

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS EDUARDO CAMARGO

**FATORES REPRODUTIVOS QUE INTERFEREM EM UM PROGRAMA
COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS DE HIPISMO**

**CURITIBA
2008**

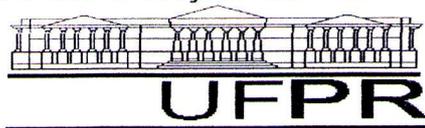
CARLOS EDUARDO CAMARGO

**FATORES REPRODUTIVOS QUE INTERFEREM EM UM PROGRAMA
COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS DE HIPISMO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias, Curso de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss
Co-orientadores: Prof. Dr. Nei Moreira
Prof. Dr. Luiz Ernandes
Kozicki

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

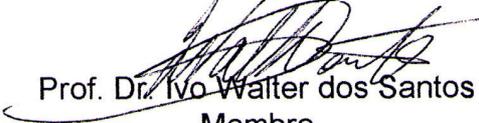


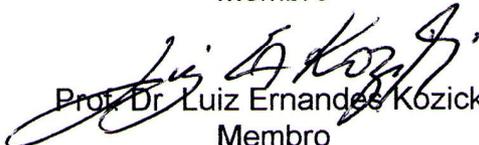
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**FATORES REPRODUTIVOS QUE INTERFEREM EM UM PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS DE HIPISMO**” apresentada pelo Mestrando CARLOS EDUARDO CAMARGO, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou o candidato Apto para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 17 de dezembro de 2008.


Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Presidente/Orientador


Prof. Dr. Ivo Walter dos Santos
Membro


Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e à Carolina, pois foram os que mais acreditaram no meu esforço e nos meus sonhos

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de qualquer forma para a realização deste trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela coragem, vontade e principalmente pela força em todos os momentos.

Meu especial agradecimento aos meus pais, pois sem eles nada seria possível. Obrigado Mãe e Pai, pela confiança em mim depositada, pelo carinho e amor, que mesmo a distância, foram fundamentais em minha vida. Vocês que abriram mão de muitos sonhos em função dos meus. Não há palavras que expressem minha gratidão e meu amor.

Ao meu irmão, que sempre ao meu lado, acreditou nos meus sonhos, ajudando e incentivando a minha profissão.

A Carolina, mais que uma namorada, uma grande amiga e companheira, pelo seu apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Aos Amigos e Médicos Veterinários Mário e Marília Duarte, pelas oportunidades de estágios e trabalhos e por tudo que me ensinaram em reprodução eqüina. Devo muito a vocês.

Ao Professor e Amigo Marcio Segui, pelo incentivo dentro da reprodução animal, bem como as oportunidades de aprimoramento profissional que foram essenciais em minha vida.

Ao Professor Kozicki, pelos ensinamentos, incentivos e principalmente pelas oportunidades de aprimoramento em minha prática de docência.

Ao Professor Romildo pela orientação e pelos ensinamentos passados através de sua vasta experiência.

A Professora e Amiga Cláudia Pimpão, pelo auxílio na estatística.

Aos colegas de mestrado, Ciro, Rogério e Priscilla, pelo tempo que passamos juntos durante os dois anos.

A colega Médica Veterinária Michele Lenzi pela ajuda durante a dissertação.

Enfim, gostaria agradecer todos que fizeram com que de alguma forma eu tenha chego até aqui.

“É muito melhor ousar fazer coisas grandiosas, triunfar gloriosamente, mesmo que com alguns fracassos no meio do caminho, do que se igualar àquelas pobres almas que não aproveitam nem sofrem muito, pois vivem na penumbra cinza de quem não sabe o que é a vitória nem a derrota”.

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

A transferência de embriões (TE), de modo similar à outras biotecnologias da reprodução, apresenta significativas vantagens na sua aplicação, contando porém com certas limitações. Essa biotecnologia aplicada aos eqüinos, desenvolveu-se rapidamente nas últimas duas décadas. Contudo, algumas características fisiológicas peculiares assim como problemas técnicos têm limitado seu amplo uso na espécie eqüina quando comparado com a espécie bovina. O sucesso de um programa de transferência de embriões está intimamente relacionado à taxa de recuperação dos embriões a partir das éguas doadoras, sendo que as maiores candidatas para estes programas incluem éguas idosas com histórico reprodutivo ruim, que não conseguem produzir um potro por monta natural ou inseminação artificial e éguas que participam de esportes eqüestres e não podem gestar. Neste trabalho foram compilados dados referentes a quatro estações reprodutivas de um centro especializado em transferência de embriões eqüinos. As variáveis utilizadas para o capítulo 1 foram: estação do ano, dia da coleta do embrião, conservação do sêmen e número de ovulações das doadoras e para o capítulo 2: tamanho do embrião, grau do embrião, estágio embrionário e sincronia entre doadoras e receptoras. O objetivo foi identificar dentro de um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo, aspectos relacionados com as colheitas e as taxas finais de prenhez de receptoras.

Palavras chave: égua, biotecnologia, transferência de embriões.

ABSTRACT

The embryo transfer (ET), so similar to other biotechnology of reproduction, has significant advantages in its application, but with certain limitations. This biotechnology applied to horses, has grown rapidly over the last two decades. However, some unique physiological characteristics as well as technical problems have limited its use in equine species when compared with the bovine. The success of a program of embryo transfer is closely related to the recovery rate of embryos from donor mares, and the highest candidates for these programs include older mares with poor reproductive history, which can not produce a foal by natural or mounts artificial insemination and mares involved in equestrian sports and can not stay pregnant. In this study were compiled data from four seasons of a reproductive center specializing in equine embryo transfer. The variables used for chapter 1 were: the season, day of the embryo collection, preservation of sperm and number of ovulation of the donor and to Chapter 2: Size of the embryo, the embryo level, embryonic stage and synchrony between donors and recipients.

These figures are related to harvesting and transfer of embryos held in the center. The objective was check which factors have greater interference in the rates of recovery and embryonic receiving end of pregnancy.

Key words: mare, biotechnology, embryo transfer

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1) JUSTIFICATIVA.....	9
1.2) OBJETIVOS.....	9
1.3) ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1) HISTÓRICO DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	11
2.2) FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA EQUINA.....	12
2.3) DINÂMICA FOLICULAR EM ÉGUAS.....	15
2.4) INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS.....	18
2.5) TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS.....	20
2.6) SINCRONIZAÇÃO DO CIO E DA OVULAÇÃO ENTRE DOADORAS E RECEPTORAS COM VISTAS À TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	21
2.7) TÉCNICA DE COLHEITA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS.....	26
2.8) SELEÇÃO DE ÉGUAS RECEPTORAS.....	28
2.9) POTENCIAIS FATORES DE INFLUÊNCIA SOBRE O RESULTADO DA COLHEITA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS.....	31
2.10) POTENCIAIS FATORES QUE AFETAM AS TAXAS DE PREENHEZ APÓS A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EQUINOS.....	33
CAPÍTULO 1	37
CAPÍTULO 2	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

A utilização da Transferência de Embriões (TE) em eqüinos tem aumentado rapidamente nas últimas duas décadas. Contudo, algumas características biológicas peculiares assim como problemas técnicos têm limitado seu amplo uso na espécie eqüina quando comparado com a espécie bovina (Squires et al., 1999).

As maiores candidatas para o programa de TE incluem éguas idosas com histórico reprodutivo insatisfatório, ao não conseguirem produzir um potro seja por monta natural ou por inseminação artificial (IA), embora as taxas de perdas embrionárias em fêmeas idosas sejam mais elevadas e a fertilidade decresça com a idade da égua (Merkt et al., 2000; Lopes, 2002; Squires et al., 2003;). Segundo Squires et al.(2003) éguas que estão em competição, são também fortes candidatas a esta biotecnologia.

A biotecnologia da TE consiste na colheita de um oócito fecundado (embrião) de uma égua denominada de doadora, dotada de carga genética superior, sendo o referido embrião, transferido (inovulado) para o útero de outra égua, denominada de receptora, a qual terá a função de levar a gestação adiante até seu final (Andrade, 1986).

Em relação à TE, o Brasil ocupa lugar de destaque na utilização desta técnica ao lado dos Estados Unidos e da Argentina, sendo um dos líderes, realizando em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (Carneiro, 2005).

No início da década de 70, apenas a associação americana da raça Quarto de Milha abriu seu livro de registros para os potros nascidos frutos da biotecnologia da transferência de embriões (Squires et al., 1999).

Atualmente diversas associações de eqüinos e de criadores de cavalos passaram a se beneficiar da TE, como é o caso das associações brasileiras dos criadores de cavalos da raça Brasileiro de Hipismo (ABCCBH), da raça Mangalarga Marchador (ABCCMM), da raça Mangalarga (ABCCM), da raça Quarto de Milha (ABQM), da raça Árabe (ABCCA), da raça Paint Horse (ABCPaint) e da raça Campolina (ABCCC) (Carmo, 2003).

As taxas de recuperação embrionária após lavagem uterina e de prenhez relatadas no Brasil, têm variado entre 45,5% a 83,3% segundo relatos de Farinasso et al. (1989); Meira e Henry (1991); Pastorello et al. (1996).

1.1) Justificativa

A transferência de embriões na espécie eqüina é uma biotecnologia da reprodução em franca expansão. Porém os resultados obtidos muitas vezes deixam a desejar.

1.2) Objetivos

- a) Identificar dentro de um programa comercial de transferência de embriões, aspectos relacionados com as colheitas de embrião;
- b) Identificar dentro de um programa comercial de transferência de embriões, aspectos relacionados às taxas de prenhez pós transferência de embriões;
- c) Identificar os fatores de maior influência nos índices de recuperação embrionária;

- d) Identificar os fatores de maior influência nos índices de prenhez pós-transferência de embriões.

1.3) Estrutura da dissertação

A primeira parte da dissertação é referente à introdução do assunto que foi pesquisado, em seguida a revisão de literatura geral do trabalho. O capítulo 1 discorre sobre fatores reprodutivos que interferem nos índices de recuperação embrionária em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo. Já o capítulo 2 trata dos fatores reprodutivos que interferem nos índices de prenhez em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Histórico da transferência de embriões

A primeira transferência de embriões em animais ocorreu em 1890, na Universidade de Cambridge – Inglaterra, onde Walter Heaper realizou a primeira transferência de embriões em animais de laboratório (coelha), com insucesso (Gonsalves et al., 2002). Em 1929, Gregory Pincus e colaboradores obtiveram o primeiro produto de transferência de embriões em coelha (Andrade, 1986).

Na espécie bovina, o primeiro relato foi descrito por Willet et al. em 1951 na universidade de Wiscosin (EUA), resultando no nascimento do primeiro bezerro fruto da biotecnologia. Em 1960, o mesmo grupo de pesquisadores relatou a importância da sincronização do estro entre doadoras e receptoras (Gonsalves et al., 2002).

Na década de 60, ocorreu significativo avanço na transferência de embriões na espécie bovina e a partir da década de 70 na mesma espécie, houve um grande impulso para o programa comercial de embriões nos EUA, devido à modificação da técnica cirúrgica através da laparotomia medial sob anestesia geral inalatória e posteriormente em nível de flanco, para a técnica não cirúrgica transcervical, viabilizando e facilitando o uso desta técnica a nível de fazenda (Gonsalves et al. 2002).

O primeiro relato de transferência de embriões na espécie bovina no Brasil foi realizado pelo Professor Doutor J. HAHN em 1977, na Universidade Federal de Santa Maria – RS, viabilizando a técnica aos meados dos anos 80 para todo o país (Gonsalves et al. 2002).

Por sua vez na espécie eqüina, os estudos envolvendo a transferência de embriões foram realizados em 1969 por um grupo de pesquisadores japoneses. O mesmo grupo de pesquisadores relatou mais tarde (1972) uma taxa de 45% de

sucesso nas colheitas dos embriões, porém nenhuma concepção foi confirmada (Oguri e Tsutsumi, 1972).

Dois anos depois, os mesmos pesquisadores seguindo a mesma linha de estudo, coletaram 18 embriões em 20 éguas, transferindo 15 destes pelo método não cirúrgico transcervical, para éguas receptoras em sincronismo de -5 a +7 dias, em relação às éguas doadoras, obtendo um percentual de concepção de 40% dos embriões transferidos (Oguri e Tsutsumi, 1974).

Em 1972, na Inglaterra, foi relatado o nascimento do primeiro potro nascido de um programa de transferência de embriões através da técnica cirúrgica (Andrade, 1986).

No Brasil, a transferência de embriões na espécie eqüina teve seu marco inicial em 1987, tendo sido introduzido no país pelo Médico Veterinário João Junqueira Fleury mediante o método cirúrgico (Fleury et al., 1987), e por Marc Henry e Cezinande Meira pelo método não cirúrgico (Henry e Meira, 1987).

2.2) Fisiologia reprodutiva da fêmea equina

As éguas são animais classificados como poliétricos estacionais, pois possuem sua estação reprodutiva na primavera e no verão. Três são os fatores básicos, que explicam o caráter estacional dos ciclos estrais nas éguas: nutrição, temperatura e fotoperíodo (Arruda, 1990).

O ciclo estral na espécie eqüina é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, estro e diestro (Andrade, 1986), podendo-se também denominá-las de fase folicular e fase luteal (Dieleman et al., 1986), que são intervaladas entre dois períodos sucessivos de cio (Andrade, 1986). A definição de ciclo estral de éguas mais próxima da ideal é a do período entre duas ovulações, no

qual existe uma fase onde a égua apresenta evidentes sinais de estro, ou quando esses sinais não forem aparentes, onde há uma baixa concentração de progesterona (concentração inferior a 1 ng/mL) (Hughes et al., 1986).

Éguas mantidas sob dias longos (16h de luz/dia) apresentam atividade ovariana cíclica, enquanto que éguas mantidas em dias curtos (8.5h) apresentam ovário sem ciclicidade (animal em anestro). Esta variável ocorre, em função de dias curtos, quando associa-se o decréscimo na secreção de gonadotrofinas hipofisárias acarretando uma redução da atividade ovariana (Nagy et al., 2000).

O ciclo estral em éguas apresenta uma duração média de $21,7 \pm 3,5$ dias. A fase folicular ou de estro apresenta uma duração média de $6,5 \pm 2,6$ dias e a fase luteal ou de diestro $14,9 \pm 2,8$ dias durante a estação fisiológica de monta (Ginther, 1992). A duração da fase folicular é primariamente influenciada pela estação do ano, podendo também sofrer variações individuais ou raciais. A duração do estro decresce com o correr da estação, coincidindo com o auge do verão, época na quais os dias são mais longos, o fotoperíodo é maior e a foliculogênese é acelerada. A duração média do estro para observações individuais varia de 2 a 12 dias e parece imparcialmente ter repetibilidade dentro de cada indivíduo (Daels et al., 2002).

No estro, a fêmea eqüina apresenta receptividade sexual ao garanhão, estando o trato genital preparado para aceitar e transportar os espermatozóides e a ovulação deverá ocorrer. Já no diestro, a fêmea não se mostra receptiva sexualmente ao macho e o trato genital deverá preparado para receber e nutrir o concepto (Daels; Hughes, 1993). Durante o estro, o endométrio eqüino apresenta-se edemaciado e o útero apresenta aumento da sua contratilidade, fazendo com que a pressão intra-uterina se eleve e auxilie o transporte dos espermatozóides até a junção útero-tubárica (Allen et al., 2002). A secreção de progesterona, por sua vez,

pode alterar o edema uterino, tanto em quantidade (menor edema) como em qualidade (menor duração), demonstrando o efeito da progesterona na dissipação do edema uterino (Pelehach et al., 2002).

Alterações fisiológicas podem ser observadas à palpação uterina, via toque retal, sendo usadas clinicamente e experimentalmente como uma forma para determinar o estágio do ciclo estral nas éguas. Durante o estro o tônus uterino é relativamente flácido, tornando-se mais tenso durante o diestro (por volta do 16º ao 25º de gestação, quando o útero apresenta sua tensão máxima. No início da gestação o tônus uterino é de suma importância para a fixação e orientação da vesícula embrionária (Hayes; Ginther, 1986). Bonafos et al. (1994) afirmaram que a progesterona é o único fator capaz de promover um aumento do tônus uterino. A partir do 30º dia de gestação o tônus uterino não apresenta diferença entre éguas não-prenhes tratadas desde o dia da ovulação com 100 mg de progesterona e éguas gestantes. No entanto, entre os dias 11 e 29 de gestação as éguas prenhes apresentam um maior tônus devido a uma estimulação local realizada pelo concepto durante o período de mobilidade. Porém, Hayes e Ginther (1986), utilizando éguas ovariectomizadas, constataram que a progesterona é capaz de causar tônus equivalente ao observado no diestro, mas o tônus máximo, semelhante ao tônus encontrado por volta do 16º. ao 25º dia pós-ovulação, só é detectado quando a progesterona está associada ao estrógeno. Samper (1997) afirma que o edema uterino é um indicador confiável da competência estrogênica do folículo dominante, mas Watson et al. (2003) demonstraram que o edema uterino pode ocorrer na presença de folículos anovulatórios, até mesmo quando estes folículos produziram baixas concentrações de estradiol.

2.3) Dinâmica folicular em éguas

Com o uso da ultra-sonografia na reprodução eqüina na década de 80, uma maior precisão da atividade ovariana, no que diz respeito ao recrutamento, crescimento, divergência e atresia folicular, pôde ser estudada (Palmer e Driancourt, 1980), correlacionando-se a dinâmica folicular aos mecanismos reguladores hormonais (Mapletoft et al., 1994; Fortune, 1994).

Em eqüinos, semelhante aos bovinos e ovinos, durante a fase luteal ocorre o desenvolvimento de ondas de crescimento folicular, diferente do que ocorre em ratos, suínos e primatas, onde o crescimento folicular fica restrito à fase folicular (Fortune, 1994).

Com a formação do antro folicular, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas para novo desenvolvimento, o qual é evidente pela expressão de receptores de FSH nas células da granulosa e de receptores de LH nas células da teca interna, ocorrendo o crescimento de vários folículos em sincronia, estabelecendo-se uma onda de crescimento folicular (Webb et al., 1999). Segundo Ginther (1992) a definição de onda folicular maior se aplica a um conjunto de folículos que inicialmente exibem crescimento sincronizado, sucedidos pelo crescimento preferencial de apenas um, ocasionalmente dois folículos. A onda folicular maior divide-se em onda primária e onda secundária. A onda folicular primária inicia-se na metade do diestro e dá origem ao folículo ovulatório (>35mm). A onda secundária emerge no início do estro e usualmente resulta na formação de grandes folículos anovulatórios (>20 mm) ou, mais raramente, em ovulação durante o diestro. As ondas que não apresentam folículos dominantes são classificadas como ondas menores (Ginther, 1992).

A ocorrência de ovulações durante o diestro, observadas em éguas (ovulações secundárias com incidência de 25%) durante uma fase em que as concentrações de LH encontram-se baixas, com a presença de alta progesterona, sugere que o aumento pré-ovulatório de LH não é um pré-requisito absoluto para o processo de ovulação nesta espécie. Como consequência, essas ovulações secundárias podem levar à uma condição de persistência luteal, já que no momento em que o endométrio está secretando PGF2 α , este CL secundário estaria refratário a ação luteolítica do mesmo (Daels, 1993).

Estudos comparativos da dinâmica folicular entre raças, tem indicado maior predisposição à duas ondas foliculares para as raças PSI (Stabenfeldt et al., 1972), Apallosa e Quarto de Milha (Ginther e Bergfeld, 1993), quando comparadas com as raças Árabe e Pônei (Ginther, 1992; Dimmick et al., 1993) na primeira metade da estação reprodutiva.

Meira e Buratini (1998) realizaram um estudo visando à caracterização do desenvolvimento folicular em éguas Mangalarga. Os folículos maiores que 10 mm de diâmetro, no dia 17 do ciclo estral, foram diariamente monitorados individualmente por ultra-sonografia. Uma ou duas ondas foliculares foram detectadas, respectivamente, em 81,25% (13/16) e 18,75% (3/16) dos ciclos.

A ovulação na espécie eqüina ocorre quando o folículo atinge por volta de 35 a 60 mm, com média em torno de 45 mm (Ginther, 1990; Ginther, 1985; Shirazi; Gharagozloo et al., 2004).

Ovulações múltiplas (predominantemente duplas ovulações) podem ocorrer normalmente em éguas, sendo esta característica uma variação individual de cada animal, havendo também um fator hereditário envolvido (Urwin, 1983). A incidência de ovulações múltiplas em um determinado ciclo estral em éguas está entre 4 e

43% . Vários fatores como, raça, predisposição genética, e estágio reprodutivo, têm influenciado a incidência de dupla ovulação (Squires et al,1987).

Carnevale, Mckinnon e Squires (1988), estudando folículos pré-ovulatórios observaram que a ovulação ocorre num período de 5 a 90 segundos, quando pouco ou nenhum líquido folicular fica interno ao folículo após a ovulação.

Na égua, a secreção do hormônio luteinizante (LH) não ocorre de maneira abrupta como nos outros mamíferos, mas sim de maneira crescente e essa produção se inicia 6 a 8 dias antes da ovulação (Ginther, 1979). A produção mais alta de LH só irá ocorrer aproximadamente entre os dias 1 e 3 pós-ovulação. O final da maturação do oócito, a ruptura do folículo e a evacuação do fluido folicular têm que ser bastante coordenada para que ocorra um sucesso na ovulação (Pierson, 1993).

Aspecto relevante relativo à endocrinologia reprodutiva de eqüinos é que o pico de LH ocorre aproximadamente 2 dias após a ovulação, e a concentração de LH na circulação permanece elevada por um longo período, podendo estender-se por uma semana ou mais após-ovulação (Miller et al., 1980). Greaves et al. (2001) sugeriram que a queda na liberação de LH pós-ovulação ocorre devido a um "feedback" negativo entre a progesterona e o GnRH. A progesterona age na hipófise, alterando a responsividade ao GnRH e com isso promove redução da secreção de LH. O GnRH é o mais expressivo regulador da secreção tanto de LH quanto de FSH em éguas em diestro (Alexander e Irvine, 1996).

2.4) Inseminação artificial em éguas

A inseminação artificial é a biotécnica da reprodução mais importante e mais utilizada visando o melhoramento genético das espécies, em função de que poucos machos selecionados produzem espermatozóides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano. Em contraste, poucos produtos podem ser obtidos de todas as fêmeas por ano, mesmo com o advento de novas biotécnicas como a transferência de embriões e a fertilização in vitro (AX et al., 2000).

Para a detecção das éguas em cio é necessária a chamada rufiação e quando não é possível executar esta prática, faz-se necessária a realização de uma avaliação ginecológica por palpação retal para identificar a presença ou não de folículos e a consistência do útero, a fim de se determinar em que fase do ciclo estral encontra-se o animal (BRISKO e VARNER, 1992).

O ideal é que se faça o controle folicular com acompanhamento ultrassonográfico em programas de inseminação de eqüinos, a fim de se prever a ovulação e decidir o melhor momento para a IA, limitando assim o número de inseminações (BRISKO e VARNER, 1992).

Nos eqüinos, a IA com pipeta orientada manualmente é realizada após a limpeza da vulva e seus arredores com papel toalha e na seqüência é calçada a luva plástica lubrificada com soro fisiológico para o toque retal. A extremidade anterior da pipeta de plástico (modelo IA para bovinos), é protegida com a mão do técnico, para a introdução na vagina, sendo a mesma orientada pelo dedo indicador para passagem pela cérvix. O sêmen é aplicado no corpo do útero, com seringa de plástico adaptada à pipeta (WEISS et al, 2003).

As inseminações com sêmen fresco e refrigerado são suficientemente difundidas e a maioria dos criatórios de eqüinos utiliza-se destas técnicas, obtendo resultados satisfatórios. Entretanto, a utilização do sêmen congelado ainda é restrita, pois além de exigir um melhor controle do momento da ovulação, os resultados são inferiores aos obtidos com sêmen fresco e refrigerado (SQUIRES et al., 1999, WEISS et al, 2003).

Quando se utiliza sêmen fresco de garanhões sem problemas reprodutivos, as inseminações podem ser realizadas a cada 48 horas, até a detecção da ovulação, com 250 a 500 milhões de espermatozóides viáveis, sendo os resultados semelhantes aos obtidos com a monta natural (BRISKO e VARNER, 1992).

Sabe-se que o momento de se realizar as inseminações com sêmen refrigerado é mais crítico do que com sêmen fresco. Os melhores resultados com sêmen refrigerado são obtidos quando as inseminações são realizadas em um intervalo de zero a 24 horas antes da ovulação, com 500 milhões a um bilhão de espermatozóides. As taxas de concepção para os garanhões que possuem boa qualidade de sêmen após 24 horas de refrigeração é aproximadamente 10% menor do que as taxas obtidas com sêmen fresco (SQUIRES et al., 1999).

A porcentagem de prenhez com a utilização do sêmen congelado é baixa e bastante variável, sendo que esta variação se deve a diferentes protocolos de congelamento; ao efeito do garanhão; a diferença na fertilidade das éguas e aos diferentes protocolos de inseminação (BRISKO e VARNER, 1992). Indica-se que a IA com sêmen congelado seja realizada de zero a 24 horas antes da ovulação, ou até 6 horas após (SQUIRES et al., 1999).

Com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade de indivíduos subfêrteis, e maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial e conseguir

melhores resultados com a aplicação do sêmen congelado, alguns autores têm realizado a IA histeroscópica em eqüinos. Nesta técnica se faz a deposição do sêmen sobre a junção útero-tubárica com auxílio de um endoscópio. Morris et al. (2000) obtiveram um índice de prenhez de 60%, inseminando 15 éguas com 10 milhões de espermatozóides provenientes de sêmen fresco, os quais foram depositados sobre a papila tubárica com auxílio de um endoscópio.

PAPA e DELL'AQUA JÚNIOR (2001) avaliaram o efeito do local de deposição do sêmen e a concentração da dose inseminante e obtiveram 20% de prenhez com a deposição de 50 milhões de espermatozóides antes da ovulação no corpo do útero e nenhuma prenhez com a deposição do mesmo número de gametas na extremidade do corno. Com a deposição de 150 milhões de espermatozóides pré e 150 milhões de espermatozóides pós-ovulação obtiveram 40% de prenhez quando o sêmen foi depositado no corpo do útero e 50% quando o sêmen foi depositado na extremidade do corno, não sendo observada diferença estatística entre os grupos com diferentes locais de deposição do sêmen.

RIGBY et al. (2001) obtiveram taxas de prenhez similares ao se comparar a inseminação artificial profunda em corno uterino com endoscópio e pipeta flexível.

2.5) Transferência de embriões em eqüinos

A transferência de embriões, assim como qualquer outra biotecnologia reprodutiva, apresenta aplicações vantajosas e limitações. A principal aplicação relatada por MEIRA e BURATINI, (1998), visa elevar o nível genético da progênie, porém, os elevados custos desta biotecnologia limitam-se principalmente aos gastos em manter as éguas receptoras, pelo fato de aguardar vários ciclos para receberem

o embrião, uma vez que a espécie eqüina é monovulatória (SQUIRES e SEIDEL, 1995).

ALLEN (1982) relata que as principais limitações na transferência de embriões estão relacionadas com a dificuldade da biotecnologia superovulatória e ao processo de congelação de embriões, uma vez que o sucesso da criopreservação de embriões é maximizada aos embriões em fase de mórula (SQUIRES et al., 1999).

Dentre os fatores que podem influenciar a taxa de prenhez em programa de transferência de embriões, citam-se: a sincronização da doadora e da receptora, a qualidade dos embriões, o método de inovulação, as condições nutricionais e uterina das doadoras e das receptoras e o manejo geral das receptoras (Squires et al., 1999).

2.6) Sincronização do cio e da ovulação entre doadoras e receptoras com vistas à transferência de embriões.

Nas éguas a sincronização do estro e da ovulação possui uma maior complexidade, quando comparada com outras fêmeas de animais domésticos. Provavelmente isso ocorre devido à longa fase folicular que possuem as éguas e pela dificuldade que se tem de se adequar o controle do crescimento folicular (DOUGLAS, 1986). A sincronização do estro e da ovulação permite que éguas sejam cobertas ou inseminadas artificialmente em um período pré-determinado, com ou sem a detecção de cio. A principal aplicação da sincronização do estro e da ovulação em éguas é na transferência de embriões, quando a ovulação da égua receptora deve ocorrer um dia antes a dois dias após a ovulação da égua doadora (SQUIRES, 1993).

Em estudos mais antigos, havia grande preocupação com a sincronia entre doadora e receptora. Resultados de um programa com grande número de transferências cirúrgicas utilizando éguas receptoras que haviam ovulado dois dias antes (+2) a três dias depois (-3) em relação à doadora, revelaram apenas uma queda na taxa de prenhez quando do uso de receptoras +2, sem diferenças entre os demais dias (McKINNON e SQUIRES, 1988). OGURI e TSUTSUMI (1980) reportaram 63% de prenhez após transferência não-cirúrgica para receptoras que ovularam 48 h depois da doadora contra 0% em receptoras que ovularam 48 h antes da doadora. Dessa forma, preconizou-se por muitos anos a transferência dos embriões para receptoras +1 a -2, ou seja, que ovularam um dia antes até dois dias depois da doadora.

Diversos estudos têm demonstrado que o sincronismo entre as éguas doadoras e receptoras de embriões é fundamental para o sucesso da transferência de embriões, constatando-se que os melhores índices de gestações para as éguas receptoras são os sincronismos entre -3 e +1 em relação às éguas doadoras (sincronismo "0" é o dia da ovulação). (MCKINNON et al., 1988; SQUIRES e SEIDEL, 1995; PERES et al., 2002).

Trabalhos mais recentes têm mostrado que a sincronia entre doadoras e receptoras pode ser bem mais flexível do que se pensava, até porque se pode realizar a colheita do embrião em dias diferentes. Segundo JACOB et al. (2002), receptoras ovuladas um dia antes até cinco dias após a doadora podem ser utilizadas sem afetar as taxas de prenhez. Na verdade, mais relevante que a sincronia entre doadora e receptora é o número de dias pós-ovulação que a receptora apresenta no momento da transferência, conforme salientado por CARNEVALE et al. (2000).

A esse respeito, dados de diversas estações reprodutivas em dois programas comerciais no Brasil com as raças Mangalarga e Mangalarga Marchador foram analisados e revelaram similaridade ($P>0.05$) nas taxas de prenhez em receptoras que foram utilizadas do terceiro ao oitavo dia pós-ovulação (FLEURY et al., 1989; JACOB et al., 2002). Esses resultados são de grande importância prática, uma vez que conferem maior flexibilidade à utilização das receptoras reduzindo, por conseguinte, o número de receptoras alojadas e o tempo necessário para torná-las gestantes.

Quando em um rebanho com expressivo número de éguas receptoras for avaliado, as éguas que ovularem no período apropriado devem ser selecionadas, mas quando um pequeno número de receptoras for utilizado, a ovulação da doadora e da receptora deve ser sincronizada (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 1998).

Prostaglandina e progesterona têm sido utilizadas na tentativa da sincronização da ovulação em éguas. Porém, a combinação de progesterona e estradiol-17 β têm se mostrado mais eficiente, pois esse tratamento inibe o desenvolvimento folicular mais uniformemente do que a progesterona utilizada isoladamente. O resultado é uma menor variação no momento da ovulação. Progesterona (150 mg) e estradiol-17 β (10 mg) em veículo oleoso são administrados via intramuscular diariamente durante 10 dias, com 10 mg de prostaglandina (PgF2 α), também intramuscular, aplicada no dia 10. O tratamento da primeira receptora deve ser iniciado um dia após o início do tratamento da doadora e a segunda receptora dois dias após, visando garantir que a receptora não ovule antes que a doadora. (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 1998).

Após o 10º dia de tratamento, todas as éguas devem ser monitoradas por ultrassonografia diária para detectar o dia da ovulação. Em geral as éguas ovulam 9 a 13 dias após a aplicação da prostaglandina F 2 alfa (SQUIRES, 1993). Quando a gonadotrofina coriônica humana (hCG) é administrada após a detecção de um folículo de 35 mm, aproximadamente 75% das éguas ovulam no dia 10 a 12 após o término do tratamento, ou seja esse folículo ovula de 24 a 48 horas após a aplicação do hCG, acelerando a maturação final do folículo e a ovulação (SQUIRES, 1993).

Duas receptoras devem ser sincronizadas para cada doadora, sendo que a com a melhor sincronização deve ser escolhida para a transferência. Outro motivo para a utilização de duas receptoras ocorre quando são coletados dois embriões de uma doadora (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 1998).

Outras excelentes candidatas a inovulação são as receptoras que ovulam três dias após a doadora, indicando-se a administração intramuscular de progesterona (300 mg/dia), iniciando-se a aplicação no dia da ovulação. Esse tratamento irá resultar em uma adequada receptora para a TE, mesmo se esta ovular 5 a 6 dias após a doadora. O tratamento com a progesterona deve ser mantido por pelo menos 5 dias, até que o corpo lúteo (CL) da receptora torne-se totalmente funcional (SQUIRES, 1993). Recentemente uma preparação injetável de progesterona de longa ação (P4 LA) (1,500 mg) vem sendo utilizada a cada sete dias em éguas ciclanco após a administração da prostaglandina F2 alfa (PGF2 alfa) e efetivamente mantém os níveis de P4 durante a fase luteal das éguas (PESSOA, 2004). O uso da P4 LA é extremamente vantajoso, pois as formas de progesterona de curta ação requerem bastante trabalho e estressa o animal devido às repetidas injeções diárias utilizadas nos animais (PESSOA, 2004).

Em éguas que estão ciclando, a proposta da indução da ovulação é aprimorar os índices reprodutivos e sincronizar a ovulação no momento mais próximo da cobertura do garanhão ou da inseminação artificial (PALMER, 1993). Quando se utiliza sêmen a fresco ou a cobertura natural, o intervalo de 0 a 48 horas da inseminação até a ovulação é aceitável, mas ao se utilizar sêmen congelado, esse intervalo reduz-se a menos de 24 horas, ou seja, a precisão é torna-se muito maior (PALMER, 1993). O método mais apropriado para a indução da ovulação consiste na detecção do desenvolvimento e tamanho do folículo através da palpação retal, ou preferivelmente da ultra-sonografia, induzindo-se à ovulação quando o folículo atinge um determinado tamanho (PALMER, 1993). Muito embora uma dimensão mínima (em mm) à resposta ovulatória de um folículo, provocada mediante estímulo da administração de LH não ter sido especificamente estudada, PALMER (1993) relata bons resultados ao utilizar agentes indutores da ovulação em folículo mínimo de 35 mm para uma resposta satisfatória.

O uso da hCG para induzir a ovulação em éguas foi primeiramente descrito por Day (1939). Desde o início, o uso do hCG como um agente ovulatório tem sido muito estudado e frequentemente usado na prática (VOSS, 1993). Em esquemas de sincronização de estro (SC), o hCG é freqüentemente usado em combinação com agentes luteolíticos ou produtos que estimulem a atividade folicular, como o GnRH e seus análogos, pois ele quando usado sozinho torna-se ineficiente (VOSS, 1993). A dose para induzir a ovulação varia de 1500 a 4000 UI administrada intravenosa ou intramuscular, sendo em geral mais utilizada é a de 2500 UI via intravenosa (VOSS, 1993). Já DAVIDSON (1947) havia demonstrado que a ovulação foi induzida entre 24 e 48 horas após a injeção de hCG (PALMER, 1993). A principal desvantagem do uso da hCG, além do elevado custo, é que devido a ele ser uma proteína, sua

administração exógena acaba produzindo anticorpos contra ele mesmo (VOSS, 1993). Os primeiros pesquisadores a reportar os efeitos adversos da administração do hCG observaram uma redução na porcentagem de éguas que respondiam favoravelmente durante sucessivos ciclos. Uma completa falha na resposta a indução da ovulação foi encontrada no terceiro ciclo seguido do uso do hCG (PALMER, 1993). Mais tarde outro grupo de pesquisadores confirmou que éguas desenvolvem anticorpos após duas a cinco injeções quando utilizadas em sucessivos ciclos (VOSS, 1993).

O acetato de deslorelina é um agonista sintético do GnRH, sendo 144 vezes mais potente que o GnRH puro (CONN & CROWLEY, 1991). A administração em éguas no estro com um folículo maior que 35 mm induz à ovulação em aproximadamente 42 horas (MUMFORD et al., 1995). De acordo com BRADECAMP (2007), a grande vantagem da utilização do acetato de deslorelina é que este fármaco possui um menor peso molecular comparado ao hCG, podendo ser administrado várias vezes durante a estação de monta, reduzindo as chances de criação de anticorpos mesmo após várias aplicações.

2.7) Técnica de colheita e transferência de embriões em eqüinos

Para a colheita de embriões podem ser utilizados dois métodos: o método cirúrgico e o não cirúrgico, sendo que esse último, o mais utilizado como rotina. As colheitas podem ser realizadas no 7º e 8º dias após a ovulação, com cateteres possuindo balão com capacidade para 75 ml de ar, com comprimento variando entre 80 e 150 cm, podendo ser alongado com mangueira plástica siliconizada (FLEURY et al., 2001). Uma técnica bastante difundida no Brasil é descrita por FLEURY et al. (1999) para coletas de embriões variando de 7 a 9 dias após a ovulação da doadora.

Os autores obtiveram taxa de recuperação embrionária, de visualização do embrião no filtro e taxa de prenhez de 58,0; 72,1 e 74,7 % para embriões de 8 dias e de 54,5; 94,7 e 76,5 % para embriões de 9 dias, respectivamente. O procedimento não cirúrgico de coleta do embrião do lúmen uterino é relativamente simples. Após introduzir o catéter pela cérvix (via transvaginal) e alojá-lo no corpo uterino, o balão é inflado com 50 ml de ar, tracionando-se para ser mantido em íntimo contato com a porção uterina da cervix. (FLEURY et al., 2001). Através deste catéter, são infundidos de 1 a 3 litros de meio tamponado no útero da égua, dependendo do tamanho do útero da doadora. Este fluido é então drenado diretamente para um filtro. O procedimento é repetido de uma a três vezes. O embrião é identificado e qualificado morfológicamente. A transferência pelo método não cirúrgico é o mais utilizado devido à facilidade, sendo semelhante à inseminação artificial. Coloca-se o embrião em uma pipeta de inseminação, transferindo-o para o corpo do útero (CARNEIRO, 2005).

Na transferência transcervical, a égua receptora deverá ser preparada da mesma maneira que a doadora. O operador deve utilizar luva de palpação. Em seguida uma seringa de 10 ml, deve ser acoplada a uma pipeta de inseminação, e todo o material utilizado deve estar estéril. Em seguida, aproximadamente 4 ml de ar é sugado para o interior da seringa e a extremidade da pipeta é posicionada junto à placa de Petry contendo o embrião (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 1998b). A pipeta é preenchida, respeitando-se a seguinte seqüência: coluna de meio (PBS + 15% de SFB) + coluna de ar + coluna de meio contendo o embrião + coluna de ar + coluna de meio (FLEURY et al., 2001). Isso previne a que o embrião se movimente dentro da pipeta reduzindo as chances de perda do mesmo (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 1998b). Na seqüência, o operador utiliza

uma pequena quantidade de lubrificante estéril e atravessa a pipeta manualmente pela vagina. Com o dedo indicador da mão, gentilmente dilata-se o lúmen cervical, introduzindo a pipeta pela cérvix até chegar ao útero. Retira-se o dedo e segura-se firmemente a cérvix, até que todo o conteúdo da seringa seja depositado no útero da receptora. Na seqüência, retira-se vagarosamente a pipeta (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 1998b).

2.8) Seleção de éguas receptoras

O sucesso em um programa comercial de TE depende da identificação dos fatores que afetam a gestação e a morte embrionária (CARNEVALE et al., 2000). SQUIRES, MCCUE e VANDERWAL (1999) e CARNEVALE et al. (2000) relataram que o fator mais importante para se obter sucesso em um programa de transferência de embriões é a escolha e o manejo das receptoras.

Seleção e manejo de receptoras podem ser fatores muito importantes afetando o sucesso de um programa de transferência de embriões em eqüinos. Os critérios de seleção incluem tamanho ideal, idade, temperamento dócil e bom desenvolvimento mamário. As receptoras necessitam ter um ciclo estral normal e serem livres de problemas reprodutivos (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; LOPES, 2002; SQUIRES et al., 2003).

Esta seleção de éguas aptas a serem utilizadas como receptoras, continua sendo o maior problema em um programa de transferência de embriões (DOWSETT; WOODWARD; BODERO, 1989). Na avaliação das receptoras inclui-se: detecção de um CL visível (via ultra-sonografia), presença de líquido intra-uterino, cistos e dobras endometriais e avaliação da parede uterina. Estas análises combinadas com o tônus

uterino e cervical determinados pela palpação retal, são os principais critérios utilizados para a seleção da receptora (SQUIRES; McKINNON; SHIDELER, 1988).

CARNEVALE et al. (2000), realizando um estudo retrospectivo no qual foram avaliadas 638 fêmeas eqüinas receptoras de embriões, durante os anos de 1996 a 1998, classificaram as receptoras avaliadas no 5º dia pós-ovulação como aceitáveis (CL grande e bastante ecogênico e tônus uterino e cervical de intensidade boa a excelente) ou pouco aceitáveis (CL pequeno e ou de fraca ecogenicidade e ou tônus uterino e cervical de intensidade regular a fraca). Índices de prenhez aos 50 dias de gestação foram significativamente superiores em prol das receptoras consideradas aceitáveis (60%) e (45%) para as receptoras pouco aceitáveis ($P < 0,05$). Éguas com um excelente tônus cervical e uterino apresentam taxas mais elevadas de gestação do que éguas com menores tônus (SQUIRES et al., 2003). Receptoras com baixa classificação no 5º dia pós-ovulação e com tônus uterino reduzido estão associadas às baixas taxas de gestação. A diminuição do tônus uterino, em receptoras de embriões pode ser um indicativo de que o meio ambiente uterino não apresenta uma máxima compatibilidade com o crescimento e o desenvolvimento do embrião (CARNEVALE et al., 2001). MCCUE et al. (1999) sugeriram que uma baixa concentração plasmática de progesterona, aparentemente está relacionada à uma redução no tônus uterino e cervical.

A anatomia ultra-sonográfica do útero é dramaticamente influenciada pelo estágio do ciclo estral e depende da prevalência da concentração circulatória de esteróides de origem ovariana (GINTHER, 1979). A parede uterina deve apresentar-se bastante espessada durante o estro; já em diestro a parede uterina atinge sua mínima espessura (GINTHER; PIERSON, 1984).

O uso do ultra-som permite a avaliação do útero em relação à morfoecogenicidade, à presença de contrações, à mensuração dos cornos e do corpo uterino e ainda se existe a presença de afecções, fluido, cistos endometriais, ar, fetos, corpo estranho e/ou neoplasias (GINTHER; PIERSON, 1984). HAYES et al. (1985) classificaram a morfoecogenicidade uterina em valores de um a três, sendo o um representando o útero bastante homogêneo, semelhante ao encontrado no diestro e três um útero bastante heterogêneo com a presença de dobras endometriais. Neste estudo, a classificação uterina aumentou gradualmente do sétimo dia anterior à ovulação e atingiu o seu valor mais elevado no segundo e terceiro dias pré-ovulatório, ocorrendo então um declínio até se chegar ao valor mínimo característico de diestro nos dias 2 ou 3 pós-ovulação. Os autores também alegam que o mecanismo da progesterona na caracterização do escore uterino ainda não é conhecido, corroborando dados obtidos por GINTHER e PIERSON (1984). Em observações preliminares, as caracterizações dos escores uterinos não são diferentes nas éguas, tanto no período anovulatório, quanto no meio do período de diestro. Isto sugere que baixas concentrações de estrógenos têm maior importância do que altos índices de progesterona no desenvolvimento de endométrio, característico de diestro (HAYES et al., 1985). Pesquisadores afirmam que fêmeas eqüinas que apresentam edema endometrial no quinto dia pós-ovulação não devem ser utilizadas como receptoras de embriões neste ciclo (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999; SQUIRES et al., 2003).

2.9) Potenciais fatores de influência sobre o resultado da colheita de embriões em éguas

O sucesso de um programa de transferência de embriões está intimamente relacionado à taxa de recuperação dos embriões a partir das éguas doadoras. Dados referentes a cinco anos em uma fazenda de criação da raça Mangalarga Marchador totalizando 658 lavados revelaram uma taxa de recuperação embrionária de 63,4% (JACOB et al., 2002).

SQUIRES et al. (1987) estudaram as características reprodutivas de éguas que apresentaram ovulações espontâneas simples ou duplas e de éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina. A recuperação embrionária no sétimo dia pós-ovulação foi de 58,2% para éguas com ovulação simples e de 106% para éguas com ovulação dupla espontânea. As éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina, produziram cerca de três vezes mais embriões do que as éguas controle (2,0 vs. 0,65 embriões/égua).

Recentemente, CARMO et al. (2003) estudaram a incidência de ovulações duplas em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. De um total de 829 ciclos estrais analisados, 47% apresentaram ovulações simples e 53% ovulações múltiplas (duplas ou triplas). A taxa de recuperação embrionária foi de 59% para os ciclos com ovulações simples e de 88% para os ciclos com mais de uma ovulação.

Quanto ao dia ideal para a colheita dos embriões, é sabido que o embrião eqüino chega ao útero materno entre o quinto e o sexto dia pós-ovulação (GINTHER, 1992). Colheitas realizadas seis dias após a ovulação, geralmente fornecem resultados ligeiramente inferiores, mas são necessárias quando se deseja congelar os embriões devido à maior viabilidade após a congelação e

descongelamento dos embriões de seis dias em comparação aos de sete ou mais dias (SQUIRES et al., 1999). IULIANO et al. (1985) obtiveram taxa de recuperação embrionária menor no dia 6 pós-ovulação (66%) do que no dia oito (82%). A taxa no dia sete (75%) não diferiu significativamente dos dias seis e oito.

Dados relativos a um programa comercial de TE em eqüinos no Brasil com grande número de colheitas reforçam as informações previamente mencionadas, não tendo sido verificadas diferenças significativas na recuperação embrionária nos dias sete, oito e nove pós-ovulação (49,3 58,0 e 54,5%, respectivamente segundo dados de FLEURY e ALVARENGA (1999).

Recentemente, tem sido sugerido que o desenvolvimento embrionário e o transporte pelo oviduto de éguas mais velhas, poderia estar retardado, preferindo-se assim as coletas feitas no dia 8 ou 9 como as mais apropriadas para éguas mais velhas (SQUIRES et al ., 1999).

Outro fator importante que afeta a recuperação embrionária é sem dúvida alguma o estado reprodutivo da égua doadora. Segundo SQUIRES et al.(1999) éguas idosas com histórico reprodutivo ruim, geralmente produzem menos embriões. CARNEVALE e GINTHER (1992) relataram que éguas idosas apresentaram maior incidência de inflamação endometrial, taxa de prenhez reduzida e maior incidência de morte embrionária. Além disso, a idade avançada foi relacionada ao menor tônus e contratilidade uterina. Posteriormente, estes mesmos pesquisadores CARNEVALE e GINTHER(1995) transferiram ovócitos de éguas idosas para o oviduto de éguas jovens e vice-versa. Após inseminação artificial, 30,7% (8/26) dos ovócitos de éguas idosas transferidos para jovens resultaram em formação de vesícula embrionária, enquanto os ovócitos de éguas jovens geraram 91,6% (11/12) de gestação. Os

autores concluíram então que a reduzida fertilidade das éguas idosas está associada a produção de ovócitos defeituosos.

A qualidade do sêmen a ser utilizado em um programa de TE é fator de extrema importância. Como a escolha dos garanhões é baseada em suas características morfológicas e de performance atlética e raramente leva em consideração a questão da fertilidade, não é incomum ocorrer queda da recuperação embrionária em função da utilização de sêmen de má qualidade. A fertilidade do sêmen é extremamente variável entre garanhões. As taxas de prenhez por ciclo estral em éguas após inseminação artificial com sêmen fresco de onze garanhões variaram de 40 a 79% (AMANN e PICKETT, 1987). DOUGLAS (1979) reportou taxa de recuperação embrionária de 36% com a utilização de um garanhão e de 72% com outro. Segundo SQUIRES et al., (1999) o sêmen fresco geralmente fornece melhores resultados de recuperação de embriões do que o sêmen refrigerado ou congelado.

2.10) Potenciais fatores que afetam as taxas de prenhez após a transferência de embriões eqüinos

Após duas décadas de pesquisa e desenvolvimento da técnica de transferência de embriões na espécie eqüina, não é incomum encontrar nos dias de hoje taxas de prenhez após a TE, comparáveis às obtidas por ciclo estral com o uso de monta natural ou inseminação artificial.

Dentre os fatores que podem influenciar a taxa de prenhez em um programa de transferência de embriões, podemos citar: o método de inovulação, a sincronização da doadora e da receptora, a qualidade dos embriões, as condições

nutricionais e uterina das doadoras e das receptoras e o manejo geral das receptoras (SQUIRES et al., 1999).

Dois trabalhos recentes desenvolvidos em programas de TE com a raça Mangalarga Marchador revelaram taxas de prenhez de 70,3% (JACOB et al., 2002) e 72,5% (GOMES et al., 2004). Geralmente as coletas são realizadas no dia 7 ou 8 após a ovulação, exceto os embriões para congelamento, os quais são coletados no dia 6 após a ovulação (SQUIRES et al., 1999). Embriões coletados 6 dias após a ovulação tem menores taxas de recuperação que aqueles coletados do dia 7 ao dia 9 (SQUIRES et al., 1999). Entretanto, IULANO et al. (1985) registraram taxas de recuperação de embriões de 65, 75 e 82 % para coletas no sexto, sétimo e oitavo dia após a ovulação, respectivamente, e FLEURY (1998) verificaram-se taxas de recuperação embrionária de 49,3; 58,0 e 54,5 % em coletas realizadas no sétimo, oitavo e nono dias pós-ovulação. Contudo, SQUIRES (1993) observou que embriões de nove dias (blastocisto expandido), o aumento da relação volume/superfície torna o embrião mais sensível ao manuseio.

FLEURY (1998) e FLEURY et al. (1999) concluíram que, com adequado manuseio e técnica não cirúrgica, as taxas de prenhez obtidas com embriões coletados no dia 8 ou 9 foram similares às obtidas com embriões coletados no dia 7 após ovulação. Se as receptoras são selecionadas baseadas na sincronia da ovulação das doadoras, especialmente quando se transferem embriões com 8 e 9 dias, deve-se modificar a seleção para evitar a transferência em receptoras com muitos dias pós-ovulação (CARNEVALE et al., 2000). Estudos conduzidos com embriões mais jovens mostraram que as taxas de prenhez foram menores após a transferência de pequenos embriões ou mórulas (100 a 299 micra). Esses resultados não necessariamente indicam que a viabilidade é menor quando os embriões

pequenos ou mórulas são coletados inicialmente após a ovulação, por exemplo, no dia 6. Provavelmente, muito desses embriões encontravam-se atrasados em seu desenvolvimento na ocasião das coletas (CARNEVALE et al., 2000; SQUIRES et al., 2003). Tais observações foram anteriormente relatadas por VANDERWALL, 1999, o qual verificou em éguas com idade avançada, atraso no desenvolvimento embrionário e no transporte dos mesmos pelo oviduto. Recentemente, tem sido preconizado coletas no dia 8 ou 9 pós ovulação em éguas mais velhas (SQUIRES et al., 1999). Cinquenta por cento de embriões coletados entre 10,5 e 13,5 dias pós-ovulação, não desenvolveram-se em função de colapso nas mangueiras condutoras do líquido sifonado e foram descartados (SIROIS et al., 1987). Da mesma forma, SQUIRES (1993) ressalta que os melhores índices de gestação ocorreram em embriões com oito dias de idade do que com os de nove dias de vida. De acordo com FLEURY et al. (2002) embriões grandes (blastocistos expandidos) podem ser transportados e transferidos, resultando em boas taxas de prenhez. Os autores obtiveram 77,2 % de prenhez com embriões acima de 1000 µm, transportados à temperatura ambiente. A deposição do embrião no corno uterino pode ser testada como forma de se verificar possível vantagem do mesmo na migração uterina, processo muito importante no reconhecimento materno da gestação (CARVALHO, 2000). O mesmo autor não encontrou diferenças nas taxas de prenhez de embriões depositados no corno ou no corpo uterino, muito embora cite que as taxas de prenhez em receptoras com deposição do embrião no corno uterino encorajem sua utilização.

Embriões eqüinos têm sido transferidos pelo método cirúrgico através de incisão no flanco e pelo método não-cirúrgico via transcervical. Segundo SQUIRES et al. (1999), o método cirúrgico apesar de ser mais oneroso fornece taxas de

preñez mais consistentes do que o transcervical (65 a 75% vs. 50 a 75% respectivamente). No entanto, dados provenientes de pesquisas executadas por SILVA (2003) e de programas comerciais de TE no Brasil conduzidos por profissionais criteriosos e experientes nas raças, Mangalarga (FLEURY e ALVARENGA, 1999), Mangalarga Marchador (JACOB et al., 2002; GOMES et al., 2004) e Quarto de Milha / Paint Horse (PESSÔA et al., 2004), têm demonstrado que o método transcervical gera taxas de preñez consistentes em torno de 70%, não justificando a realização do procedimento cirúrgico. Considerando o método transcervical, diferentes dispositivos têm sido utilizados na transferência. PERES et al. (2002) não observaram diferenças significativas nas taxas de preñez pós-transferência com a utilização do transferidor francês (59%), da pipeta de inseminação artificial (54%), do transferidor alemão (44%) ou do aparelho comum constituído por um tubo de aço inox, dentro do qual perpassava-se um tubo de polietileno contendo o embrião (62%).

Recentemente foi desenvolvido um método alternativo para se executar a inovulação de embriões eqüinos, consistindo em depositar o embrião no útero da receptora mediante uma injeção intra-uterina guiada por ultra-sonografia. SILVA (2003) relata que essa nova técnica foi comparada ao método transcervical e não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de preñez, as quais foram de 76,9 e 78,9%, respectivamente. Entretanto, trata-se de uma técnica mais onerosa e complexa cuja aplicação se restringe a situações especiais.

CAPÍTULO 1

ALGUNS FATORES RELEVANTES EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO, RELACIONADOS COM A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA, EM ÉGUAS DA RAÇA BRASILEIRO DE HIPISMO

Carlos Eduardo Camargo¹,
Romildo Romualdo Weiss²,
Luiz Ernandes Kozicki¹,
Nei Moreira²,
Marília Pastorello Duarte³,
Mario Cesar Garcia Duarte³,
Priscilla Ricabone Muradas³

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar alguns aspectos relevantes, com potencial poder de interferência nos índices de fertilidade, de um Centro Comercial de Transferência de Embriões em éguas da raça Brasileiro de Hipismo. A análise dos dados compreendeu às temporadas reprodutivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007, perfazendo 699 dados de colheitas de embrião de 120 animais doadores. Dentre as 120 éguas doadoras de embrião, havia animais sem e com problemas reprodutivos. Foram avaliadas as variáveis: tipo de conservação do sêmen gerador dos embriões, meses do ano em que as coletas eram executadas, dias de ovulação da doadora (idade embrionária) e tipo de ovulação (única ou múltipla). Em conclusão: foram observadas diferenças significativas relativas ao tipo de conservação do sêmen empregado nas inseminações artificiais (IAS), havendo expressivo emprego de

¹ Docentes da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba

² Docentes da universidade Federal do Paraná

³ Médicos Veterinários Autônomos

Autor para correspondência: e mail: Kozicki.l@pucpr.br – Rua Duque de Caxias, 807, ap.31, CEP 80530-040 - Curitiba - Paraná

sêmen congelado nas transferências de embrião (TEs) eqüinas; não houve diferença entre o percentual de embriões colhidos dentro ou fora da estação reprodutiva; quanto às taxas de recuperação e idade embrionária, constatou-se diferença ($p < 0,01$), nas coletas feitas nos dias 7, 8 e 9 pós ovulação ao se comparar com as taxas de recuperação dos dias 6 e 10; relativamente ao tipo de ovulação das éguas (ovulação única ou múltipla), verificou-se que nas ovulações múltiplas coletou-se maior número de embriões ($p < 0,01$) do que na ocorrência de ovulação única.

Palavras-chave: égua doadora; raça Brasileiro de Hipismo; transferência de embriões; recuperação embrionária; idade embrionária

SOME RELEVANT FACTORS REGARDING THE RATES OF EMBRYONIC RECOVERY IN A PROGRAM OF EMBRYO TRANSFER IN MARES FROM THE BRAZILIAN HORSE JUMPING

ABSTRACT

The aim of the present research work was to evaluate some relevant aspects, potentially able to interfere in the fertility rates of Brazilian horse jumping mares from a Trade Center of Embryo Transfer. Results from a total of 699 embryos samples from 120 donors animals were considered and analysed, covering the reproductive seasons of the years 2003/2004, 2004/2005; 2005/2006 and 2006/2007. Among the 120 embryo donors mares, there were healthy as well as problems ones, in regard to their reproducing capability. The following variables were evaluated: methodology for the embryo generator semen maintenance, months of the respective year when the collect was carried out, days of the donors ovulation (embryonic age) and type of ovulation (unique or multiple). As conclusion, it has been observed significant differences in the artificial inseminations (IAS) in regard to the method used for semen conservation, there have been an expressive use of frozen semen in the equine embryo transfers (TES). On the other hand, no differences were found in the collected embryo percentage within or out of the reproductive station, in regard to the collect carried out in different months of the respective year. Concerning the rates of recuperation and the embryony age, a difference ($p < 0.01$) has been observed in the collects carried out at the days 7, 8 and 9 after the ovulation, when compared with the recuperation rates from the days 6 and 10. Data relative to the embryony

recuperation regarding the mares type of ovulation (unique or multiple) it has been found that in the multiple ovulation were collected a larger number of embryos ($p < 0.01$) when compared with the number collected in the event of unique ovulation.

Key words: Donor mare, jumping mare, embryo transfer, embryo recovery, embryo age,

ALGUNOS FACTORES RELEVANTES EN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN, RELACIONADOS CON LA RECUPERACIÓN EMBRIONARIA, EN YEGUAS DE LA RAZA BRASILEÑO DE HIPISMO

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue a evaluar algunos aspectos relevantes, con potencial de interferencia en los índices de fertilidad, de un Centro Comercial de Transferencia de Embriones en yeguas de la raza Brasileño de Hipismo. El análisis de los datos correspondió a las temporadas reproductivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007, realizado 699 datos de cosechas de embrión de 120 animales donantes. De entre las 120 yeguas donantes de embrión, había animales saludables bajo el aspecto reproductivo así como animales problemas. Fue evaluadas las variables: tipo de conservación de semen generador de los embriones, meses del año en que las colectas eran ejecutadas, días de ovulación de la donante (edad embrionaria) y tipo de ovulación (única o múltipla). En último análisis: habían sido observadas diferencias significativas relativas al tipo de conservación de semen empleado en las inseminaciones artificiales (IAS), habiendo expresivo uso de semen congelado en las transferencias de embriones (TEs) equinas; relativamente a las colectas hechas en diferentes meses del año, no hubo diferencia entre el porcentual de embriones cosechados dentro o fuera de la estación reproductiva; cuanto a las tasas de recuperación y la edad embrionaria, se observó diferencia ($p < 0,01$), en las colectas hechas los días 7, 8 y 9 pos ovulación al compararse con las tasas de recuperación de los días 6 y 10; dados relativos a la recuperación embrionaria cuanto al tipo de ovulación de las yeguas (ovulación única o múltipla), se verificó que en las ovulaciones múltiplas se colectó mayor número de embriones ($p < 0,01$) que en la ocurrencia de ovulación única.

Palabras-claves: yegua donante; raza Brasileño de Hipismo; transferencia de embriones; recuperación embrionaria; edad embrionaria.

INTRODUÇÃO

Nestes últimos anos, profissionais da área vêm demonstrando expressivo desenvolvimento na qualidade e na aplicabilidade da transferência de embrião (TE) na espécie eqüina, ao executarem em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (CARNEIRO, 2005). Nesse contexto, inserem-se animais jovens, adultos bem como os idosos com histórico reprodutivo insatisfatório, em função de insucessos na produção de potro, seja por cobertura natural, seja por inseminação artificial (IA). As taxas de mortalidade embrionária nas éguas idosas são mais elevadas e a fertilidade decresce com a idade segundo Merkt et al. (2000); Lopes (2002) e Squires et al. (2003). Squires et al. (2003) descrevem que éguas em competição, são também fortes candidatas a serem submetidas a esta biotecnologia. A qualidade do sêmen a ser utilizado em programa de TE é um fator de extrema importância. A seleção de garanhões baseia-se bastante nas características morfológicas e no desempenho atlético, desconsiderando-se a questão da fertilidade, fato que contribui para a redução da recuperação embrionária devido à utilização de sêmen de má qualidade. A fertilidade do sêmen é extremamente variável entre garanhões. Segundo Squires et al. (1999) o emprego de sêmen fresco, geralmente gera melhores resultados de recuperação de embriões do que o sêmen refrigerado ou o congelado. Backman et al. (2004), relatam que a criopreservação do sêmen encontra dificuldades nas questões técnicas a serem solucionadas ressaltando-se por exemplo, a variação animal individual perante a criopreservação, ao baixo rendimento de doses por ejaculado, ao intenso manejo das éguas durante as IAS, ao maior custo por

prenhez, além das significativas variações das taxas de prenhez, em relação às obtidas com a monta natural ou com a IA, ao se utilizar sêmen fresco ou refrigerado.

Squires et al. (1987) estudaram as características reprodutivas de éguas que apresentaram ovulações espontâneas únicas ou múltiplas e de éguas superovuladas com o uso de extrato de pituitária eqüina. A recuperação embrionária no sétimo dia pós-ovulação foi de 58,2% para éguas com ovulação única e de 106,0 % para éguas com ovulação dupla espontânea. Recentemente, Carmo et al. (2002), pesquisaram a incidência de ovulações duplas em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. De um total de 829 ciclos estrais analisados, 47,0 % apresentaram ovulações únicas e 53,0 % ovulações duplas ou triplas, obtendo taxa de recuperação embrionária de 59,0 % para os ciclos reprodutivos com ovulações únicas e de 88,0% para os ciclos com mais de uma ovulação. Por sua vez Losinno et al. (2000), descrevem algumas particularidades em algumas raças eqüinas, ao relatarem a incidência de múltipla ovulação em éguas Puro Sangue Inglês, Pólo Argentino, Quarto de Milha e Apaloosa.

Dados de um programa comercial de TE em eqüinos no Brasil, com significativo número de colheitas, dão conta de que não se verificaram diferenças significativas na recuperação embrionária executada nos dias sete, oito e nove pós-ovulação, perfazendo percentuais de 49,3, 58,0 e 54,5 % respectivamente, segundo relatos de Fleury e Alvarenga (1999). Pesquisadores têm-se preocupado com o dia da coleta embrionária a ser executada. Squires et al. (1999), preconizam os dias 8 e 9 após a ovulação em éguas mais idosas. Sirois et al. (1987) relatam que cinquenta por cento de embriões coletados entre 10,5 e 13,5 dias pós-ovulação, não se desenvolveram em função do colapso nas mangueiras condutoras do lavado

sifonado, sendo por isso, descartados. Squires (1993), já ressaltava que os melhores índices de gestação, haviam sido obtidos com embriões de oito dias de idade, ao invés de estruturas embrionárias com nove dias de vida.

Segundo Ginther et al. (2004), nas éguas ocorre um modelo padrão de reprodução tipicamente sazonal, onde a incidência de ovulação é mínima durante o inverno, mas que aumenta gradativamente durante a primavera, atingindo a máxima durante o verão e reduzindo-se novamente no outono. Saltiel et al. (1982), pesquisando éguas de abatedouro no sul do México, verificaram que 10,0% delas demonstraram ovulações em janeiro e fevereiro, portanto fora da estação de monta (inverno no Hemisfério Norte).

Frente a isso, objetivou-se no presente trabalho avaliar algumas variáveis, que possam influenciar nos índices de recuperação embrionária, em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa foram analisados 699 dados de coletas de embrião equino, procedentes de um Centro Comercial de Transferência de Embriões. A análise dos dados correspondeu às temporadas reprodutivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007. As doadoras de embriões eram da raça Brasileiro de Hipismo, com idade entre 5 e 23 anos, perfazendo um total de 120 éguas sem ou com problemas de prenhez. Os animais eram mantidos em piquetes e em cocheiras e tinham acesso à água e ao sal mineralizado *ad libitum*, bem como à fonte de volumoso e concentrado. Na pesquisa dos dados analisou-se variáveis relacionando-se a recuperação embrionária com o tipo de conservação do sêmen (a fresco, resfriado ou congelado) com o qual era feita a IA, os meses do ano em que foram efetuadas as coletas, o dia da coleta após a ovulação (idade do embrião) e o

tipo de ovulação, isto é, se única ou múltipla. Os dados dos animais foram analisados utilizando-se o teste do Qui-Quadrado e análise de variância - ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as quatro estações reprodutivas pesquisadas nesse trabalho, foi empregado o sêmen de vários garanhões de fertilidade comprovada. Verificou-se que das 662 coletas de embrião empreendidas, em 164 havia sido utilizado o sêmen a fresco, em 167 o sêmen resfriado e em 331 coletas o sêmen congelado (Tabela 1). Denota-se, portanto, substancial empregabilidade de sêmen congelado nas IAS, contrariamente às afirmações de Squires et al.(1999), ao relatarem na época, restrita utilização do sêmen congelado empregado nesta biotecnologia. Ocorreu que, nestes últimos dez anos, houve pujante aplicabilidade prática do sêmen congelado, em função não só da melhoria das técnicas de congelação de sêmen eqüino, bem como no seu emprego, ao se ter à disposição sêmen de garanhões de elevada performance, mesmo os que se encontrem distantes, ou que tenham vindo a óbito, mas com o sêmen criopreservado. Esses fatos colaboraram para uma sensível maior demanda por parte dos criadores de cavalos de hipismo, além da preocupação de melhoria da qualidade genética dos animais. Muito embora a performance de congelação de sêmen eqüino, tenha sofrido significativos avanços nos últimos anos, ainda verificou-se nessa pesquisa, que as IAS processadas com sêmen congelado, geraram menor numero de embriões ($p < 0,05$) do que com o sêmen a fresco ou com o resfriado, alertando-se para a necessidade de conhecimentos mais aprofundados, para congelar a célula espermática, de modo a aproximar-se dos índices de prenhez ao se empregar o sêmen a fresco e o resfriado, corroborando relatos de Brinsko e Varner (1992) e Backman et al. (2004). Esses pesquisadores citam que a percentagem de prenhez ao se empregar o sêmen

congelado, é reduzida e bastante variável, em função da variação dos protocolos de congelação, ao efeito do garanhão, à diferença da fertilidade das éguas e aos diferentes protocolos de inseminação adotados.

TABELA 1 – Taxas de recuperação embrionária de éguas doadoras da Raça Brasileiro de Hipismo, empregando-se a inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado ou congelado, bem como as coletas de embrião, realizadas de 2003 a 2007, em diferentes meses do ano (n=662).

	Tipo de sêmen empregado nas Inseminações artificiais			Períodos do ano	
	Fresco	Resfriado	Congelado	Set-Fev	Mar-Ago
Coletas com embrião	102(62,1) ^a	104(62,2) ^a	171(51,6) ^b	306(58,5)	88(51,1)
Coletas sem embrião	62(37,8)	63 (37,7)	160 (48,3)	217(41,4)	84(48,8)
Total coletas	164	167	331	523	172

Letras diferentes na mesma linha indica significância.

Em função da disponibilidade de um numero elevado de dados de coletas de embrião, dentro e fora da estação reprodutiva, isto é, coletas levadas a efeito em meses não comuns a essa atividade, resolveu-se discutir esta variável. Foi estabelecida uma comparação de dados obtidos na temporada de monta equina (setembro, outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro), com os dos meses fora da estação reprodutiva que no Hemisfério Sul, compreende os meses de março, abril, maio, junho, julho e agosto. Foram utilizadas 695 colheitas de embrião para esta análise. Segundo a tabela 1, observa-se maior número de coletas realizadas entre os meses de setembro e fevereiro dos quatro períodos analisados, em função do esperado maior numero de TEs dentro da estação de monta, confirmando dados de Arruda (1990) e de Ginther et al. (2004), de que as éguas são classificadas como

poliétricas estacionais, por ciclarem dentro da estação reprodutiva, isto é, na primavera e no verão. Porém, não houve diferença ($p>0.05$) entre os índices de recuperação embrionária, ou seja na taxa de prenhez entre os dois períodos. Éguas que tiveram um ciclo estral fora da temporada de monta proporcionaram índice de recuperação embrionária, muito próximo ao das coletas executadas dentro da estação reprodutiva. Saliente-se que esses dados são muito importantes, pois não é usual executar-se a TE fora da estação de monta no Brasil, dados esses sugestivos de que é possível trabalhar com a TE, nos meses de outono e inverno, gerando substanciais lucros aos criadores de eqüinos de elevado desempenho. Isso vem corroborar relatos de profissionais que trabalham em Central de Reprodução Eqüina, a nível comercial, de que é possível, produzir embriões, mesmo fora da estação reprodutiva. Ao se tratar de reprodução, sabe-se que o hipotálamo eqüino é sensível à luz. No caso da presente pesquisa, os animais estavam em criações correspondentes à altura do paralelo 24, onde a quantidade de horas de luz natural/dia, é maior, sinalizando que a latitude poderia exercer função importante, sobre esse fato, uma vez que à medida em que a latitude é menor, haverá mais horas de luz por dia, favorecendo à ciclicidade sexual dos animais, principalmente ao se associar adequada nutrição a eles. Segundo Duarte (comunicação verbal, 2009) além desses fatos, é possível que, com luz artificial éguas venham a ciclar, podendo ser aproveitadas num programa de TE, mesmo fora da estação reprodutiva.

TABELA 2 – Índice de recuperação de embriões eqüinos em doadoras da raça Brasileiro de Hipismo, comparando-se os dias de ovulação (idade embrionária), bem como a incidência de ovulação única ou múltipla. (2008)

	Dias da ovulação da doadora					Tipo de ovulação			
	D6	D7	D8	D9	D10	Única		Múltipla	
						(n)	(%)	(n)	(%)
Coletas+(n)	2 ^a	14 ^b	189 ^b	181 ^b	6 ^a	193(47,7) ^a		142(67,9) ^b	
(%)	(18,1)	(56,0)	(64,5)	(52,6)	(35,3)				
Coletas-(n)	9	11	104	163	11	211 (52,2)		67 (32,0)	
(%)	(81,9)	44,0	35,5	47,4	64,7				
Total	11	25	293	344	17	404		209	

coletas

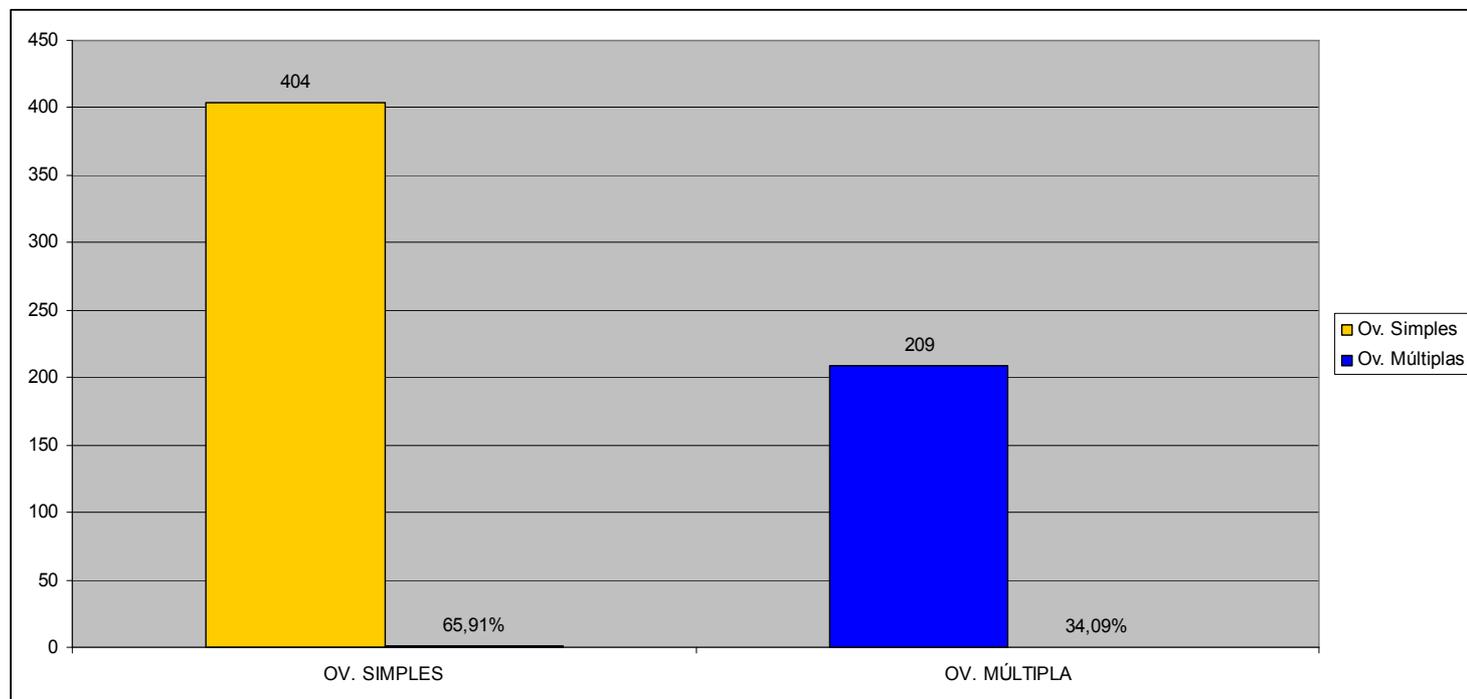
Letras diferentes na mesma linha e variável indica significância($p < 0,05$)

Dados relativos à idade embrionária em que as coletas eram executadas, indicaram o período de 6 a 10 dias após a ovulação das doadoras, com predominância das coletas efetuadas no 7º, 8º e 9º dias (Tabela 2). Em torno de 92,0 % dos embriões recuperados nas quatro temporadas de monta, encontravam-se com 8 ou 9 dias de idade. Essa sistemática de distribuição adotada pelos profissionais da Central de Reprodução de onde foram colhidos os dados, justifica-se pelo fato de que nessa idade o embrião é facilmente visualizado a olho nú, no fundo do filtro coletor embrionário imerso no líquido de lavagem, agilizando o procedimento da coleta, identificação e transferência, de acordo com Fleury e Alvarenga (1999). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as coletas feitas no 7º, 8º e 9º dia pós-ovulação. Porém, entre as coletas feitas no 6º e no 10º dia pós ovulação, houve diferença significativa em relação aos outros dias mencionados (Tabela 2), resultando em menores índices de recuperação embrionária, dados esses bastante similares aos relatados por Iuliano(1983,) Iuliano et al.(1985) e por Mckinnon et

al.(1987). Squires et al.(1999), relatam que coletas realizadas seis dias após a ovulação, geralmente proporcionam resultados ligeiramente inferiores aos embriões de sete ou mais dias, mas tornam-se necessárias, quando se deseja congelar os embriões, em função da sua maior viabilidade após a congelação e descongelação. Iuliano (1983) e Iuliano et al.(1985) igualmente obtiveram taxa de recuperação embrionária em equinos menor no 6º dia pós-ovulação (66,0%) do que no dia oito (82,0%). Fleury e Alvarenga (1999), trabalhando em um programa comercial de TE em eqüinos no Brasil, com grande número de coletas, reforçam os dados do presente trabalho, ao não verificarem diferenças significativas na recuperação embrionária nos dias sete, oito e nove pós-ovulação (49,3 58,0 e 54,5%), respectivamente.

Dos dados ainda disponíveis verificou-se o tipo de ovulação das doadoras, isto é, se a ovulação era única ou múltipla. O gráfico 1 revela o número de ciclos reprodutivos que apresentaram ovulações simples ou múltiplas. De um total de 613 ciclos reprodutivos com ovulação, em 209 (34,0%) houve dupla ou mais ovulações. Esse valor difere dos relatos de Sertich (1989) e dos de Carmo et al. (2002), os quais descreveram a incidência de múltiplas ovulações em éguas de raças européias de 55,9%, e 53,0 % respectivamente, percentuais esses bastante superiores aos da presente pesquisa, ainda mais ao se levar em consideração de que a raça Brasileiro de Hipismo carrega em sua genética significativo percentual de genética européia. Tal diferença poderia ser sustentada em função de que os dados do presente trabalho foram colhidos de um Centro Comercial de Reprodução Eqüina, receptor de animais reprodutivamente sadios e problemáticos e não simplesmente de um criatório de eqüinos onde sabidamente as éguas são geralmente férteis.

GRÁFICO 1 – Porcentagem de ciclos reprodutivos em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, detentoras de ovulação única ou múltipla. (n= 613).



A tabela 2 e o gráfico 1, evidenciam a existência de diferença ($p < 0,05$) entre animais que tiveram ovulação única ou múltipla, revelando que éguas com múltipla ovulação detêm taxa de recuperação embrionária superior às de ovulação única. Carmo et al. (2002) afirmam que o aumento do número de ovulações é altamente desejável e elevam o percentual de embriões recuperados por éguas doadoras de embriões na TE. Contudo, é muito pertinente a preocupação alusiva ao manejo reprodutivo, pois, gestações gemelares são absolutamente indesejáveis na espécie eqüina. Esses mesmos autores avaliaram 829 ciclos reprodutivos de éguas da raça Brasileiro de Hipismo, detectando 390, 360 e 79 ciclos com ovulação única, dupla e tripla, respectivamente, totalizando 617 embriões recuperados, sendo 230, 306 e 81 embriões provenientes de ovulações únicas, duplas e triplas respectivamente, perfazendo portanto 53,0 % de ovulações múltiplas.

Com base nos resultados obtidos neste estudo concluiu-se que: o número de inseminações artificiais com sêmen congelado visando a TE, demonstrou forte crescimento de empregabilidade alusivo às éguas de hipismo; os índices de recuperação embrionária (produção de embriões) em éguas inseminadas com sêmen congelado, ainda são menores ao se comparar com os do sêmen a fresco e refrigerado; é possível obter-se êxito na produção de embrião propriamente dita, fora da estação reprodutiva em éguas, desde que tenham ciclos ativos nos meses críticos do ano. Não foi verificada diferença significativa na recuperação embrionária entre os dias sete, oito e nove após a ovulação da doadora, porém, constatou-se diferença entre esses dias e o 6º. e o 10º. dia, havendo diferença ($p < 0,05$) na recuperação embrionária, entre ovulação única e múltipla, em prol das múltiplas.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, R. P. Manejo reprodutivo das fêmeas eqüinas. In: Semana de Zootecnia, 13. 1990, Pirassununga. In: REPRODUÇÃO E MELHORAMENTO ANIMAL, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1990.126 p.

BACKMAN, T; BRUEMMER , J,E; GRAHAN,J.K.; SQUIRES, E.L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 690-694, 2004.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1992. p.790-797.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 252 – 254, 2002.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em eqüinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...**, 2005.

DUARTE, M. P. (comunicação verbal, 2009).

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology** , v.51, p.261-262, 1999.

Ginther, O.J.; Gastal, E.L.; Gastal ,M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction** ,v.1, p.31-44,2004.

IULANO, M.F.; SQUIRES, E.L.; COOK, V.M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science** , v.60, p.258-263, 1985.

IULIANO,M.F. **The effect of age of the equine embryo and method of transfer on pregnancy rate**. 1983, 78p. Colorado State university , Thesis/Dissertation.

LOPES, E.P. Desmistificando a transferência de embriões. Top 2000 Mangalarga Marchador. v.1, n.1, p.6, 2002.

LOSINNO,L.; AGUILAR, J.J.; LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer program. **Equine Embryo Transfer**, v.3, p.81-83,2000.

McKINNON,A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract . Part II., **Compendium Continous Education Practice Veterinary**, v.9, p. 472-482, 1987.

MERKT, H.; KLUG, E.; JOCHLE, W. Reproduction management in the german thoroughbred breeding industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, p.231-239, 2000.

SALTIEL, A.; Calderon,A.; Garcia,N. ; Hurley,D.P. Ovarian activity in the mare between latitude 15 and 22 N. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 32, p. 261-267, 1982.

SERTICH, P.L. Transcervical embryo transfer in performance mares. **Journal of the American Association** , v.195, p.940-944, 1989.

SIROIS, J.; BALL, B. A.; FORTUNE, J. E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, (Supplement), 9, p. 43-48, 1987.

SQUIRES, E.L. Embryo transfer. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 357-367.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology** , v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.; MCCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; MCKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology** , v. 28, p. 609 – 613, 1987.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91–104, 1999.

CAPÍTULO 2

**FATORES REPRODUTIVOS QUE INTERFEREM NOS ÍNDICES DE PREENHEZ EM
UM PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS
DE HIPISMO**

*(Reproductive Factors that Interfere to Pregnancy Rates in an Embryo Transfer
Commercial Program In Jumping Mares)*

**CAMARGO C.E.¹, WEISS R.R.², KOZICKI L.E.², MOREIRA N.³,
PASTORELLO M.D.⁴, DUARTE M.C.G.⁴, TREML T.E.¹**

1 Aluno da pós graduação do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de
Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, Paraná;

3 Professor Doutor do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências
Agrárias, UFPR, Curitiba, Paraná

4 Professor Doutor do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências
Agrárias, UFPR, Palotina, Paraná

5 Médico(a) Veterinário(a) Autônomo especialista em Reprodução Eqüina

RESUMO

Neste estudo foram analisados dados de um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo. O objetivo foi avaliar alguns aspectos que possam interferir nos índices de prenhez neste tipo de programa. Estes dados foram compilados de quatro diferentes temporadas de monta em um mesmo centro de reprodução eqüina, onde um total de 396 embriões foram recuperados e analisados. As variáveis utilizadas para esse trabalho foram: tamanho do embrião, grau do embrião, estágio embrionário e sincronia entre doadoras e receptoras. Como resultado observou-se que maioria dos embriões coletados, 67,21%, ficou entre 400 e 1199 micras e que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para tamanho de embriões em relação à prenhez final da receptora. Quanto ao estágio embrionário constatou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os estágios Blastocisto e Blastocisto expandido comparados aos estágios de Mórula e Blastocisto inicial. A principal aplicação da Transferência de Embriões (TE), objetiva elevar o nível genético da progênie; mas os elevados custos desta biotecnologia limitam-se principalmente aos custos na manutenção das éguas receptoras de embriões, pelo fato da necessidade de espera de vários ciclos estrais para receberem o embrião. Essa biotecnologia aplicada aos eqüinos, desenvolveu-se rapidamente nas últimas duas décadas. Dentre os fatores que podem influenciar a taxa de prenhez em um programa de transferência de embriões, podemos citar: a sincronização entre doadora e receptoras, a qualidade dos embriões, as condições nutricionais e uterina das doadoras e das receptoras e o manejo geral das receptoras (Squires et al., 1999).

Palavras chave: égua, biotecnologia, transferência de embriões

ABSTRACT

This study analyzed data from a commercial program of embryo transfer in jumping mares. The objective was to evaluate some aspects that may interfere with pregnancy rates in this type of program. These data were compiled from four different seasons of mounts at the same center of horse breeding, where a total of 396 embryos were recovered and analyzed. The variables used for this study were: size of the embryo, the embryo level, embryonic stage and synchrony between donors and recipients. As a result it was observed that most embryos collected, 67.21%, was between 400 and 1199 μm , and there was no significant difference ($p > 0.05$) for the size of embryos on the of pregnancy. As to the embryonic stage it appeared that there was a significant difference ($p < 0.05$) between the blastocyst stage and expanded blastocyst stage compared to the initial morula and blastocysts. The main application of embryo transfer (ET), aims to raise the level of genetic progeny, but the high cost of biotechnology is limited mainly to costs in the maintenance of mares receiving of embryos, because of the need to wait for several estrous cycles for receive the embryo. This biotechnology applied to horses, has grown rapidly over the last two decades. Among the factors that may influence the rate of pregnancy in a program of embryo transfer, we can cite: the synchronization between donor and recipient, the quality of embryos, uterine and nutritional conditions of donors and recipients and the general management of the recipient (Squires et al., 1999).

Key words: mare, biotechnology, embryo transfer

INTRODUÇÃO

As maiores candidatas para o programa de TE incluem éguas idosas com histórico reprodutivo insatisfatório, ao não conseguirem produzir um potro seja por monta natural ou por inseminação artificial (IA), embora as taxas de perdas embrionárias em fêmeas idosas sejam mais elevadas e a fertilidade decresça com a idade da égua (MERKT et al., 2000; LOPES, 2002; SQUIRES et al., 2003;). Segundo SQUIRES et al.(2003) éguas que estão em competição, são também fortes candidatas a esta biotecnologia.

Dentre os fatores que podem influenciar a taxa de prenhez em programa de transferência de embriões, citam-se: a sincronização da doadora e da receptora, a qualidade dos embriões, o método de inovulação, as condições nutricionais e uterinas das doadoras e das receptoras e o manejo geral das receptoras (SQUIRES et al., 1999).

Trabalhos recentes têm mostrado que a sincronia entre doadoras e receptoras pode ser bem mais flexível do que se pensava, até porque pode-se realizar a colheita do embrião em dias diferentes. Segundo JACOB et al. (2002), receptoras ovuladas um dia antes até cinco dias após a doadora podem ser utilizadas sem afetar as taxas de prenhez. Na verdade, mais relevante que a sincronia entre doadora e receptora é o número de dias pós-ovulação que a receptora apresenta no momento da transferência, conforme salientado por CARNEVALE et al. (2000).

Após a colheita, é comum avaliar a morfologia e estágio de desenvolvimento do embrião. A qualidade do embrião eqüino antes da transferência afeta dramaticamente as taxas de prenhez (SQUIRES, 1993). CLARK et al. (1987)

reportaram 50% (13/26) de prenhez após transferência de embriões com grau de qualidade menor que 2 comparada a apenas uma prenhez de seis transferências de embriões de grau maior ou igual a 2 (grau 1 = excelente, grau 4 = ruim). De forma similar, as taxas de prenhez aos 50 dias após transferência cirúrgica foram maiores ($P < 0,05$) para embriões grau 1 ou 2 (69%, 214/310) do que para embriões classificados como grau = 3 (18%, 4/22; McKINNON et al., 1988).

Estudos conduzidos com embriões mais jovens mostraram que as taxas de prenhez foram menores após a transferência de pequenos embriões ou mórulas (100 a 299 micra). Esses resultados não necessariamente indicam que a viabilidade é menor quando os embriões pequenos ou mórulas são coletados inicialmente após a ovulação, por exemplo, no dia 6. Provavelmente, muito desses embriões encontravam-se atrasados em seu desenvolvimento na ocasião das coletas (CARNEVALE et al., 2000; SQUIRES et al., 2003). Tais observações foram anteriormente relatadas por VANDERWALL et al., 1999, o qual verificou em éguas com idade avançada, atraso no desenvolvimento embrionário e no transporte dos mesmos pelo oviduto.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados utilizados neste trabalho foram coletados de um programa comercial de transferência de embriões localizado no interior do estado de São Paulo que foram compilados e analisados para a elaboração do presente trabalho. A análise dos dados foi correspondente às quatro temporadas de monta: 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007.

Foi analisado um total de 396 embriões. Porém por falta de alguns dados, alguns fatores foram estudados com um menor número de embriões. Cada uma destes embriões possuía características diferentes. Os fatores relacionados à prenhez final da receptora foram: tamanho do embrião, estágio do embrião, grau do

embrião e sincronia entre doadoras e receptoras. O resultado final neste estudo foi sempre a prenhez final da receptora aos 60 dias de gestação.

As doadoras de embriões, na maior parte dos casos, foram mantidas em piquetes ou cocheiras com acesso à água e sal mineralizado ad libitum e à fonte de volumoso, bem como concentrado. Os animais utilizados eram em sua maioria da raça Brasileiro de Hipismo, com idade variando entre 5 e 23 anos. Por se tratar de um centro de reprodução eqüina, muitas destas doadoras possuíam idade avançada ou mesmo alguns problemas reprodutivos.

Cada égua possuía uma ficha individual onde os dados sobre ela eram registrados. Além desses dados, outros foram importantes para compor nossas análises, dentre eles: tipo de sêmen, mês do ano, dia pós-ovulação, presença ou ausência de embrião, qualidade e tamanho do embrião, sincronia entre doadora e receptora e prenhez final da receptora eram anotados separadamente. Estes dados foram passados para uma planilha Excel para o levantamento e análise dos dados.

As receptoras eram mantidas em piquetes com livre acesso a água e sal mineralizado e levadas ao cocho uma vez ao dia para fornecimento de ração concentrada nas instalações em que foi realizado o controle reprodutivo. Estas éguas tinham idade variando entre 3 e 10 anos, com bom histórico sanitário e reprodutivo, sendo controladas por ultra-som diariamente a partir do momento que entravam em cio.

As informações coletadas das fichas individuais desses animais foram compiladas e o programa Excel utilizado para a elaboração das planilhas, as quais foram submetidas às análises estatísticas para a avaliação dos índices reprodutivos e influência dos diferentes procedimentos.

Para as análises de variáveis com até dois fatores foi utilizado o teste do Qui-Quadrado e para as variáveis com mais de dois fatores foi realizado pela análise de variância ANOVA. Para estas análises foram utilizados os seguintes softwares: SPSS 8.0 for Windows e Microsoft Excel 2003

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação dos parâmetros de dimensões do embrião em relação a prenhez, foram utilizados 302 embriões. Onde a maioria deles foi coletado entre os dias 8 ou 9 pós ovulação. Estes embriões variaram de 150 a 3000 μm (micras). Observou-se que maioria dos embriões coletados, 67,21%, ficou entre 400 e 1199 micras.

TABELA 1 - ÍNDICE DE PRENHEZ FINAL DA RECEPTORA, COMPARANDO DIFERENTES TAMANHOS DE EMBRIÕES

	150-399 μm	400-699 μm	700-1199 μm	1200-3000 μm
PRENHEZ	16 (40%)	54 (62,06%)	69 (59,48%)	34 (57,62%)
NÃO GESTANTES	24 (60%)	33 (37,94%)	47 (40,52%)	25 (42,38%)
TOTAL	40 (100%)	87 (100%)	116 (100%)	59 (100%)

FONTE: O autor (2008)

Segundo a tabela 1 acima, constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para tamanho de embriões em relação à prenhez final da receptora. Este resultado também foi obtido por FLEURY et al. 2002. De acordo com os esses pesquisadores embriões grandes ($>1000 \mu\text{m}$) podem ser transportados e transferidos, resultando em boas taxas de prenhez. Os autores obtiveram 77,2 % de prenhez com embriões acima de 1000 μm , transportados à temperatura ambiente.

Em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário e as taxas de prenhez, foram estudados 381 embriões. Constatou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os estágios Blastocisto e Blastocisto expandido comparados aos estágios de Mórula e Blastocisto inicial. Estes dados são semelhantes aos encontrados por CARNEVALE et al. 2000 e SQUIRES et al., 2003. Estudos destes pesquisadores conduzidos com embriões mais jovens mostraram que as taxas de prenhez foram menores após a transferência de pequenos embriões ou mórulas.

Esses resultados não necessariamente indicam que a viabilidade é menor quando os embriões pequenos ou mórulas são coletados inicialmente após a ovulação, por exemplo, no dia 6. Provavelmente, muito desses embriões encontravam-se atrasados em seu desenvolvimento na ocasião das coletas.

Em outro estudo SQUIRES et al. 1999 constatou que embriões coletados 6 dias após a ovulação tem menores taxas de recuperação que aqueles coletados do dia 7 ao dia 9. Entretanto, IULANO et al. 1985, registraram taxas de recuperação de embriões de 65, 75 e 82 % para coletas no sexto, sétimo e oitavo dia após a ovulação, respectivamente, e FLEURY (1998) verificaram-se taxas de recuperação embrionária de 49,3; 58,0 e 54,5 % em coletas realizadas no sétimo, oitavo e nono dias pós-ovulação.

TABELA 2 - ÍNDICE DE PRENHEZ FINAL DA RECEPTORA, COMPARANDO DIFERENTES ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS.

	Mo**	Bi**	BI**	Bx**
PRENHEZ	1 (11,11%)	6 (42,85%)	42 (60,86%) *	174 (60,20%) *
NÃO GESTANTES	8 (88,88%)	8 (57,15%)	27 (39,14%)	115 (39,80%)
TOTAL	9 (100%)	14 (100%)	69 (100%)	289 (100%)

FONTE: O autor (2008)

* $p < 0,05$ (houve diferença significativa em relação à Mo e Bi).

** Mo = morula, Bi = Blastocisto inicial, BI = blastocisto e Bx = blastocisto expandido

Para avaliação da qualidade embrionária em relação a prenhez foram analisados 374 embriões. Todos foram classificados morfologicamente pós-colheita. Embriões classificados como grau 1 são considerados excelentes ou bons, grau 2 como regulares e graus 3 e 4 como pobres e degenerados. (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1999).

A tabela 3 abaixo mostra o índice de prenhez da receptora em relação ao grau avaliado quanto a sua qualidade morfológica. Observou-se que 80,74 % dos embriões recuperados nas colheitas são classificados como grau 1.

TABELA 3 - ÍNDICE DE PRENHEZ FINAL DA RECEPTORA, COMPARANDO DIFERENTES GRAUS EMBRIONÁRIOS.

	1	2	3/4
PRENHEZ	181 (59,93%) *	25 (42,37%)	7 (53,84%)
NÃO GESTANTES	121 (40,07%)	34 (57,63%)	6 (46,16%)
TOTAL	302 (100%)	59 (100%)	13 (100%)

FONTE: O autor (2008)

*p<0,05 (houve diferença significativa)

Constatou-se que houve diferença significativa ($p < 0,01$) para embriões grau 1 quando comparados aos demais graus. Estes dados são similares aos obtidos por CARNEVALLE et al, 2000, que encontraram 60,1% de prenhez positiva para embriões grau 1 contra 48,4% para embriões grau 2.

Para a avaliação do fator sincronia, foram compilados dados de 348 embriões que foram transferidos para receptoras previamente selecionadas e sincronizadas. A tabela abaixo compara o intervalo de dias entre as ovulações das doadoras com as receptoras. 0 indica que tanto doadora quanto receptora ovularam no mesmo dia. O número 1 indica que a receptora ovulou um dia após a doadora e

assim conseqüentemente para os dias 2,3,4,5 e 6. O número -1 indica que a receptora ovulou um dia antes da doadora.

TABELA 4 - ÍNDICE DE PREENHEZ FINAL DA RECEPTORA, COMPARANDO A SINCRONIA ENTRE DOADORAS E RECEPTORAS

	-1	0	1	2	3	4	5	6
PRENHEZ	1 (14,28%)	19 (73,07%)*	36 (60,0%)*	50 (60,24%)*	52 (57,14%)*	36 (59,01%)*	5 (33,33%)	4 (80%)
NÃO GESTANTES	6 (85,72%)	7 (26,93%)	24 (40%)	33 (39,76%)	39 (42,86%)	25 (40,99%)	10 (66,67%)	1 (20%)
TOTAL	7 (100%)	26 (100%)	60 (100%)	83 (100%)	91 (100%)	61 (100%)	15 (100%)	5 (100%)

FONTE: O autor (2008)

$p < 0,05$ (houve diferença significativa em relação aos demais dias)

Podemos observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os intervalos de dias: 0, 1, 2, 3 e 4 em comparação com os intervalos -1, 5 e 6. Esses dados mostram que na prática comercial estes intervalos 0,1,2,3 e 4 representam 92,24% da seleção de receptoras, ou seja a maioria das receptoras escolhidas para receberem embriões encontram-se ovuladas no mesmo dia da receptora ou até 4 dias depois.

Estes dados diferem um pouco de Peres et al., 2002. Esses pesquisadores têm demonstrado que o sincronismo entre as éguas doadoras e receptoras de embriões é fundamental para o sucesso da transferência de embriões, constatando-se que os melhores índices de gestações para as éguas receptoras são os sincronismos entre -3 e +1 em relação às éguas doadoras. Onde -3 indicam receptoras que ovularam 3 dias após a doadora e +1, ovularam 1 dia antes.

Segundo JACOB et al., 2002 trabalhos mais recentes têm mostrado que a sincronia entre doadoras e receptoras pode ser bem mais flexível do que se pensava, até porque se pode realizar a colheita do embrião em dias diferentes,

receptoras ovuladas um dia antes até cinco dias após a doadora podem ser utilizadas sem afetar as taxas de prenhez.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados de índices de prenhez obtidos neste estudo conclui-se que: não houve diferença significativa ($p>0,05$) para tamanho de embriões em relação à prenhez final da receptora.

Constatou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os estágios Blastocisto e Blastocisto expandido. Observou-se diferença significativa ($p<0,05$) entre os estágios Blastocisto e Blastocisto expandido quando comparados aos estágios de Mórula e Blastocisto inicial. Houve diferença significativa ($p<0,01$) para embriões grau 1 quando comparados aos demais graus.

Observou-se que houve diferença significativa ($p<0,05$) para os intervalos de dias: 0, 1, 2, 3 e 4 em comparação com os intervalos -1, 5 e 6. Não existem diferenças significativas entre os grupos de animais com presença de prenhez e os animais com ausência de prenhez, em termos das variáveis independentes: tamanho do embrião, grau do embrião, estagio embrionário e sincronia entre doadoras e receptoras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados analisados do programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo conclui-se que:

A comparação entre as colheitas de embrião com diferentes estados de conservação de sêmen mostrou que houve diferença significativa entre os dois primeiros tipos, sêmen fresco e sêmen resfriado, comparado ao sêmen congelado ($p < 0,05$) a um nível de confiança de 95%;

Não houve diferença significativa nos índices entre colheitas de embrião durante a estação reprodutiva e fora dela;

As variáveis independentes que mais contribuem para a diferença entre os grupos com presença ou ausência de embrião é número de ovulações e estado de conservação do sêmen;

Os embriões podem ser coletados com idade variando entre sete e nove dias, visando melhor ajuste para o momento adequado da receptora, sem prejuízo para os resultados;

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para tamanho de embriões em relação à prenhez final da receptora;

Constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os estágios Blastocisto e Blastocisto expandido em relação ao número de receptoras prenhas;

O momento ótimo para que a receptora receba o embrião transferido varia entre os dias 4 e 8 pós-ovulação;

Não existem diferenças significativas entre os grupos de animais com presença de prenhez e os animais com ausência de prenhez, em termos das variáveis independentes: tamanho do embrião, grau do embrião, estágio embrionário e sincronia entre doadoras e receptoras;

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, S. L.; IRVINE, C. H. G. GnRH secretion in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 173-180, 1996.

ALLEN, W. R.; TIPLADY, C. A.; BUTLER, S.; MACKLEY, M. R. Rheological characterization of estrous uterine fluid in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 503 - 506, 2002.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science** , v.7, p.145-173, 1987.

ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: **Fisiologia e manejo da reprodução eqüina**. 2 ed, Recife, 1986, p. 57 – 63.

ARRUDA, R. P. Manejo reprodutivo das fêmeas eqüinas. In: Semana de Zootecnia, 13. 1990, Pirassununga. In: REPRODUÇÃO E MELHORAMENTO ANIMAL, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1990.126 p.

AX, R.L., et al. Artificial insemination. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 376-389.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. Reproductive physiology of the nonpregnant mare. In: **Manual of equine reproduction**. St Louis: Mosby, 1998a. p. 9-14.

BLANCHARD, T. L.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L. Effects of deslorelin or hCG administration on reproductive performance in first postpartum estrus mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 165-169, 2002.

BONAFOS, L. D.; CARNEVALE, E. M.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. **Theriogenology**, v. 42, p. 1247- 1255, 1994.

BRADECAMP, E.A. Estrous Synchronization In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. St. Louis: Saunders, 2007. p.22-25

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D. Artificial insemination. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1992. p.790-797.

CARMO, M.T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em eqüinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...**, 2005.
CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; McKINNON, A. O.; HARRISON, L. A. Effect of human chorionic gonadotropin on time to ovulation and luteal function in transitional mares. **Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 27-29, 1988.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology** , v.37, p.1101-1115, 1992.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, E.L.; SQUIRES, E.L. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology** , v.54, p.965-979, 2000.

CARVALHO, G.R. **Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões em eqüinos**. Universidade Federal de Viçosa, 2000. Viçosa - MG. 103 p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia).

CONN, P.M.; CROWLEY, W.F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. **New Engl. J. of Med.**, 1991; 324. p.93-103.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The Normal Estrous Cycle. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 14, p. 121-132.

DAELS, P.F. New technics of artificial insemination in the mare. In: 20de Studiedag van de / 21ème Journée d'étude de la Belgian **Equine Practitioners Society – BEPS**. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 15 mai 2008.

DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.;VAN TOL, H.T.M.; WILLEENSE, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period . **Anim. Reprod. Sci.** , Amsterdam, v. 10, p. 275 – 292, 1986.

DIMMICK M.A, GIMENEZ T, SCHILAGER R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian v.s., Quarter Horse mares. **Anim. Reprod. Sci.** , Amsterdam, v. 31, p. 123 – 129, 1993.

DOUGLAS, R.H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology** , v.11, n.1, p.33-46, 1979.

DOUGLAS, R.H. Equine embryo transfer. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 71-73.

DOWSETT, K.F.; WOODWARD, R.A.; BODERO, D.A.V. A study of nonsurgical embryo transfer in the mare. **Theriogenology** , v.31, p.631-642, 1989.

FARINASSO, A.; DE FARIA, A.; MARIANTE, S.; DE BEM, A.R. Embryo technology applied to the conservation of equids. **Equine Vet. J.** . London, suppl. 8, p. 84 - 86, 1989.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; FIGUEIREDO, J.B.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** . Porto Alegre, v. 39, n.3, p. 485-487, 1987.

FLEURY, J.J.; COSTA NETO, J.B.F.; ALVARENGA, M.A. Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares in Brazil. **Equine Veterinary Journal Suppl.** , v.8, p.73-74, 1989.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology** , v.51, p.261, 1999.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

FLEURY, J.J.; FLEURY, P.D.C.; LANDIN-ALVARENGA, F.C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18 °C – preliminary results. **Theriogenology** , v.58, p.749-750, 2002.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects.** 1. ed. Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 1979. p. 413.

GINTHER, O.J.,PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology** 21, 505-516, 1984.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects.** 2. ed, Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, 1992. 640 p.

GINTHER, O. J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, p. 18-25, 1993.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles.J. **Reprod. Fertil.** , London, v. 99, p. 105 – 111, 1993.

GINTHER, O. J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 311-320, 1990.

GREAVES, H. E.; KALARIOTES, V.; CLEAVER, B. D.; PORTER, M. B.; SHARP, D. C. Effects of ovarian input on GnRH and LH secretion immediately postovulation in pony mares. **Theriogenology**, v. 55, p. 1095-1106, 2001.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; DOMINGUES, I.B. Utilisation of mares after first post partum ovulation as embryo recipients. In: 6 th International Symposium on Equine Embryo Transfer, 2004, Rio de Janeiro, Brasil. **Proceedings...**Rio de Janeiro: 2004.

GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas á Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002, p. 340.

HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T. et al. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology** 24, 465-477, 1985.

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v. 25, p. 581-590, 1986.

HUGHES, J. P.; COUTO, M. A.; STABENFELD, G. H. Luteal Phase Ovulation : What are the options? **Theriogenology**, v. 26, p. 123-125, 1986.

IULANO, M.F.; SQUIRES, E.L.; COOK, V.M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science** , v.60, n.1, p.258-263, 1985.

JACOB, J.C.F.; DOMINGUES, I.B.; GASTAL, E.L. et al. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology** , v.57, n.1, p. 545, 2002.

LOPES, E.P. Desmistificando a transferência de embriões. **Top 2000 Mangalarga Marchador**. v.1, n.1, p.6, 2002.

MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; KEITH, S.L. et al. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology** 51, 267, 1999.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. et al. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology** 29, 1055-1063, 1988.

MALINOWSKY, K. Recent advances in reproduction in horses. In <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs717> , 2002. Disponível em: Acesso em: 05 fev. 2008.

MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for superovulation . **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet** ., Princeton Junction, v. 16, p. 127 – 141, 1 994.

MEIRA, C.; BURATINI, J. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 26, n. 1, p. 125-133, 1998.

MEIRA, C.; HENRY, M. Evolution of two non-surgical equine embryo transfer methods. **J. Reprod. Fertil** . Colchester, supl. 44, p. 712 – 713, 1991.

MERKT, H.; KLUG, E.; JOCHLE, W. Reproduction management in the german thoroughbred breeding industry. **Journal of Equine Veterinary Science** , v.20, n. 12, 2000.

MORRIS, L.H.A., HUNTER, R.H.F., ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small number of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **J. Reprod. fertil**. Cambridge, Inglaterra, v.118, p. 95-100, 2000.

MILLER, K. F.; BERG, S. L.; SHARP, D. C.; GINTHER, O. J. Concentrations of circulating gonadotropins during various reproductive states in mares. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 744-750, 1980.

MUMFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; JÖCHLE, E.; HARRISON, L.A.; NETT, T.M.; TIGG, T.E. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, 1995; 39. p.129-140.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-262, 2000.

OGURI, N., TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horse. **J Reprod. Fertil** . London, v. 31, p. 187, 1972.

OGURI, N., TSUTSUMI, Y. Nonsurgical egg transfer in mares. **J. Reprod. Fertil**. London, v.41, p. 313, 1974

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical transfer of equine embryos. **Arch. Androl.** , v.5, p.108, 1980.

PAPA, F.O., DELL' AQUA JÚNIOR, J.A. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, São Paulo. v.25, p. 458-46, 2001.

PASTORELLO, M.; MEIRA, C.; FLEURY, J.J.; DUARTE, M.C.G. Transferência não cirúrgica de embriões em éguas de hipismo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS** . Porto Alegre, v. 24, p. 212, 1996.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic ecography in equine gynecology, **Theriogenology** ., Los Altos, v. 21, p. 471 – 483, 1980.

PALMER, E. Induction of ovulation. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 344-347.

PELEHACH, L. M.; GREAVES, H. E.; PORTER, M. B.; DESVOUSGES, A.; SHARP, D. C. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 441-444, 2002.

PERES, K.R.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M. et al . Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology** , v.57, n.1, p.558, 2002.

PESSÔA, M.A.; ROCHA FILHO, A. N.; CARMO, M. T. Comparison between short and long acting progesterone for treatment of non-cycling embryo recipient mares. In: International Symposium on Equine Embryo Transfer, 6, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: R & W Communications, p. 85-87.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v. 24, p. 359-369, 1985.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and Ovulation. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 17, p. 161-171.

RIGBY S.L., LINDSEY A.C., BRINSKO S.P., et al. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or rectally guided utero-tubal insemination with low numbers. **Anim Reprod Sci**. Champaign, US. v.68, p. 331-333, 2001.

SAMPER, J. C. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. **Proceedings** of American Association Equine Practice. v. 43, p. 189-191, 1997.

SHIRAZI, A.; GHARAGOZLOO, F.; GHASEMZADEH-NAVA, H. Ultrasonic characteristics of preovulatory follicle and ovulation in Caspian mares. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 261-266, 2004.

SILVA, L.A. **Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões em eqüinos.** MS. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, 123pp, 2003.

SIROIS, J.; BALL, B. A.; FORTUNE, J. E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, p. 43-48, 1989. supplement. 8.

SQUIRES, E.L.; MCCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; MCKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, Los Altos, v. 28, p. 609 – 613, 1987

SQUIRES, E.L.; MCKINNON A.O.; SHIDELER, R.K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, v.29, p.55-70, 1988.

SQUIRES, E.L. Human Chorionic Gonadotropin. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 357-367.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. **Collection and transfer of equine embryos.** Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, n. 8, 1995, 64 p.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 91 – 104, 1999.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M.. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

STABENFELDT, G.H.; HUGHES J.P.; EVANS J.W. Ovarian activity during the estrous cycles of the mare. **Endocrinology**, Baltimore, v. 90, p. 1379 – 1383, 1972.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.** 3. ed. Savoy: Illinois, 1999. 180p.

VANDERWALL, D.K.; BETSCHART, R.W.; SQUIRES, E.L. Effect of PGF₂ and 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. **Theriogenology** 53, 1263-1271, 1999.

VOSS, J.L. Embryo Transfer. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 325-328.

WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; NIKOLAKOPOULOS, E. Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. **Theriogenology**, v. 59, p. 1181-1187, 2003.

WEBB, R., CAMPBELL, B.K., GARVERICK, H.A., GONG, J.G., GUTIERREZ, C.G., ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl.54, 33-48, 1999.

WEISS, R., VIANNA, B., & MURADÁS, P. Inseminação artificial em éguas com sêmen "in natura" e diluído. **Archives of Veterinary Science** [Online] 2005 Mar 3 8:1. Disponível: <http://calvados.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/4009>

