µUI/mL) em 60, 90 ou 120 minutos após a administração oral de glicose. Esse achado não poderia ser ignorado, diante da relevância da SME sobre a função reprodutiva. A SME foi então adicionada como um segundo fator de análise, permitindo investigar, além do efeito da deslorelina, o efeito do *status* metabólico e sua possível interação com o tratamento.

Foram utilizadas sete éguas idosas mestiças doadoras de oócitos, com idade média de 24,29 ± 1,60 anos, peso médio de 439 ± 44,86 kg e escore de condição corporal (ECC) de 7,43 ± 0,30 (escala de Henneke, 1 a 9). Cada égua foi submetida a sessões consecutivas de OPU em cada grupo experimental (Controle e Deslorelina) até que fossem obtidos cinco oócitos maturados *in* vitro por grupo, resultando em um total de 63 ciclos (37 no grupo Controle e 26 no grupo Deslorelina).

Os animais estavam alojados no Posto de Monta da Fazenda Lageado (FMVZ/UNESP-Botucatu), mantidos a pasto e recebendo silagem de milho, ração concentrada, suplemento mineral e água *ad libitum*. A silagem de milho apresentava 33,19% de matéria seca, 15,88% de amido na matéria seca, determinados por análise bromatológica, e 85,39% de carboidratos totais, calculados por diferença. Considerando o consumo diário de 10 a 14 kg de silagem por égua, a ingestão de carboidratos totais da silagem variou entre 2,83 a 3,97 kg/égua/dia, dos quais 0,53 a 0,74 kg/égua/dia correspondiam ao amido. A silagem era disponibilizada uma vez ao dia e permanecia disponível para consumo ao longo do dia, de forma que a ingestão de amido não ocorria como uma única refeição concentrada. Tendo em vista que o peso médio das éguas era 439 kg, a ingestão diária de amido proveniente da silagem correspondeu a aproximadamente 1,2 a 1,7 g/kg de peso vivo/dia.

2.2 Grupos experimentais e parâmetros avaliados

Utilizou-se o modelo experimental de *cross-over* sequencial. Inicialmente as éguas passaram pelo Grupo Controle [sem tratamento, com administração de 0,5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) IM a cada 12h]. Em seguida, foram alocadas no Grupo Deslorelina, com administração de 125 µg de acetato de deslorelina IM a cada 12h (Sincrorrelin®, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

Para trabalhar com uma onda folicular conhecidamente em crescimento, as éguas foram submetidas à ablação de todos os folículos ovarianos, definido como D0. A partir desse momento, as éguas foram monitoradas diariamente por ultrassonografia transretal (Mindray® DP-2200 Vet, Shenzhen, China), com transdutor linear na frequência de 7.5 MHz para acompanhar a emergência da onda e desenvolvimento folicular. Nos dias D7 e D10, administrou-se prostaglandina F2α (PGF) (0,25 mg IM; Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) para garantir a luteólise completa de possíveis estruturas luteinizadas formadas a partir da aspiração[30]. O tratamento com deslorelina foi iniciado quando os maiores folículos atingiram entre 11 e 13 mm, coincidindo com o momento de redução fisiológica do FSH durante a fase de crescimento folicular comum[31]. O tratamento foi mantido até que o maior folículo da nova onda alcançasse o diâmetro entre 22 e 24 mm, ou por no máximo cinco dias, para evitar *downregulation*[28]. A OPU ocorreu no dia seguinte ao fim do tratamento, quando o maior folículo apresentava entre 25 e 27 mm. O mesmo protocolo foi utilizado para éguas do grupo Controle, exceto pela administração da deslorelina, substituída por solução fisiológica.

Os parâmetros avaliados foram agrupados em três categorias: (a) parâmetros foliculares: número de folículos aspirados, número de folículos ≥10 mm no dia da OPU (diâmetro folicular a partir do qual os oócitos recuperados apresentam maior taxa de maturação oocitária em éguas[32]), taxa de crescimento folicular, dinâmica folicular dos três maiores folículos (F1, F2 e F3), assimetria entre F1-F2 (diferença de diâmetro entre o maior e o segundo maior folículo); (b) parâmetros oocitários: número de oócitos imaturos recuperados por procedimento de OPU, taxa de recuperação oocitária (relação entre o número de oócitos recuperados e o número de folículos aspirados), número de oócitos maturados *in vitro* por sessão de OPU, número de oócitos não maturados *in vitro*

por sessão de OPU, taxa de maturação oocitária (relação entre o número de oócitos maturados e o número de oócitos recuperados); (c) parâmetros temporais: intervalo em dias entre o surgimento do primeiro folículo ≥10 mm e a OPU, intervalo em dias entre dois procedimentos consecutivos de OPU, intervalos entre a emergência da onda e o início do tratamento, entre a emergência da onda e o fim do tratamento, entre o início do tratamento e a OPU, e entre o fim do tratamento e a OPU.

2.3 Coleta de oócitos e maturação oocitária (in vitro)

Toda sessão de aspiração folicular foi realizada por um único aspirador treinado, sendo 37 aspirações no grupo Controle (NaCl 0,9%) e 26 aspirações no grupo Deslorelina, totalizando 63 sessões de OPU das 7 éguas. Antes das OPUs, as éguas foram mantidas em tronco de contenção, submetidas à higienização da região perineal com iodopolividona degermante e sedadas com o seguinte protocolo: acepromazina 1% (0,03 mg/kg intravenoso (IV); Acepran®, Vetnil, São Paulo, Brasil) e detomidina 1% (0,01 mg/kg IV; Detomidin®, Syntec, Santana de Parnaíba – SP, Brasil). Como analgésico, utilizou-se o butorfanol 1% (0,05 mg/kg IV; Butorfin®, Vetnil, São Paulo, Brasil). Para promover o relaxamento do reto e facilitar a manipulação dos ovários, administrou-se brometo de N-butil-hioscina (0,2 mg/kg IV; Buscofin Composto®, Agener, São Paulo, Brasil) associado à dipirona. Como protocolo anti-inflamatório e analgésico, administrou-se flunixina meglumina (1 mg/kg IV; Flunixin®, Chemitec, São Paulo, Brasil) imediatamente antes e 24 horas após cada aspiração.

As aspirações foliculares foram realizadas utilizando-se um transdutor convexo de 5 MHz conectado a um aparelho de ultrassom DP-2200, acoplado a uma guia de aspiração (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos -SP, Brasil) e agulha de OPU de duplo fluxo de calibre 12G (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos -SP, Brasil). O sistema foi conectado a uma bomba de vácuo (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos -SP, Brasil) calibrada com pressão negativa de 120 a 140 mmHg.

Para realização das aspirações, a guia foi introduzida por via transvaginal até o fundo da vagina, lateral à cérvix. O reto foi esvaziado e o ovário foi, então, posicionado contra o fundo da vagina, para visualização dos folículos no

ultrassom. Em seguida, a agulha foi introduzida, perfurando o fundo da vagina e o estroma ovariano, até atingir o lúmen folicular. Cada folículo foi lavado (*flushing)* de 6 a 10 vezes e sua parede foi escarificada com a agulha para aumentar as chances de recuperação do oócito. Para o *flushing*, utilizou-se solução salina tamponada com fosfato (PBS) acrescida de heparina (4 mL/litro de PBS; Botuflush OPU®, Botupharma, Botucatu-SP, Brasil). O meio de lavagem foi introduzido no folículo sob pressão manual utilizando uma seringa de 20 mL sem êmbolo de látex, e a aspiração do conteúdo foi realizada pela bomba de vácuo.

O líquido recuperado após o *flushing* de todos os folículos dos dois ovários foi filtrado em filtro para embriões, clarificado com cerca de 200 mL de PBS e transferido para placa de Petri tamanho 100x20mm. O rastreamento dos oócitos foi realizado em estereomicroscópio ZMZ745 (Nikon Corporation®, Tokio, Japão). Os oócitos recuperados foram lavados em 3 gotas de 200 µL cada, contendo meio *holding* de manutenção e transporte (BotuOocyte®, Botupharma, Botucatu-SP, Brasil), armazenados com 1,5 mL do mesmo meio em um criotubo e mantidos por 22 a 24 horas a 22ºC.

O meio de maturação foi composto por TCM199 com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 µL/mL de insulina, transferrina e selenito de sódio (ITS), 50 ng/mL de EGF, 100 ng/mL de IGF, 0,1 UI/mL de FSH (Gonal F®, Merck, Rio de Janeiro-RJ, Brasil), 0,01 µg/µL de 17-β-estradiol (Sigma Aldrich, Barueri-SP, Brasil), 1 mM de piruvato de sódio, 1mM de cisteamina e 75 µg/mL de amicacina.

Após o período no *holding*, os oócitos foram lavados em duas gotas de 60 µL cada de meio de MIV. Para a realização da MIV, os oócitos foram cultivados em placa de Petri estéril de 35x10 mm (Corning®, Acton, MA, USA), contendo gotas de 100 µL de meio de maturação, com no máximo 5 oócitos por gota, imersos sob óleo mineral (BotuFIV Oil®, Botupharma, Botucatu-SP, Brasil), previamente estabilizada em incubadora à 38,5ºC com CO_2 a 5,5% durante 90 minutos. Após 30 horas de incubação, os oócitos foram transferidos para gota contendo 50 µL de solução de hialuronidase (Ingase®, Ingámed, Maringá-PR, Brasil) durante 1 minuto, para facilitar a remoção das células do *cumulus*. Em seguida, procedeu-se o denude por pipetagem contínua em PBS acrescido de 0,1% de álcool polivinílico (PVA), até a remoção completa das células do

cumulus. A maturação nuclear foi avaliada em microscópio invertido, por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar.

2.4 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Stata. Considerando o delineamento com medidas repetidas na mesma doadora, todos os desfechos foram avaliados por modelos de efeitos mistos, incluindo a identidade da égua como efeito aleatório. O acetato de deslorelina foi tratado como fator intra-égua, uma vez que cada doadora contribuiu com ciclos Controle e Deslorelina, enquanto a Síndrome Metabólica Equina (SME) foi tratada como fator entre-éguas, permanente para cada doadora. Ainda que o acetato de deslorelina tenha sido testado dentro de cada doadora, a égua foi considerada a unidade experimental, e não o ciclo de aspiração, uma vez que os dois ciclos de uma mesma égua não constituem observações independentes, por compartilharem a mesma condição fisiológica. A estrutura de efeitos mistos foi adotada para respeitar essa dependência, evitando pseudo-repetição. Dado o número reduzido de doadoras (n=7) e a estrutura entre-éguas da SME, os efeitos desse fator foram interpretados como exploratórios, não permitindo inferência para a população equina.

As análises variaram conforme a natureza de cada variável: modelos lineares mistos para variáveis contínuas (diâmetros foliculares, assimetria e intervalos em dias); regressão de Poisson mista para contagens (número de folículos e de oócitos); e modelos binomiais com função de ligação logit para proporções (taxas de recuperação e de maturação oocitária). Cada modelo incluiu os efeitos de deslorelina, de SME e sua interação, a partir dos quais foram estimadas as médias marginais por subgrupo e por fator (média ± erro padrão).

Os desfechos temporais avaliados foram: o intervalo entre o surgimento do primeiro folículo com diâmetro igual ou superior a 10 mm e a aspiração folicular, o intervalo entre aspirações consecutivas e os intervalos entre os marcos sucessivos da onda folicular (início da onda, início e término do tratamento, e OPU). A dinâmica de crescimento dos três maiores folículos (F1, F2 e F3), obtida a partir do banco longitudinal de medidas ultrassonográficas diárias, foi avaliada no início e no término do tratamento e no dia da OPU, estratificada pelo cruzamento entre *status* metabólico e deslorelina. A assimetria

entre os dois maiores folículos (F1-F2) foi calculada em cada registro como a diferença de diâmetro entre eles e modelada como desfecho independente, de modo que suas estimativas vêm de um modelo próprio. A taxa de crescimento folicular foi definida como o coeficiente angular (mm/dia) do diâmetro em função do dia da onda, estimado na reta final da dinâmica (últimos 10 dias antes da OPU) e comparado por subgrupo por meio de médias marginais.

Dado o número reduzido de *clusters*, a inferência foi conduzida pela aproximação de graus de liberdade de Kenward-Roger para os desfechos contínuos e pelo teste de razão de verossimilhança para as proporções – método recomendado na literatura estatística especificamente para corrigir o viés de subestimação do erro-padrão que ocorre em modelos mistos com poucos *clusters*. Adotou-se P<0,05 como critério de significância estatística e P entre 0,05 e 0,10 como tendência. Resultados não significativos não devem ser interpretados como prova de ausência de efeito, mas sim como ausência de evidência suficiente, dado o baixo poder estatístico do estudo.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do acetato de deslorelina sobre os parâmetros foliculares e oocitários

O tratamento com deslorelina aumentou significativamente o intervalo entre sessões de OPU (P=0,027) e a duração em dias do período de tratamento (Deslorelina ou NaCl 0,9%) (P=0,0024). Houve tendência de aumento no intervalo entre o surgimento do primeiro folículo ≥10 mm e o dia da OPU (P=0,076) e no número de oócitos não maturados (P=0,079). Não houve efeito significativo sobre os demais parâmetros avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Médias marginais ± Erro Padrão dos parâmetros foliculares e oocitários de éguas idosas submetidas à OPU, segregadas por tratamento (Controle e Deslorelina).

Variável	Controle (n=37 aspirações/ 7 éguas)	Deslorelina (n=26 aspirações/ 6 éguas)	P-valor
Nº de folículos aspirados/OPU	5,68 ± 0,70	5,83 ± 0,75	0,821
Nº de folículos ≥10 mm/OPU	4,92 ± 0,71	5,20 ± 0,78	0,685
Intervalo entre fol. ≥10 mm e OPU	6,55 ± 0,40	7,74 ± 0,46	0,076

(dias)			
Nº de oócitos recuperados/OPU	2,14 ± 0,27	2,44 ± 0,34	0,499
Taxa de recuperação (%)	39,50 ± 3,50	41,50 ± 4,00	0,704
Nº de oócitos maturados/OPU	1,15 ± 0,19	1,12 ± 0,22	0,928
Nº de oócitos não maturados/OPU	0,78 ± 0,15	1,23 ± 0,22	0,079
Taxa de maturação (%)	53,30 ± 5,70	45,40 ± 6,10	0,223
Taxa de oócitos não maturados (%)	36,70 ± 6,50	46,70 ± 7,20	0,223
Intervalo entre OPUs (dias)	10,19 ± 0,69	12,06 ± 0,77	0,027
Dias de tratamento (Deslorelina ou NaCl 0,9%)	4,08 ± 0,17	4,63 ± 0,19	0,0024

3.2 Efeito da SME sobre os parâmetros foliculares e oocitários

Quando o efeito da SME foi avaliado como efeito principal (sem interação com o tratamento), observou-se apenas uma tendência de maior intervalo entre sessões de OPU em éguas com SME (P=0,079). Não houve diferenças significativas (P>0,05) nos demais parâmetros analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Médias marginais ± Erro Padrão dos parâmetros foliculares e oocitários de éguas idosas submetidas à OPU, segregadas por *status* metabólico (Negativo= sem SME; Positivo= com SME).

Variável	**Negativo (n=22 aspirações/ 3 éguas)**	**Positivo (n=41 aspirações/ 4 éguas)**	**P-valor**
Nº de folículos aspirados/OPU	5,54 ± 0,95	5,86 ± 0,84	0,804
Nº de folículos ≥10 mm/OPU	4,73 ± 0,96	5,20 ± 0,89	0,725
Intervalo entre fol. ≥10 mm e OPU (dias)	6,24 ± 0,50	7,52 ± 0,38	0,102
Nº de oócitos recuperados/OPU	2,48 ± 0,38	2,15 ± 0,27	0,500
Taxa de recuperação (%)	45,40 ± 4,60	37,60 ± 3,20	0,165
Nº de oócitos maturados/OPU	1,46 ± 0,28	0,96 ± 0,17	0,148
Nº de oócitos não maturados/OPU	0,86 ± 0,20	1,02 ± 0,16	0,539
Taxa de maturação (%)	59,30 ± 6,70	45,10 ± 5,30	0,121
Taxa de oócitos não maturados (%)	35,30 ± 9,10	48,10 ± 4,60	0,121
Intervalo entre OPUs (dias)	9,26 ± 0,96	11,87 ± 0,79	0,079
Dias de tratamento (Deslorelina ou NaCl 0,9%)	4,07 ± 0,24	4,44 ± 0,20	0,243

3.3 Efeitos da SME e do acetato de deslorelina sobre a dinâmica folicular

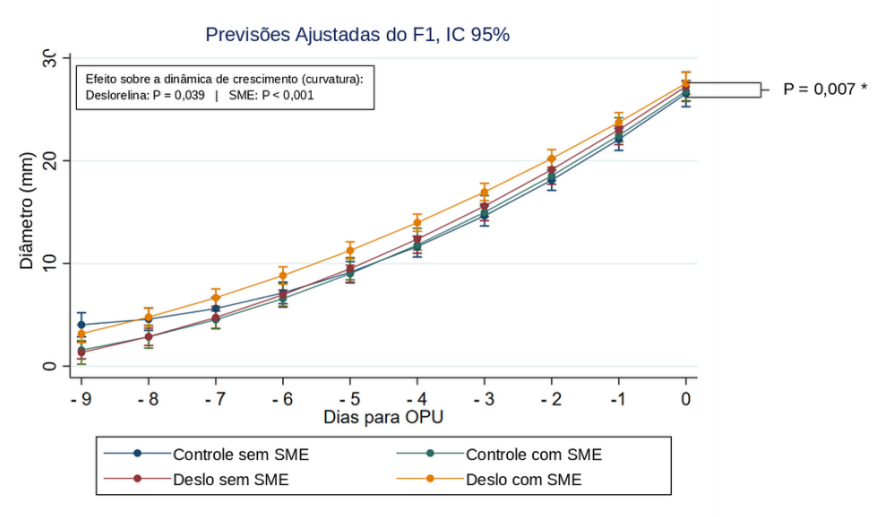
A deslorelina alterou significativamente a dinâmica de crescimento dos três folículos avaliados (Figura 1). No F1 (Figura 1a), tanto a deslorelina (P=0,039) quanto a SME (P<0,001) alteraram a curvatura da dinâmica. No dia da OPU, a única diferença significativa entre subgrupos foi entre éguas com SME tratadas com Deslorelina e éguas sem SME do grupo Controle (+1,01 mm; P=0,007). No F2 (Figura 1b), a deslorelina alterou significativamente a inclinação (P<0,001) e a curvatura (P=0,004) da dinâmica, sem efeito da SME e sem diferença significativa em nenhuma comparação pontual no dia da OPU (P=0,177). No F3 (Figura 1c), a deslorelina alterou significativamente a curvatura (P=0,045), com tendência de efeito da SME sobre a mesma curvatura (P=0,060), também sem diferença significativa no dia da OPU (P=0,804).

Na análise estratificada, não houve diferença significativa entre os quatro subgrupos experimentais no início do tratamento. Ao final do tratamento,houve diferença significativa no diâmetro do F1 (P=0,004) e do F3 (P=0,027) entre os subgrupos, com o grupo SME positivo que recebeu a Deslorelina apresentando os menores valores em ambos os parâmetros (Tabela 3). No dia da OPU, o diâmetro do F1 não diferiu entre os grupos, enquanto a Deslorelina reduziu significativamente o diâmetro do F2 (P=0,033) e aumentou a assimetria entre F1 e F2 (P=0,008), como efeito principal do tratamento, sem interação com o *status* metabólico (Tabela 4).

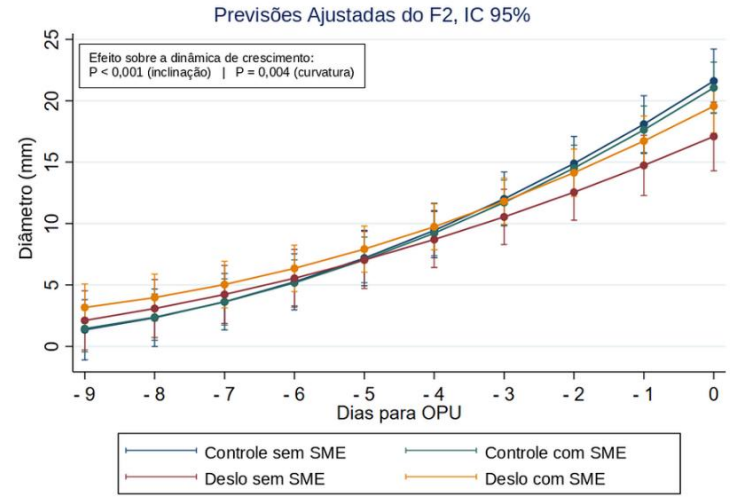
Houve diferença na taxa de crescimento do F2, em que o grupo Deslorelina apresentou redução de crescimento (P=0,041). Os demais grupos não apresentaram diferença nas variáveis analisadas (Tabela 5).

Figura 1. Dinâmica de crescimento (média predita ± IC 95%) dos três maiores folículos nos quatro subgrupos experimentais (SME positivo/negativo x Controle/Deslorelina). (a) maior folículo (F1); (b) segundo maior folículo (F2); (c) terceiro maior folículo (F3).

a)



b)



c)

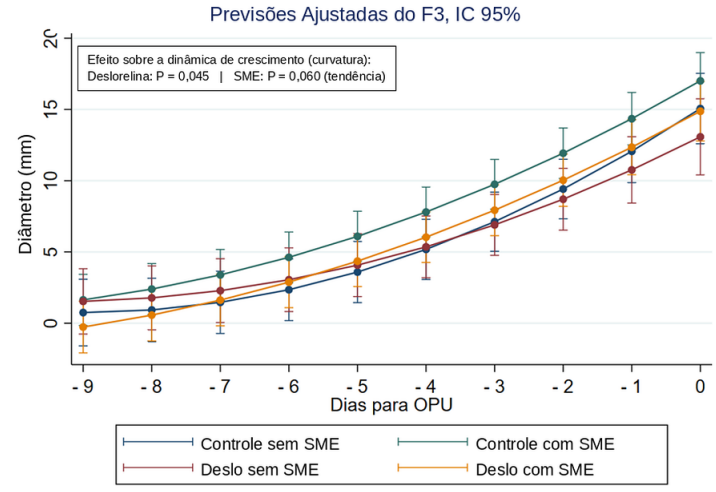


Tabela 3. Comparações das médias marginais (mm) ± Erro Padrão dos diâmetros dos folículos F1, F2 e F3 no início e no fim do tratamento, entre os subgrupos experimentais.

	SME negativo		SME positivo		P-valor
Parâmetro	**Controle**	**Deslorelina**	**Controle**	**Deslorelina**	
Início do tratamento					
F1	11,85 ± 0,60	12,01 ± 0,72	11,67 ± 0,46	10,60 ± 0,56	0,370
F2	9,15 ± 0,78	9,44 ± 1,00	9,56 ± 0,67	10,08 ± 0,78	0,971
F3	7,83 ± 1,29	8,46 ± 1,42	9,53 ± 0,79	6,71 ± 1,20	0,213
Assimetria (F1-F2)	2,68 ± 1,10	2,49 ± 1,38	1,96 ± 0,94	1,00 ± 1,14	0,839
Fim do tratamento					
F1	20,13 ± 0,72	22,67 ± 0,87	22,13 ± 0,53	19,95 ± 0,67	0,004
F2	16,65 ± 1,57	16,60 ± 1,83	17,38 ± 1,28	15,35 ± 1,46	0,411
F3	11,43 ± 1,73	12,56 ± 1,93	14,79 ± 1,40	10,55 ± 1,58	0,027
Assimetria (F1-F2)	3,47 ± 1,56	6,24 ± 1,81	4,81 ± 1,27	4,57 ± 1,46	0,233

. P = interação SME × Deslorelina, em ambos os marcos (início e fim). No fim do tratamento, o F1 apresentou variância entre-éguas colapsada (inferência frágil, pois o modelo não conseguiu estimar a variabilidade entre éguas para esse parâmetro); o F3 (P = 0,027) é o sinal mais defensável.

Tabela 4. Comparações das médias marginais (mm) ± Erro Padrão dos diâmetros dos folículos F1, F2 e F3 no dia da OPU, entre os subgrupos experimentais.

	SME negativo		SME positivo		P	P SME
Parâmetro	**Controle**	**Deslorelina**	**Controle**	**Deslorelina**	**Deslo**	
No dia da OPU						
F1	26,28 ± 0,36	26,81 ± 0,43	26,39 ± 0,26	26,78 ± 0,31	0,214	0,916
F2	21,62 ± 1,78	18,37 ± 2,06	20,93 ± 1,46	18,37 ± 1,62	0,033	0,874
F3	16,06 ± 2,22	14,47 ± 2,40	16,86 ± 1,85	14,39 ± 1,99	0,110	0,900
Assimetria (F1-F2)	4,64 ± 1,92	8,63 ± 2,17	5,32 ± 1,58	8,61 ± 1,74	0,008	0,890

Tabela 5. Média (mm/dia) ± Erro Padrão das taxas de crescimento folicular nos últimos 10 dias antes da OPU por grupo experimental.

	Tratamento		*Status* Metabólico	
Taxa (mm/dia)	**Controle**	**Deslorelina**	**Negativo**	**Positivo**
F1	2,64 ± 0,06	2,67 ± 0,06	2,67 ± 0,08	2,65 ± 0,05
F2	2,12 ± 0,11[a]	1,38 ± 0,11[b]	2,01 ± 0,14	1,68 ± 0,09

F3	1,36 ± 0,13	1,30 ± 0,15	1,43 ± 0,19	1,29 ± 0,12
Assimetria (F1-F2)	0,67 ± 0,11	1,10 ± 0,12	0,64 ± 0,15	0,98 ± 0,10

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre os grupos Controle e Deslorelina.

3.4 Efeitos da SME e do acetato de deslorelina sobre os intervalos temporais da dinâmica folicular

Éguas do grupo Deslorelina precisaram de 1,27 dias a mais entre o início do tratamento e a aspiração (P=0,004) e de 1,36 dias a mais (P=0,050) entre a emergência da onda e o fim do tratamento. Não houve diferença significativa entre éguas com e sem SME nos intervalos temporais avaliados (Tabela 6).

Tabela 6. Intervalo médio (dias) ± Erro Padrão entre a emergência da onda até o início do tratamento (Deslorelina ou NaCl 0,9%), emergência da onda até término do tratamento, início do tratamento até a OPU e fim do tratamento até a OPU.

	Tratamento		***Status* Metabólico**	
Variável	**Controle (n=37 aspirações/ 7 éguas)**	**Deslorelina (n=26 aspirações/ 6 éguas)**	**Negativo (n=22 aspirações/ 3 éguas)**	**Positivo (n=41 aspirações/4 éguas)**
Intervalo entre emergência da onda até o início do tratamento	5,88 ± 0,64	6,50 ± 0,71	4,81 ± 0,88	6,88 ± 0,73
Intervalo entre emergência da onda até o fim do tratamento	8,87 ± 0,66[a]	10,23 ± 0,73[b]	7,86 ± 0,94	10,28 ± 0,78
Intervalo entre o início do tratamento e a OPU	5,33 ± 0,24[a]	6,60 ± 0,28[b]	5,45 ± 0,30	6,09 ± 0,22
Intervalo entre fim do tratamento e a OPU	2,27 ± 0,17*	2,88 ± 0,20*	2,36 ± 0,22	2,61 ± 0,16

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre os grupos Controle e Deslorelina.
**indica tendência estatística (0,05<P<0,1).*

4. DISCUSSÃO

A administração de baixas doses de acetato de deslorelina durante o crescimento folicular aumentou significativamente em 1,87 dias o intervalo entre sessões de OPU, com tendência de aumento de 1,19 dias no intervalo entre o surgimento do primeiro folículo ≥10 mm e o dia da OPU. O tratamento com deslorelina não foi capaz de aumentar o número de folículos ≥10 mm no dia da

OPU, o número de folículos aspirados, o número de oócitos recuperados ou as taxas de recuperação e maturação oocitária, sugerindo que, apesar da deslorelina modular a dinâmica do crescimento folicular, ela não se traduziu em ganhos quantitativos e qualitativos nos índices avaliados. Este protocolo visava estimular a liberação de FSH e LH, promovendo, assim, a presença de mais folículos no dia da OPU, além de melhorar o microambiente folicular, o que não foi confirmado pelos resultados observados.

Fisiologicamente, o GnRH é liberado por duas regiões do hipotálamo em padrões distintos. Acredita-se que baixas doses de análogo de GnRH, como a utilizada no experimento, possam estimular a liberação de FSH. O centro tônico (núcleos ventromedial e arqueado) libera GnRH de forma episódica e com baixa amplitude[33], favorecendo a secreção do FSH[34], enquanto o centro de pico (núcleos pré-óptico e supraquiasmático e área hipotalâmica anterior) libera GnRH com maior frequência e amplitude[33], resultando em um pico de LH[34].

Estudos anteriores utilizaram baixas doses de deslorelina para estimular o desenvolvimento folicular múltiplo em éguas. Nagao et al. (2012) e Azevedo et al. (2015) utilizaram 100 µg de deslorelina IM a cada 12 horas e obtiveram aumento nas taxas de dupla ovulação e recuperação embrionária[28,29]. Entretanto, esses estudos focaram em indução de ovulações múltiplas em éguas jovens e férteis, contexto diferente do presente experimento com éguas idosas.

A diferença de resposta entre esses estudos e o presente trabalho aponta para múltiplos fatores relacionados à idade avançada das doadoras. É sabido que éguas idosas apresentam declínio progressivo da reserva ovariana e redução na responsividade folicular à estimulação gonadotrópica[3,35]. De acordo com Carnevale (2008), o processo de envelhecimento ovariano em éguas é caracterizado por elevação nas concentrações de FSH e ovulações intermitentes, refletindo falência ovariana progressiva[6]. Nestas condições, a estimulação exógena com a deslorelina pode não superar as limitações intrínsecas do ovário senescente. Farquhar et al. (2000) demonstraram, de forma consistente, que a eficácia da deslorelina como indutor de ovulação é dependente da idade da égua, sendo menor em animais acima de 20 anos[36].

Adicionalmente, sabe-se que a idade avançada também reflete na competência oocitária. Catandi et al. (2021) demonstraram que oócitos de éguas idosas apresentam função e capacidade metabólica alteradas, com redução nas

taxas de consumo de oxigênio – um indicador de respiração mitocondrial -, e acidificação extracelular – indicador de glicólise anaeróbica[37]. O avanço da idade materna também predispõe à degeneração mitocondrial durante a maturação *in vitro*, caracterizada por edema mitocondrial e redução do número de cópias de DNA mitocondrial[10]. É possível que a idade avançada associada à SME acelere ou intensifique estes processos degenerativos oocitários.

Além da menor responsividade, um segundo mecanismo pode explicar a ausência de resultados positivos do tratamento. A administração repetida de deslorelina durante o crescimento folicular pode eventualmente resultar em dessensibilização dos receptores de GnRH na hipófise, evento conhecido como *downregulation*[38]. Em outras espécies, esse efeito tem sido utilizado para suprimir a função reprodutiva[39], mas no contexto de estimulação da função ovariana pode limitar a resposta gonadotrófica após os primeiros dias de tratamento. De acordo com Nagao et al. (2012), períodos de tratamento de 3 dias reduzem a ocorrência de *downregulation*[28]; no presente estudo, a duração média do tratamento foi de 4,63 dias, o que teoricamente poderia favorecer esse fenômeno. Éguas tratadas com deslorelina precisaram de mais tempo entre o início do tratamento e o dia da aspiração em comparação com o grupo controle e entre a emergência da onda e o fim do tratamento, sem diferença associada ao *status* metabólico, indicando que esse prolongamento está relacionado ao próprio protocolo de estimulação, e não a uma resposta específica das éguas com SME. Esse resultado é compatível com o entendimento de que o estímulo adicional de FSH fornecido pela deslorelina, em éguas idosas que já apresentam FSH basal elevado[14], não acelera, mas possivelmente atrasa, o processo de crescimento folicular, independentemente do *status* metabólico.

De acordo com Cuervo-Arango et al. (2019), a contagem de folículos antrais, o número de folículos aspirados e oócitos recuperados são significativamente menores em éguas idosas comparado a éguas de meia idade, mas as taxas de clivagem e formação de blastocisto são similares, sugerindo que a competência para desenvolvimento dos oócitos de éguas idosas não está comprometida. Entretanto, os autores observaram que a taxa de maturação oocitária é significativamente maior em éguas idosas comparadas com éguas de 8 a 13 anos (66,7 vs. 54,3%, respectivamente)[40], resultado superior ao observado no presente estudo, possivelmente devido às diferenças no *status*

metabólico das éguas avaliadas, ao meio de cultivo e às condições laboratoriais. Cabe ressaltar que a taxa de maturação isoladamente não permite afirmar que esses oócitos apresentam boa competência oocitária.

Quanto aos impactos da SME sobre parâmetros reprodutivos, esse efeito não atingiu significância estatística na maioria dos índices avaliados, com exceção de uma tendência de aumento no intervalo entre sessões de OPU. Esse resultado não permite concluir que a SME compromete os índices de recuperação e maturação oocitária avaliados, mas, diante do número reduzido de doadoras, também não permite descartar essa possibilidade.

Embora o presente estudo não tenha demonstrado diferença estatística na taxa de recuperação oocitária entre éguas com e sem SME, a relevância clínica potencial desse parâmetro é bem documentada em outras espécies. Mulheres com resistência insulínica não tratada submetidas à fertilização *in vitro* apresentaram menores números de oócitos recuperados, embriões disponíveis e de embriões de boa qualidade, além de menores taxas de nascidos vivos e de implantação[41]. Esse paralelo reforça que, mesmo diferenças numéricas pequenas ou não significativas na taxa de recuperação podem ter impacto relevante sobre o número final de embriões produzidos por sessão de OPU, justificando a investigação dessa variável em estudos com maior poder amostral.

Da mesma forma, ainda que a maturação oocitária não tenha diferido estatisticamente entre éguas com e sem SME, a diferença numérica observada (59,30% vs. 45,10%) seria clinicamente relevante caso confirmada em estudos com maior poder amostral. Do ponto de vista prático, esse resultado é relevante dentro de um contexto comercial, uma vez que éguas idosas com alterações metabólicas são frequentemente destinadas a programas de produção *in vitro* de embriões, nos quais pequenas variações no número de oócitos maturados podem impactar a eficiência do processo e o número de embriões produzidos. De todo modo, a deslorelina não se mostrou uma boa alternativa para contornar os efeitos deletérios da SME sobre a eficiência de recuperação e maturação oocitária, já que não houve diferença significativa em nenhum índice de quantidade ou qualidade oocitária, apenas no prolongamento dos intervalos entre aspirações e entre o início do tratamento e a OPU.

Em mulheres com obesidade, níveis elevados de insulina podem reduzir a expressão de receptores de FSH nas células da granulosa e a produção de

estradiol[42], refletindo um ambiente ovariano menos responsivo, podendo, em tese, contribuir para o atraso na foliculogênese associado à SME. Entretanto, o presente estudo não encontrou diferença estatística entre éguas com e sem SME no intervalo entre a emergência da onda e o início do tratamento, não sendo possível confirmar a hipótese.

A dinâmica folicular equina é controlada pelo aumento do FSH, que atinge seu pico máximo quando o maior folículo tem cerca de 13 mm, sendo esse o principal hormônio responsável pelo recrutamento dos folículos antrais[31]. Além da possibilidade de menor responsividade ao FSH, éguas com SME também apresentam alterações no ambiente folicular, com aumento nas concentrações de insulina, leptina e citocinas pró-inflamatórias no líquido folicular, alterações na expressão gênica nas células da granulosa associadas a maturação oocitária e folicular[43], enquanto éguas obesas apresentam disfunções mitocondriais e acúmulo lipídico nas células do *cumulus* e no oócito[44], o que corrobora com a hipótese de que o *status* metabólico interfere na foliculogênese desde as fases iniciais.

Essa alteração do ambiente folicular pode ajudar a explicar a alteração na curvatura de crescimento do F1 em éguas com SME, ainda que esse efeito não tenha se traduzido em diferenças no diâmetro final (já que este foi previamente determinado entre 25 e 27 mm no desenho experimental), nem na taxa de crescimento folicular. Estudos demonstraram que a composição do fluido folicular, incluindo concentrações de metabólitos, pode afetar a qualidade tanto do oócito quanto das células da granulosa[45]. É plausível que a desregulação metabólica sistêmica associada à SME ocasione alterações na composição do fluido folicular, comprometendo os processos de crescimento e maturação folicular.

Esse possível efeito da resistência à insulina sobre a qualidade oocitária também é descrito em outras espécies e condições. Em camundongos, a hiperinsulinemia induzida por dieta reduziu o número de folículos pré-antrais e antrais e prolongou o ciclo estral[46], além de induzir estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e menor número de oócitos MII[47]. Em mulheres com síndrome do ovário policístico e hiperinsulinemia, a taxa de maturação oocitária *in vitro* foi significativamente menor em comparação com mulheres sem hiperinsulinemia (47 vs. 59%)[48], efeito atribuído a mecanismos multifatoriais que incluem estresse

oxidativo e inflamação de baixo grau[49], alterações na ultraestrutura mitocondrial[50,51], desregulação parácrina de fatores de crescimento[52], distúrbios no metabolismo de ácidos graxos nas células da granulosa e no fluido folicular[53], estresse do retículo endoplasmático[54] e resposta ovariana reduzida ao FSH recombinante[55].

Em relação à tendência de aumento do intervalo entre sessões consecutivas de OPU em éguas com SME, este achado pode sugerir que esses animais requerem um período mais prolongado para emergência da onda e crescimento folicular após a aspiração, reduzindo a frequência com que podem ser submetidas ao procedimento em programas comerciais de produção *in vitro* de embriões. No entanto, esse achado deve ser confirmado em estudos com maior poder amostral.

Essa tendência de prolongamento do intervalo entre OPUs em éguas com SME pode refletir também processos inflamatórios persistentes e comprometimento da capacidade de reparação tecidual após a OPU. A OPU envolve a punção do estroma ovariano e aspiração do conteúdo folicular, processos que geram inflamação local e requerem reorganização do tecido ovariano para restabelecimento da foliculogênese[56]. Éguas com SME apresentam concentrações plasmáticas aumentadas de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1 beta (IL-1β) e interleucina-6 (IL-6)[57]. A inflamação crônica de baixo grau associada à SME pode retardar esses processos de recuperação ovariana.

Ademais, a refratariedade à estimulação gonadotrófica observada em éguas com SME sugere que as alterações metabólicas não são apenas sistêmicas, mas também locais, no microambiente folicular. Sabe-se que a ativina, um membro da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β), é crucial para sensibilizar as células da granulosa ao FSH, enquanto a folistatina, seu antagonista, quando em excesso, pode neutralizar essas ações[58], comprometendo o desenvolvimento folicular adequado. Em mulheres com síndrome do ovário policístico observa-se aumento nas concentrações circulantes de folistatina e redução da ativina[59]. Isso poderia contribuir para a alteração na curvatura de crescimento do F1 observada em éguas com SME, embora o presente estudo não tenha encontrado evidências de um atraso generalizado no crescimento folicular.

Em relação a dinâmica de crescimento folicular, o tratamento com deslorelina alterou significativamente a curvatura de crescimento do F1, e o *status* metabólico também influenciou essa curvatura de forma independente. A ausência de interação tripla significativa entre tratamento, SME e tempo indica que o efeito da deslorelina sobre a forma da curva foi semelhante entre éguas com e sem SME. Na análise estratificada por subgrupo, houve diferença significativa no diâmetro do F1 ao fim do tratamento, com o grupo SME positivo que recebeu Deslorelina apresentando o menor valor entre os quatro subgrupos. Esse resultado indica um efeito conjunto entre SME e deslorelina sobre esse parâmetro, mas o desenho estatístico não permite atribuir a diferença especificamente a um dos dois fatores isoladamente. Além disso, essa estimativa apresentou variância entre-éguas colapsada no modelo, o que fragiliza a inferência e requer cautela na interpretação. No dia da OPU, essa diferença deixa de ser observada, já que foi padronizada a aspiração quando o maior folículo se apresentasse entre 25 e 27 mm, equalizando o diâmetro do maior folículo nesse momento.

Para o F2, a deslorelina reduziu significativamente o diâmetro no dia da OPU e ampliou a assimetria entre o F1 e F2. Esse efeito é consistente com a redução significativa observada na taxa de crescimento do F2 nos últimos 10 dias que antecederam a OPU (2,12 para 1,38 mm/dia), indicando que a deslorelina não apenas resultou em um folículo subordinado de menor diâmetro final, mas também desacelerou seu ritmo de crescimento ao longo do processo, compatível com o mecanismo de desvio folicular, no qual a redução da taxa de crescimento do maior folículo subordinado, e não apenas seu diâmetro final, caracteriza a supressão exercida pelo folículo dominante[31,60]. Esses efeitos foram observados como efeito principal do tratamento, presentes tanto em éguas com SME quanto em éguas sem SME, mas não houve interação significativa entre deslorelina e *status* metabólico, indicando que a deslorelina remodela a hierarquia folicular de forma consistente, independentemente da condição metabólica da égua.

Na dinâmica de crescimento do F3, a deslorelina alterou significativamente a curvatura, com tendência de efeito semelhante da SME sobre esse mesmo parâmetro. Na análise estratificada por subgrupo, houve redução significativa no diâmetro do F3 ao final do tratamento, com o grupo SME

positivo que recebeu a Deslorelina apresentando o menor valor, sendo este o sinal mais defensável da análise estratificada. Entretanto, no dia da OPU essa diferença não se confirmou.

Esse conjunto de resultados sugere que a deslorelina modula a dinâmica de crescimento dos folículos subordinados, alterando sua inclinação e curvatura ao longo do tempo, de forma compatível com o mecanismo de dominância folicular, no qual o folículo selecionado passa a suprimir o crescimento dos demais[31,60]. Contudo, essas alterações só se traduziram em diferenças de diâmetro em momentos e subgrupos específicos: no F3, ao final do tratamento, em éguas com SME; e no F2 e na assimetria F1-F2, no dia da OPU, como efeito principal da deslorelina em ambos os *status* metabólico. O efeito da SME sobre a dinâmica folicular mostrou-se restrito à curvatura de crescimento do folículo dominante e à interação específica com a deslorelina no terceiro folículo ao final do tratamento, não configurando um padrão de atraso no crescimento folicular ao longo de toda a onda.

Esse padrão de resposta é o oposto ao que se esperava do protocolo, em que ele foi pensado para estimular a secreção de FSH e favorecer o desenvolvimento de múltiplos folículos, de modo semelhante aos protocolos de superovulação em éguas[28,29], reforçando a hipótese de que, se essas éguas idosas com e sem SME já apresentavam aumento basal de FSH, é possível que o estímulo adicional fornecido pela deslorelina tenha encontrado pouca margem para agir, já que os folículos subordinados, além de não serem beneficiados pelo tratamento como inicialmente se esperava, também foram negativamente afetados pela deslorelina em algumas análises.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Sabe-se que a senescência ovariana avançada é acompanhada por disfunção mitocondrial e marcada redução da reserva folicular[3,37]. É possível que o estresse fisiológico decorrente do envelhecimento celular atinja um patamar funcional já tão comprometido que um eventual impacto adicional da SME sobre os parâmetros avaliados se torne estatisticamente difícil de distinguir do declínio reprodutivo basal já imposto pela idade. Estudos futuros com éguas de diferentes faixas etárias permitiriam avaliar a interação entre a idade, *status* metabólico e efeito da deslorelina sobre os parâmetros reprodutivos. Adicionalmente, o número reduzido de doadoras limitou o poder estatístico da análise,

especialmente para o fator SME, cujos efeitos foram tratados como exploratórios.

Outra limitação a ser considerada é que a silagem de milho fornecida para as éguas continha 15,88% de amido na matéria seca. Cavalos saudáveis alimentados com refeições concentradas contendo ≥1,1 g de amido/kg de peso vivo apresentam respostas glicêmica e insulinêmica mais pronunciadas[61]. No entanto, como a silagem neste estudo era disponibilizada continuamente ao longo do dia, e não na forma de refeições, não é possível estimar a quantidade de amido ingerida por evento alimentar, o que impede uma comparação direta com esse limiar. Ainda assim, esse achado ressalta a importância de analisar bromatologicamente a dieta em estudos futuros com éguas com suspeita de disfunção metabólica, já que a composição nutricional não foi ajustada individualmente conforme o *status* metabólico dos animais.

5. CONCLUSÃO

O tratamento com baixas doses de acetato de deslorelina não promoveu melhorias nos índices de recuperação e maturação oocitária em éguas idosas. No entanto, prolongou significativamente o intervalo entre sessões de OPU e a duração do tratamento, com tendência de prolongamento no intervalo entre o surgimento do primeiro folículo ≥10 mm e a OPU. Sobre a dinâmica folicular, a SME alterou significativamente a curvatura de crescimento do F1 e, em interação com a deslorelina, reduziu o diâmetro do F3 ao final do tratamento. Esses efeitos, restritos a esses dois pontos específicos, não se traduziram em folículos consistentemente menores ou em redução da taxa de crescimento ao longo de toda a onda folicular nos três folículos avaliados. A deslorelina modificou a hierarquia folicular independentemente do *status* metabólico, reduzindo o diâmetro do F2 e aumentando a assimetria entre F1 e F2 no dia da OPU. Esses achados não sustentam o uso desse protocolo como estratégia para melhorar os índices reprodutivos de éguas idosas, com ou sem SME.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

Agradecemos às Dra Raquel Puelker e Dra Carol Soares pelo fornecimento do

meio de maturação *in vitro* utilizado durante o experimento.

Competing interests statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

Raiane Silva Miranda: writing – Review & Editing, Writing – Original draft, Visualization, Validation, Conceptualization, Investigation. **Fernanda Saules Ignácio**: Methodology, Validation. Visualization, Resources, Writing- Review & Editing, Project administration. **Beatriz Lippe de Camillo**: Formal analysis, Investigation. **Cezinande de Meira**: Writing- Review & Editing, Supervision.

REFERÊNCIAS

[1] Claes A, Ball BA, Scoggin KE, Roser JF, Woodward EM, Davolli GM, et al. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. Theriogenology. 2017;97:34-40.

[2] Carnevale EM, Ginther OJ. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. Theriogenology. 1992;37:1101–15.

[3] Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. Biol Reprod. 1995;52:209–14.

[4] Morris LHA, Allen WR. Reproductive efficiency of intensively managed thoroughbred mares in Newmarket. Equine Vet J. 2002;34:51–60

[5] Allen WR, Brown L, Wright M, Wilsher S. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. Equine Vet J. 2007;39:438–45.

[6] Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. Theriogenology. 2008;69:23-30.

[7] Rizzo M, du Preez N, Ducheyne KD, Deelen C, Beitsma MM, Stout TAE, et al. The horse as a natural model to study reproductive aging-induced aneuploidy and weakened centromeric cohesion in oocytes. Aging. 2020;12:22220–32.

[8] Carnevale EM, Frank-Guest BL, Stokes JE. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. Animal Reproduction Science. 2010;121:258-259.

[9] Rizzo M, Ducheyne KD, Deelen C, Beitsma MM, Cristarella L, Quartuccio M, et al. Advanced mare age impairs the ability of in vitro-matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. Equine Vet J. 2019;51:252-7.

[10] Rambags BPB, van Boxtel DCJ, Tharasanit T, Lenstra JA, Colenbrander B, Stout TAE. Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. Theriogenology. 2014;81:959-

65.

[11] Carnevale EM, Catandi GD, Fresa, K. Equine Aging and the Oocyte: A Potential Model for Reproductive Aging in Women. Journal of Equine Veterinary Science. 2020;89: 103022.

[12] Catandi GD, Bresnahan DR, Peters SO, Fresa KJ, Maclellan LJ, Broeckling CD, et al. Equine maternal aging affects the metabolomic profile of oocytes and follicular cells during different maturation time points. Front Cell Dev Biol, 2023;11:1239154.

[13] Hendriks WK, Colleoni S, Galli C, Paris DBBP, Colenbrander B, Stout TAE. Mitochondrial DNA replication is initiated at blastocyst formation in equine embryos. Reproduction, Fertility and Development. 2019;31:570-8.

[14] Carnevale EM, Bergfelt DR, Ginther OJ. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. Animal Reproduction Science. 1993;31:287-99.

[15] Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Siddiqui MAR, Beg MA. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. Reproduction, Fertility and Development. 2008;20:955-63.

[16] Huang L, Xu L, Yun C, Qiao J, Qi X. Peripheral organ crosstalk in the regulation of ovarian endocrine function and reproductive homeostasis. Life Medicine. 2025;20:1-18.

[17] Durham AE, Frank N, Mcgowan C, Menzies-Gow NJ, Roelfsema E, Vervuert I, et al. ECEIM consensus statement on Equine Metabolic Syndrome. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2019:33:335-49.

[18] Schott HC, Coursen CL, Eberhart SW, Nachreiner RJ, Refsal KR, Ewart SL, et al. The Michigan Cushing's project. In: Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2001. San Diego: AAEP; 2001;47:22–24.

[19] Donaldson MT, Lamonte BH, Morresey P, Smith G, Beech J. Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). Journal of Veterinary Internal Medicine. 2002;16:742-6.

[20] McGowan CM, Neiger R. Efficacy of trilostane for the treatment of equine Cushing's syndrome. Equine Veterinary Journal. 2003;35:414-8.

[21] Wyse CA, McNie KA, Tannahill VJ, Murray JK, Love S. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. Veterinary Record. 2008;162:590-1.

[22] Stephenson HM, Green MJ, Freeman SL. Prevalence of obesity in a population of horses in the UK. Veterinary Record. 2011;168:131.

[23] Thatcher CD, Pleasant RS, Geor RJ, Elvinger F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2012;26:1413-8.

[24] Muno J, Gallatin L, Geor RJ. Prevalence and risk factors for hyperinsulinemia in clinically normal horses in central Ohio. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2009;23:721.

[25] Morgan RA, McGowan TW, McGowan CM. Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in queensland, Australia. Australian Veterinary Journal. 2014;92:101-6.

[26] Claes A, Stout TAE. Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. Theriogenolog. 2022;187:215-8.

[27] Campbell M. It is all in the timing: ovulation induction in the mare. Veterinary Record. 2012;170:538-9.

[28] Nagao JF, Neves Neto JR, Papa FO, Alvarenga MA, Freitas-Dell'aqua CP, Dell'aqua Junior JA. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. Animal Reproduction Science. 2012;136:69-73.

[29] Azevedo MV, Souza NM, Ferreira-Silva JC, Batista IO, Moura MT, Oliveira MAL, et al. Induction of multiple ovulations in mares using low doses of GnRH agonist Deslorelin Acetate at 48 hours after luteolysis. Pferdeheilkunde. 2015;31:160-4.

[30] Ignácio FS, Montechiesi DF, Bergfelt DR, Orlandi CMB, Carvalho LR, Puoli Filho NJ, et al. Ultrasound-guided aspiration of dominant follicles (≥25 mm) followed by luteinization and progesterone production during the estrous cycle in mares. Theriogenology. 2021;160:128-33.

[31] Ginther OJ, Beg MA, Gastal MO, Gastal EL. Follicle dynamics and selection in mares. Anim. Reprod. 2004; 1:45-63.

[32] Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TAE. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. 2019; 31:1894-1903.

[33] Jeong KH, Kaiser UB. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. In: Knobil E, Neill JD. The Physiology of Reproduction. 3rd ed. San Diego, CA: Elsevier; 2006;3:1635-701.

[34] Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. Molecular and Cellular Endocrinology. 2018;463:131-41.

[35] Ginther OJ, Carnevale EM, Bergfelt DR. Delay in emergence of the ovulatory follicular wave in old mares. Journal of Equine Veterinary Science. 1993;13:75-9.

[36] Farquhar VJ, McCue PM, Vanderwall DK, Squires EL. Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. J Equine Vet Sci. 2001;20:722-5.

[37] Catandi GD, Obeidat YM, Broeckling CD, Chen TW, Chicco AJ, Carneval EM. Equine maternal aging affects oocyte lipid content, metabolic function and developmental potential. Reproduction. 2021;161:399-409.

[38] Irvine CHG, Alexander SL. GnRH. In: McKinnon AO, Voss JL. Equine Reproduction. Filadelfia: Lea & Febiger; 1993;25:37–44.

[39] Trigg TE, Wright PJ, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle AG, et al. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of

reproductive function in male and female domestic dogs. Journal of Reproduction and Fertility. 2001;57:255-61.

[40] Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. Theriogenology. 2019;132:36-44.

[41] Bai X, Chang R, Qing M, Jiang B, Zhang C. Impact of insulin resistance on in vitro fertilization outcomes in overweight and obese women: a retrospective cohort study. Human Fertility. 2025; 28: 2526768.

[42] Xu P, Huang BY, Zhan JH, Liu T, Fu Y, Su YQ, et al. Insulin Reduces Reaction of Follicular Granulosa Cells to FSH Stimulation in Women With Obesity-Related Infertility During IVF. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2018;104:2547-60.

[43] Sessions-Bresnahan DR, Carnevale EM. The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. Journal of Animal Science. 2014; 92:1485-1494.

[44] Catandi GD, Fresa KJ, Cheng MH, Whitcomb LA, Broeckling CD, Chen TW, Chicco AJ, Carnevale EM. Follicular metabolic alterations are associated with obesity in mares and can be mitigated by dietary supplementation. Scientific Reports. 2024; 14:7571.

[45] Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, et al. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology. 2004;62:1131-43.

[46] Zhang QL, Wang Y, Liu JS, Du YZ. Effects of hypercaloric diet-induced hyperinsulinemia and hyperlipidemia on the ovarian follicular development in mice. Journal of Reproduction and Development. 2022;68:173-80.

[47] Ou XH, Li S, Wang ZB, Li M, Quan S, Xing F, et al. Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. Human Reproduction. 2012;27:2130-45.

[48] Vlaisavljević V, Kovač V, Čižek Sajko M. Impact of insulin resistance on the developmental potential of immature oocytes retrieved from human chorionic gonadotropin–primed women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro maturation. Fertilily and Sterility. 2009;91:957-9.

[49] Awonuga AO, Camp OG, Abu-Soud HM. A review of nitric oxide and oxidative stress in typical ovulatory women and in the pathogenesis of ovulatory dysfunction in PCOS. Reproductive Biology and Endocrinology. 2023, 21:1-15.

[50] Chappell N.R., Zhou B., Schutt A.K., Gibbons W.E., Blesson C.S. Prenatal androgen induced lean PCOS impairs mitochondria and mRNA profiles in oocytes. Endocr. Connect. 2020;9:261–270.

[51] Chappell N.R., Zhou B., Hosseinzadeh P., Schutt A., Gibbons W.E., Blesson C.S. Hyperandrogenemia alters mitochondrial structure and function in the oocytes of obese mouse with polycystic ovary syndrome. F S Sci. 2021;2:101–112.

[52] Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbot DH. Polycystic Ovary Syndrome and

832 Oocyte Developmental Competence. Obstet Gynecol Surv. 2008; 63:39-48.

833 [53] Tian Y, Wang A, Li F, Wang S, Shang J, Zhang K, Bai X. Fatty acid
834 metabolism of granulose cells and follicular fluid and their associations with
835 embryo quality in normal-weight women with PCOS. J Ovarian Res. 2025; 18:1-
836 14.

837 [54] Koike H, Harada M, Kusamoto A, Xu Z, Tanaka T, Sakaguchi N, Kunitomi C,
838 Azhary JMK, Takahashi N, Urata Y, Osuga Y. Roles of endoplasmic reticulum
839 stress in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. Front Endocrinology.
840 2023; 14:1-8.

841 [55] Harrison TNH, Chang RJ. Ovarian Response to Follicle Stimulating Hormone
842 in Women with Polycystic Ovary Syndrome is Diminished Compared to Ovulatory
843 Controls. Clin Endocrinol. 2023; 97:310-18.

844 [56] Pereira LAAC, Ferreira CS, Dias KSSA, Nogueira JM, Pinto FCH, Jorge EC,
845 et al. Ovarian puncture triggers an inflammatory response that did not affect late
846 folliculogenesis, ovulation rate, and fertility. Reproductive Sciences.
847 2024;31:3202-14.

848 [57] Vick MM, Adams AA, Murphy BA, Sessions DR, Horohov DW, Cook RF, et
849 al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity
850 in the horse. Journal of Animal Science. 2007;85:1144–55.

851 [58] Knight PG, Glister C. TGF-β superfamily members and ovarian follicle
852 development. Reproduction review. 2006;132:191-206.

853 [59] Norman RJ, Milner CR, Groome NP, Robertson DM. Circulating follistatin
854 concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic
855 ovarian syndrome. Human Reproduction. 2001;16:668-72.

856 [60] Ginther OJ. Follicle selection in mares as a modeI for illustrating the many
857 hormonal and biochemical interactions that drive a single physiological
858 mechanism. Journal of Equine Veterinary Sciente. 2023; 121:104196.

859 [61] Vervuert I, Voigt K, Hollands T, Cuddeford D, Coenen M. Effect of feeding
860 increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in
861 healthy horses. The Veterinary Journal. 2009;182(1):67-72.