

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS E A IMPORTÂNCIA DA ÉGUA
RECEPTORA**

ROBERTA MAYER EVANGELISTA

PORTO ALEGRE

2012/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS E A IMPORTÂNCIA DA ÉGUA
RECEPTORA**

ROBERTA MAYER EVANGELISTA

Monografia apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção da Graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

PORTO ALEGRE

2012/1

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eugênio e Tânia, por terem me apoiado durante todos esses anos, sem nunca duvidarem de mim. O amor que vocês dão a mim e à Fê é inestimável. É um orgulho e uma benção ser filha de vocês! Obrigada de coração pelas correções e pela ajuda e preocupação com o trabalho! À minha irmã e melhor amiga, Fernanda, por sempre torcer por mim e se preocupar comigo nas atividades equinas. É uma alegria ser tua irmã! À minha “Dinda” Carla, que mesmo não podendo estar sempre com a gente se faz presente com todo o carinho, apoio e amor que nos dá! À minha avó Neli, por acender inúmeras velas ao longo das inúmeras provas dos semestres e sempre me dar apoio e sorte! Muito obrigado por cuidar tão bem da Pretinha e da Pitty, meus amores caninos. Ao bibliotecário e amigo Fernando Pires pela ajuda com a normatização deste trabalho.

À amiga que me fez encontrar esse caminho, Fabíola Albrecht de David, obrigada por todos os ensinamentos, por toda a paciência e por todo o apoio dado ao longo desses sete anos de convivência! E o mais importante, obrigada por fazer com que eu me apaixonasse por cavalos! Eles, com certeza, me deram uma razão na vida e me fazem uma pessoa melhor e muito feliz.

Ao meu orientador e mestre, Rodrigo Costa Mattos, que além de me orientar nesta monografia, me orienta desde o primeiro semestre, no Reprolab. Sei que o que aprendi e os laços que criei durante esses seis anos de estágio levarei para toda a vida. À professora Petra Garbade, que além de todos os ensinamentos de clínica e reprodução equina, me mostrou o que é a fascinação por cavalos.

Um agradecimento especial ao professor e coorientador, Eduardo Malschitzky, pela paciência e ajuda na realização deste trabalho, desde o início. É um privilégio ter sido orientada por uma pessoa com tanto conhecimento nesta área.

Aos amigos do Reprolab, Gabi Richter, pois além da amizade, foi a melhor chefe de estágio que já tive. À Mica, por ser a amiga maravilhosa que é e por ter sido minha companheira de estágio desde o começo, sempre me ajudando e se importando comigo. Às amigas Ana e Gabi, que foram um presente que o laboratório me deu e que, apesar da pouca idade, me ensinaram muito. Ao Giovani, Gabriel (Verde), Guga, Daniel (Stalone), Marcelo, Maciel, Gabriel (Carioca), Henrique e Nicolas que além de toda a ajuda e amizade, sempre alegraram o ambiente de trabalho.

Aos pós-graduandos, Andreza e Ivan Bustamante, por todo o incentivo e ajuda dados durante esses anos. E especialmente ao doutorando Gustavo Winter por sempre instigar o conhecimento e por ter me aberto o caminho para conhecer o trabalho do Prof. Luis Losinno, durante a realização de intercâmbio para a Argentina.

A todos os amigos, especialmente as gurias Bru, Ale, Tássia, Gi e Beta, e aos professores da FAVET, na qual eu tenho muito orgulho de ter estudado.

E, finalmente, ao veterinário Víctor Garcia Aguiñaga pela oportunidade de realização do estágio no Centro “La Grappa” e pelo fornecimento dos dados. A experiência vivenciada foi extremamente enriquecedora para a minha vida profissional.

“Há algo no exterior do cavalo que faz bem ao interior do
homem”.
Winston Churchill

"Um cavalo galopa com seus pulmões, persevera com seu coração
e vence com o seu caráter."
Federico Tesio

RESUMO

A Transferência de Embriões (TE) é muito comum no meio equino, sendo realizada comercialmente desde a década de 80. O Brasil e a Argentina são os países que mais produzem embriões equinos no mundo. As principais raças de cavalos envolvidas na técnica brasileira são Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. Na Argentina, a raça Polo Argentino representa mais de 80% da produção de embriões do país. A técnica tem como principal objetivo a obtenção de um maior número de potros por égua doadora, o que exige certo número de éguas receptoras para levarem a gestação a termo. A receptora, após anos considerada de menor importância, é hoje destaque nos programas de TE. Sua escolha é realizada com base em critérios pré-estabelecidos de seleção, como idade, tamanho e condição reprodutiva. Além de uma boa seleção, o manejo pré e pós TE são de suma importância para o alcance de boas taxas de prenhez. Os fatores que mais interferem nesta taxa são o método de transferência, as características dos embriões, a sincronização de ambiente uterino entre doadora e receptora e a eficiência do veterinário que realiza a técnica. Durante estágio realizado em um centro embrionário na Argentina, observou-se a importância da correta manipulação embrionária após os lavados e a vantagem de possuir um grande número de receptoras, podendo realmente escolher o melhor ambiente uterino para o embrião. O presente trabalho tem como objetivo a revisão bibliográfica da TE, com ênfase na importância da receptora, além de descrever a experiência vivenciada pela autora no centro de embriões de cavalos de Polo Argentino.

Palavras-chave: Transferência de Embriões. Éguas Receptoras. Seleção. Manejo. Centro Embrionário.

ABSTRACT

The embryo transfer (ET) is very common in the horse environment, being performed commercially since the 1980s. Brazil and Argentina are the countries that produce more embryos in the equine world. The main breeds of horses involved in the Brazilian technique are Mangalarga Marchador and Quarter Horses. In Argentina, the Argentine Polo breed represents over 80% of the production of embryos in the country. The technique has as its main objective to obtain a greater number of foals per donor mare, which requires a certain number of recipient mares to carry the pregnancy to term. The recipient, after years of being considered of minor importance, is now prominent in ET programs. Its election is made based on pre-established criteria for selection, such as age, size and reproductive condition. Besides a good selection, previous and post management of ET is of paramount importance to achieve good pregnancy rates. The most important factors affecting this rate are the transfer method, the characteristics of the embryos, the uterine environment synchronization between donor and recipient and the efficiency of the veterinarian who performs the technique. During an internship in an embryo center in Argentina, the importance of proper handling of the embryo after the flushing and the advantage of having a large number of recipients, where you can actually choose the best uterine environment for the embryo, were observed. This paper aims to review the TE literature, with emphasis on the importance of the recipient, besides describing the author's experience in a center of embryos of Argentina Polo horses.

Keywords: Embryo Transfer. Recipient mares. Selection. Management. Embryonic Center.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	HISTÓRICO	9
3	SITUAÇÃO ATUAL	10
4	IMPORTÂNCIA.....	12
5	INFLUÊNCIA DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA NA ÉGUA NA TE.....	13
6	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS.....	15
6.1	Seleção e manejo das éguas doadoras e receptoras de embrião	15
6.1.1	Égua doadora	16
6.1.2	A Importância da égua receptora	17
6.1.3	Sincronização entre doadora e receptora	21
6.1.4	Superovulação.....	25
6.2	A Coleta de embrião	28
6.2.1	Dia da coleta	28
6.2.2	Fatores que afetam a taxa de recuperação	32
6.3	Técnicas de Transferência de Embrião (TE)	34
6.3.1	Escolha da melhor receptora para a transferência	35
6.3.2	Manejo das receptoras após a transferência.....	36
6.3.3	Fatores que afetam as taxas de prenhez após a transferência	37
7	EXPERIÊNCIA VIVENCIADA	39
8	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora, geneticamente superior, e a transferência deste para uma fêmea receptora, encarregada de levar a gestação a termo. Esta biotécnica é amplamente utilizada na indústria equina, com cerca de 40 anos de estudos e aperfeiçoamentos, após a primeira descrição de uma TE em éguas, em 1972. Desde a década de 1980 ela é realizada comercialmente (MCKINNON; SQUIRES, 2007). O Brasil iniciou seu uso em 1986, sendo hoje o maior produtor de embriões equinos do mundo, com cerca de 40 centros de TE em equinos, em sua maioria concentrados nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ALVARENGA, 2010).

No país, as raças que mais utilizam a técnica são: Mangalarga Marchador, Campolina, Quarto de Milha e Mangalarga Paulista. O uso do sêmen refrigerado e transportado é uma necessidade, devido à tendência dos garanhões pertencerem a diversos proprietários (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Com a recente liberação do uso da inseminação artificial (IA) e da TE pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC), espera-se um aumento significativo no número de embriões transferidos nos próximos anos, devido ao grande número de cavalos crioulos que o Brasil possui.

Além do Brasil, a Argentina e os Estados Unidos são os países que mais utilizam a TE em equinos no mundo. Segundo a última publicação do Comitê Estatístico da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), em 2010 o Brasil foi responsável por 43% das TE em equinos no mundo, a Argentina, por 29% e os EUA, por 18%.

Na Argentina, o maior interesse pela TE está relacionado aos cavalos de Polo. A Associação Argentina de Criadores de Cavalos de Polo (AACCP) não possui restrições em relação ao número de potros que podem ser registrados por égua a cada temporada (RIERA, 2009). Neste país encontram-se as melhores matrizes e os melhores reprodutores desta raça. É interessante o fato de que as éguas são melhores jogadoras que os machos e costumam competir até idade avançada, justificando o grande uso da técnica. Existem mais de 24 centros de TE espalhados pelo país, sendo 80% destes de cavalos de Polo, onde 90% dos programas são desenvolvidos com o uso do sêmen fresco, estando os garanhões alojados nas centrais (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Apesar do cenário positivo em que a TE se encontra, sua aplicação comercial em equinos está muito atrasada em relação ao seu uso em bovinos, ovinos e suínos (RIERA, 2009). Um dos principais fatores para a baixa eficiência dos programas consiste na dificuldade de induzir a superovulação em éguas, o que é facilmente atingido nas outras espécies citadas. Além disso, outro grande problema é a alta porcentagem de fêmeas mais velhas usadas repetidamente como doadoras, o que, além de diminuir a taxa de recuperação embrionária, é considerado um fator de melhoramento genético lento na espécie equina (ALVARENGA, 2010).

Há diversos fatores que influenciam a TE em equinos em geral, como a qualidade da doadora, a qualidade do sêmen do garanhão, o dia da coleta, o método escolhido para transferência, mas um dos fatores mais importantes, considerado o ponto chave da técnica, é, com certeza, a escolha da receptora. Uma boa seleção, respeitando limites de idade, tamanho do animal, sanidade, status reprodutivo e manejo adequados são indispensáveis para que o sucesso da técnica seja alcançado, maximizando a taxa de prenhez e reduzindo a perda embrionária (ALONSO, 2008).

Independente dos fatores que influenciam a técnica, a TE é uma ferramenta capaz de incrementar a eficiência reprodutiva e o melhoramento genético em equinos (SILVA, 2003). Dentre as inúmeras vantagens, obter potros de éguas geneticamente superiores, de éguas em competição, de potrancas e de éguas consideradas subférteis, são citadas como as mais significativas.

O objetivo geral deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica dos principais aspectos que envolvem a TE em equinos, com enfoque na importância da escolha e manejo da égua receptora, e descrever a experiência vivenciada durante um mês no Centro de Transferência Embrionária “La Grappa”, de ELLERSTINA S.A., de cavalos de Polo, situado em Casbas, na Argentina.

2 HISTÓRICO

A primeira transferência de embriões descrita em mamíferos foi realizada em 1890, por método cirúrgico, pelo cientista Walter Heape, na Inglaterra. Este retirou embriões de uma coelha Angorá, utilizando apenas uma lente de aumento para identificá-los no oviduto, e os implantou em uma lebre Belgian Hare recém-coberta, que deu a luz a 2 coelhos Angorá e 4 lebres Belgian. Provou com isso, que era possível retirar embriões não implantados e transferí-los a um ambiente gestacional, sem afetar seu desenvolvimento (BIGGERS, 1991).

A técnica em equinos foi descrita pela primeira vez em 1972, em um estudo com 45% de taxa de recuperação de embriões, pelo método não cirúrgico. Estes foram transferidos, também pelo método não cirúrgico, porém sem sucesso de prenhez (OGURI; TSUTSUMI, 1972). Dois anos depois, os mesmo autores publicaram um estudo no qual recuperaram 18 embriões de 20 éguas doadoras (90% de taxa de recuperação), transferindo 15 destes e obtendo 6 éguas receptoras prenhes (40% de taxa de concepção). Destas, 2 abortaram e 4 pariram um potro saudável cada uma, atingindo o sucesso na TE em equinos pelo método não cirúrgico (OGURI; TSUTSUMI, 1974).

Em 1974, foi criada a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) em Denver, Colorado, EUA. No Brasil, em 1985, foi criada a Sociedade Brasileira de Tecnologia em Embriões, que promove anualmente uma reunião científica onde são apresentados os principais avanços na área de embriologia.

A TE em equinos no Brasil foi estimulada pelo Veterinário João Junqueira Fleury, que iniciou seu uso comercial em 1987 (CAMARGO, 2008), sendo responsável por inúmeros estudos e experimentos envolvendo a técnica, contribuindo imensamente para o nível em que a TE se encontra hoje no país.

No Rio Grande do Sul, a primeira prenhez por TE em equinos foi realizada em meados da década de 90, pela equipe do Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) da Faculdade de Veterinária da UFRGS¹.

¹ Comunicação pessoal do Professor Doutor Rodrigo Costa Mattos, Reprolab, 17 de maio de 2012.

3 SITUAÇÃO ATUAL

Segundo o último relatório do Comitê Estatístico da IETS, publicado em dezembro de 2011, a atividade global da TE em equinos aumentou em 2010, com 41.652 lavagens de embriões reportadas, o que representa um aumento de 12,7% em relação ao ano de 2009. Como demonstrado na Tabela 1, o número total de transferências realizadas foi de 28.824 (4.354 a mais do que no ano anterior). Baseando-se nos dados de embriões transferidos, os três primeiros países no ranking mundial são Brasil, Argentina e EUA. O Brasil e a Argentina são responsáveis por mais de 70% desta atividade (43% e 29% dos embriões transferidos no mundo, respectivamente) e os EUA, por 18%. Dentre os outros países, o que mais vem se destacando é a Austrália, com um incrível aumento de 910 embriões transferidos em 2009, para 3300, em 2010, respondendo por 8,5% da TE em equinos no mundo. Além disso, chama a atenção que metade destes embriões transferidos eram congelados (STROUD, 2011).

Tabela 1 — Atividade TE Equina em 2010

Países	Lavados	Embriões Frescos	Embriões Congelados	Total Embriões Transferidos	Porcentagem
Argentina	12655	8226	0	8226	28,54%
Brasil	15200	12400	22	12422	43,10%
Uruguai	10	5	0	5	0,02%
Canadá	42	32	0	32	0,11%
Europa	385	123	0	123	0,43%
África do Sul	127	95	0	95	0,33%
Austrália	3300	1230	1230	2460	8,53%
EUA	9933	4966	495	5461	18,95%
Total	41652	27077	1747	28824	100%

Fonte: Adaptada de STROUD (2011).

No Brasil, a raça com mais potros nascidos por TE registrados por ano é a Mangalarga Marchador, seguido da raça Quarto de Milha. Esta última teve um grande

crescimento na produção de embriões ao longo dos últimos anos. No país, existem cerca de 40 Centros de TE em equinos, em sua maioria concentrados nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Estes possuem as maiores populações de cavalos Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, respectivamente. Geralmente, as TE em cavalos Quarto de Milha e Brasileiro de Hipismo são realizadas nos grandes centros, enquanto em outras raças, como Mangalarga e Campolina, são, em sua maioria, realizadas dentro dos próprios criatórios, com instalações montadas para tal (ALVARENGA, 2010).

Além das associações brasileiras da raça Mangalarga Marchador (ABCCMM), raça Mangalarga (ABCCRM), da raça Quarto de Milha (ABQM) e raça Campolina (ABCCCampolina), outras também permitem a técnica, como é o caso das associações brasileiras dos criadores de cavalos da raça Brasileiro de Hipismo (ABCCBH), da raça Árabe (ABCCA), da raça Paint Horse (ABCPaint), da raça Appaloosa (ABCCAppaloosa) e recentemente, da raça Crioula (ABCCC).

No último ano, a ABCCC liberou o uso da IA e da TE, com restrições. Foi publicado no Regulamento do Registro Genealógico, que a cada período gestacional todas as éguas confirmadas poderão gerar um produto, seja no próprio ventre ou por transferência de embrião, desde que resguardado o intervalo mínimo entre partos. As éguas inscritas no Registro de Mérito; as vencedoras dos Freios de Ouro, Prata e Bronze da ABCCC e da FICCC; as quatro melhores fêmeas da competição morfológica da Expointer e da FICCC; e as éguas classificadas em primeiro, segundo ou terceiro lugares da categoria geral da Marcha Oficial da ABCCC, poderão gerar, a cada temporada reprodutiva, dois produtos, não havendo necessidade da doadora gestar qualquer um dos dois produtos. A égua receptora deverá ser Crioula registrada e confirmada, e estar inscrita na ABCCC em nome do proprietário da égua doadora no momento da comunicação da sua realização. Poderá haver congelamento, armazenagem e transporte de embriões, mas na data da transferência do embrião para a receptora a doadora e o ganhão deverão estar vivos.

Na Argentina, desde a primeira TE realizada em éguas de Polo, em 1989, um número significativo de potros foram produzidos a partir desta tecnologia. É comum que a doadora competidora produza de 4 a 5 gestações no restante da temporada reprodutiva, após a temporada de polo, que ocorre de setembro a dezembro. Em um dos melhores centros de TE em equinos na Argentina, Doña Pilar, até 13 potros foram produzidos de uma mesma égua durante uma temporada reprodutiva (RIERA, 2009).

4 IMPORTÂNCIA

À parte da coleta de sêmen e da IA, a transferência de embriões se tornou a técnica de reprodução assistida mais reconhecida e utilizada no mundo equino. Tradicionalmente era usada em éguas velhas que falhavam reprodutivamente. Hoje em dia é usada de maneira eletiva, em qualquer égua em idade reprodutiva, o que, juntamente com a combinação do uso de novas tecnologias, melhorou consideravelmente as taxas de recuperação de embriões, que são iguais, ou maiores, do que as taxas de prenhez normal por ciclo. O uso da TE também permitiu o desenvolvimento de técnicas reprodutivas mais sofisticadas, como injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e clonagem (HARTMAN, 2011).

A TE tem sido usada para aumentar a produção de potros por égua, por ano, obter potros de éguas que estejam competindo (salto, adestramento, polo, shows, etc.) e obter potros de potrancas e de éguas subférteis (VANDERWALL, 2000; MCKINNON; SQUIRES, 2007; HARTMAN, 2011). Além disso, é usada para obter potros de éguas impossibilitadas de levar uma prenhez a termo por uma variedade de razões como idade, infecção uterina crônica ou dano cervical. Algumas razões menos comuns também podem ser usadas para preservar a produção de potros, como éguas com laminite crônica, artrite severa, comportamento perigoso em relação aos tratadores, outros cavalos ou mesmo com o próprio potro (HURTGEN, 2008).

A técnica favorece o maior controle de doenças quando da transferência de material genético entre estados ou países, bem como a obtenção de divisas através de exportações de embriões congelados (ARRUDA *et al.*, 2001). Uma causa nobre é a utilização da TE para produção de filhotes de equídeos exóticos, como a zebra e o cavalo Przewalski (SUMMERS *et al.*, 1987). Em cavalos de Polo, é comum cruzar uma doadora com diferentes ganhões em uma única temporada, produzindo vários potros que são treinados simultaneamente. Com essa prática, a TE torna-se uma ferramenta importante para identificar os melhores ganhões e éguas de polo, servindo como um teste de progênie (RIERA, 2009).

Em decorrência das incessantes pesquisas em biotecnologias aplicadas a reprodução equina, a TE tem se destacado nas últimas décadas pelo seu avanço científico e comercial, tornando a relação custo benefício cada vez mais atraente para o criador. Seguindo esse preceito, a TE torna-se cada vez mais comum na indústria do cavalo, sendo então, uma ferramenta bastante promissora para os técnicos que trabalham na área (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009).

5 INFLUÊNCIA DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA ÉGUA NA TE

A égua é classificada como poliéstrica estacional, com sua atividade reprodutiva ocorrendo na primavera e no verão. É também considerada monovulatória (apenas um folículo dominante selecionado a cada onda folicular), porém podem ocorrer múltiplas ovulações, que variam de 4 a 43%. Essas taxas são influenciadas principalmente por raça, idade, estado reprodutivo, estado nutricional e estação do ano, sendo o Puro Sangue de Corrida (PSC) a raça que possui o maior percentual de múltiplas ovulações, com médias entre 15 e 30% (GINTHER, 1992).

Em um estudo acompanhando quatro temporadas reprodutivas de 197 éguas doadoras de embriões da raça Polo Argentino, em sua maioria do tipo puro sangue, Losinno, Aguilar e Lisa (2000) encontraram 75% de éguas com pelo menos uma múltipla ovulação durante as temporadas analisadas, sendo o feito repetido em uma média de 38% dos ciclos. A taxa de custo benefício obtido de prenhez de ciclos de múltipla ovulação foi 96% maior que a taxa obtida de ciclos de única ovulação, concluindo que múltiplas ovulações aumentam a taxa de recuperação de embriões e a eficiência dos programas de TE.

Em relação à sazonalidade reprodutiva, a ausência de ciclos ovulatórios nos meses de inverno diminui a máxima utilização de éguas doadoras. O uso do fotoperíodo artificial, aliado a uma nutrição equilibrada, é considerado uma ótima alternativa para evitar esta “parada” fisiológica, fazendo com que doadoras e receptoras possam ser utilizadas durante o ano todo, otimizando a produção de potros por TE (ALBRECHT DE DAVID, 2011). Pessoa (2012) decidiu instituir um programa de luz em sua central para diminuir as despesas que possuía com o uso de progesterona em éguas em anestro. Apesar de um alto investimento inicial, devido à necessidade de colocação de uma linha de alta tensão, ainda assim, conseguiu diminuir os custos em 50% em relação aos que possuía com a compra do hormônio. Além disso, os gastos com manutenção do programa de luz são extremamente baixos e no ano seguinte a sua implantação, houve um aumento de 38% no número de gestações produzidas, o que demonstra a eficiência do fotoperíodo artificial.

Existem duas principais peculiaridades fisiológicas das éguas que impõem limitações à TE equina e que não ocorrem nas outras espécies domésticas que utilizam a técnica. A primeira é que as éguas ainda não podem ser superovuladas de forma bem sucedida, apesar de diversos

estudos buscarem um método eficiente de superovulação. A segunda é a variação na duração do ciclo estral das éguas, já que nem o início e nem o término do estro fornecem uma indicação confiável do momento da ovulação (LEY, 2006).

A sincronização do estro em éguas tem sido complicada devido à longa duração do comportamento de estro e o tempo variável do início deste até a ovulação da égua (CARD, 2009). Para diminuir a variação no ciclo estral das éguas e realizar a sincronização entre doadoras e receptoras, deve-se utilizar a hormonioterapia, que pode aumentar o período de ciclicidade das éguas durante o ano, possibilitar um ambiente uterino propício ao desenvolvimento embrionário, diminuir os intervalos entre ovulações, aumentando o número de ovulações/ ciclo e, conseqüentemente, de embriões/ ciclo, contribuindo, assim, na utilização de biotécnicas reprodutivas, como a TE (FARIA; GRADELA, 2010).

6 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS

O princípio da TE consiste na coleta de um embrião de uma égua doadora de alta qualidade genética acasalada com um garanhão geneticamente superior, e a transferência deste embrião para uma égua receptora, encarregada de levar a gestação a termo. Esta técnica baseia-se no fato de que a carga genética da égua que carrega o potro em nada influencia nas características deste animal. A constituição genética do potro e, portanto, suas características, são determinadas pela égua que produziu o óvulo e o garanhão cujo espermatozoide foi utilizado para fertilizá-lo (DAVIES MOREL, 2003). A TE também faz uso do fato de que nos primeiros 15-17 dias de gestação, o embrião equino tem vida livre no útero, migrando entre os cornos uterinos, não formando nenhum anexo embrionário neste período (GINTHER, 1983). Portanto, pode-se realizar a coleta do embrião e transferi-lo para o útero de outra égua com razoável facilidade.

6.1 Seleção e manejo das éguas doadoras e receptoras de embrião

Sem dúvida, o fator mais importante que afeta as taxas de prenhez de TE é o manejo das doadoras e receptoras de embriões (SQUIRES, 2003). Antes de serem admitidas nos centros, todas as éguas devem apresentar teste negativo para anemia infecciosa equina. Ao chegarem, devem passar por um exame físico geral, recebendo vermífugos e vacinas necessárias. Se houver um histórico reprodutivo, este deve ser cuidadosamente revisado, buscando características gerais e do ciclo estral (duração, incidência de dupla ovulação), pois a maioria desses achados se repete ano após ano. Além disso, uma avaliação reprodutiva deve ser realizada em cada égua que entra no programa de TE (RIERA, 2009).

Para se obter sucesso com a técnica, o estágio do útero para o qual o embrião será transferido deve estar sincronizado com o do qual foi coletado, ou seja, ambos devem estar em diestro, o que é normalmente atingido com o uso de hormônios exógenos (DAVIES MOREL, 2003). Porém, muitas vezes, a sincronização falha, sendo recomendado manter, no mínimo, duas éguas receptoras para cada égua doadora, garantindo a escolha de um melhor ambiente gestacional para o embrião (MCKINNON; SQUIRES, 2007). Segundo Losinno e Alvarenga (2006), melhor do que a relação doadora x receptora, é estimar um número de éguas receptoras 50% maior do que o total de gestações desejadas. A este número devem-se descontar os descartes

de éguas consideradas inaptas após a avaliação da biópsia endometrial (10-20%) e eventuais mortes (1-2,5%).

6.1.1 Égua doadora

Vários fatores devem ser levados em consideração ao selecionar-se uma égua como doadora em um programa de TE, incluindo histórico reprodutivo da égua, garanhão ou sêmen a ser utilizado, regulamento do registro de raça, custo do procedimento, valor potencial do potro, e número de produtos desejado. Um conhecimento aprofundado do histórico reprodutivo da égua pode permitir a estimativa do tempo necessário para obter uma prenhez da doadora (SQUIRES, 2003). Devido a TE ser um procedimento caro, sua utilização é normalmente restrita a éguas de qualidade superior, com características que se acredita serem altamente herdáveis (RIERA, 2009). Geralmente o potro deve ser avaliado em aproximadamente duas vezes o custo do procedimento da transferência. Entretanto, em alguns casos, os clientes desejam crias de uma égua doadora sem levar em conta o custo do procedimento (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999).

Éguas idosas podem constituir grande parte do número de doadoras em um programa de TE, principalmente por estes animais já apresentarem progênie comprovada ou terem obtido bons resultados na carreira esportiva (ALONSO *et al.*, 2005). Entretanto, este elevado percentual pode ser um problema, pois é sabido que éguas idosas possuem uma eficiência reprodutiva mais baixa que éguas jovens, fato normalmente associado com distúrbios da ovulação e maturação oocitária e/ou endometrite crônica (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). É sempre importante ter em mente que éguas idosas necessitam maiores cuidados em relação ao bem estar, como nutrição diferenciada, evitando estresse ambiental e social, além de que deveriam permanecer em piquetes próximos às centrais, evitando maiores deslocamentos (ALVARENGA, 2010).

Deve-se realizar um exame reprodutivo completo da égua, sendo ideal a avaliação de um ou de dois ciclos estrais de cada doadora antes da sua utilização no programa. Essa prática é de grande relevância se não há um histórico reprodutivo da égua (RIERA, 2009). Ao identificar anormalidades reprodutivas que necessitam tratamento (ex.: endometrite bacteriana) estas devem ser tratadas antes de se utilizar a égua para a transferência embrionária (VANDERWALL, 2000). É prudente ter certeza de que o útero da doadora está limpo antes da IA. O tempo e esforço gastos

com esses cuidados são recompensados com um aumento das taxas de sucesso da TE (HARTMAN, 2011).

O manejo das doadoras inclui a palpação transretal e ultrassonografia para monitorar a atividade folicular durante o ciclo estral e, se possível, a rufiação para monitorar a conduta reprodutiva (VANDERWALL, 2000). A partir do segundo ou terceiro dia de estro, as doadoras devem ser examinadas todos os dias, controlando mudanças foliculares e uterinas até a ovulação. Na maioria dos casos, o garanhão não está no mesmo local da doadora, sendo necessário o uso de sêmen refrigerado, transportado ou congelado, o que exige uma maior sincronia entre IA e ovulação. Para isso, quando a égua apresenta um folículo maior que 35mm, utilizam-se agentes indutores de ovulação, como hCG (gonadotrofina coriônica humana) ou deslorelina (agonista do GnRH), normalmente aplicados 24 horas antes da IA (SQUIRES, 2003).

6.1.2 A Importância da égua receptora

A seleção e o manejo da égua receptora são, provavelmente, os fatores mais importantes para o sucesso de um programa de transferência embrionária (VANDERWALL, 2000; VANDERWALL; WOODS, 2007; MCKINNON; SQUIRES, 2007). Estes dois fatores determinarão, em grande parte, o êxito da técnica. Logo, a seleção da receptora deve ser criteriosa, responsável e, sobretudo, deve visar à eficiência do programa de TE com o menor custo (ALONSO, 2008).

A manutenção de uma manada de receptoras exige bastante trabalho. As éguas devem ser escolhidas em um período anterior a temporada reprodutiva, não sendo admitidas receptoras novas após o início dos trabalhos, pelo risco de introdução de doenças contagiosas. Todas as éguas devem receber uma identificação permanente, evitando confusões sobre qual égua esta prenhe de qual embrião. Deve-se escolher receptoras reprodutivamente saudáveis, sem alterações músculo esqueléticas, saúde dentária, boa visão, qualidade de úbere e bom comportamento (HARTMAN, 2011). Porém, esse cenário não é a realidade, sendo bastante complicado escolher boas receptoras no mercado a um preço acessível. Segundo Alvarenga (2010), o aumento do interesse pelo uso de TE em equinos levou a um aumento do preço e uma redução da oferta de receptoras.

Mesmo com dificuldades, a escolha da égua receptora deve atender a certos critérios básicos de seleção. Em relação à idade, busca-se aquela no qual há melhor desempenho reprodutivo, sendo o ideal éguas entre 3 e 10 anos (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999; VANDERWALL, 2000; VANDERWALL; WOODS, 2007; MCKINNON; SQUIRES, 2007), já que a idade é um fator predisponente para a degeneração do endométrio uterino, que pode comprometer a manutenção de uma gestação (RICKETTS; ALONSO, 1991). Na verdade, receptoras com mais de 10 anos de idade parecem apresentar um maior risco de perda de prenhez (CARNEVALE *et al.*, 2000). Além disso, segundo Losinno e Alvarenga (2006) quanto mais velha a égua receptora, menos estações reprodutivas poderá estar no programa de TE, sendo menos produtiva e seu custo inicial menos amortizável.

Já em relação ao peso, preconiza-se uma égua com média entre 400 e 550 Kg, sendo indicada a combinação do tamanho da receptora com o da doadora (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999; SQUIRES, 2003; RIERA, 2009). Segundo estudo de Allen *et al.* (2002), que comparou prenhez de embriões pônei transferidos para éguas PSC e vice-versa, um tamanho materno inadequado leva a um tamanho aumentado (no caso de excesso de espaço) ou diminuído (no caso de falta de espaço) do potro. Como o tamanho uterino está diretamente relacionado com o tamanho da égua, indica-se uma receptora de igual ou maior tamanho que a doadora. Porém, não é indicada a utilização de receptoras de raças pesadas para embriões de cavalos leves e medianos, pois além do potro nascer com um peso maior que o esperado para sua raça, a égua apresenta uma produção de leite muito maior do que a mãe biológica, o que pode produzir problemas digestivos, já que o potro não é desenhado para tomar tanto leite, e levar a problemas de crescimento, devido ao ganho de peso diário maior que a média esperada (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Ao utilizar receptoras primíparas, é importante alertar ao dono do embrião que os potros podem nascer menores (RIERA, 2009). Em estudo de Wilsher e Allen (2002), parâmetros placentários e peso dos potros ao nascimento foram menores em éguas primíparas quando comparados com os de éguas na segunda ou subseqüente gestação.

Outro importante aspecto a ser levado em consideração é a possibilidade de manejo da égua, pois um animal agitado, não manejável, representa um risco para os profissionais e para o embrião (ALONSO, 2008). As éguas devem ser, no mínimo, bem cabresteadas (MCKINNON; SQUIRES, 2007; RIERA, 2009; HARTMAN, 2011), permitindo a realização de controles

ultrassonográficos e não dificultando o manejo dos profissionais com o potro (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Segundo Mckinnon e Squires (2007), éguas virgens ou jovens que tenham parido um ou dois potros são preferidas como receptoras. Entretanto, Losinno e Alvarenga (2006) discordam desta afirmação em relação às potrancas (2-4 anos), pois estas apresentam ciclos estrais erráticos mais frequentes que as adultas, e, muitas vezes, indocilidade para o manejo intensivo de exames retais. Esta escolha varia muito entre os centros de TE, sendo que vários deles escolhem especificamente éguas que tenham parido anteriormente, pela habilidade materna (ALONSO, 2008).

A receptora deve apresentar uma boa sanidade, sendo livre de enfermidades infectocontagiosas, especialmente anemia infecciosa equina, babesiose, leptospirose e adenite equina. Além desse controle, é importante realizar a quarentena das éguas que ingressam no programa, evitando o comprometimento das outras receptoras, doadoras e reprodutores (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Diversos tipos de receptoras podem ser utilizados: éguas cíclicas, éguas ovariectomizadas, éguas na fase transicional ou éguas em anestro. Geralmente, há preferência por éguas cíclicas, porém, no início da temporada, estas são escassas, utilizando-se como alternativa éguas em anestro ou na fase transicional. Para usá-las como receptoras é necessária a administração diária ou semanal de progestágenos, que também são administrados nas éguas ovariectomizadas. Entretanto, nestas, a terapia deve se estender até os 100-120 dias de gestação, quando a placenta passa a produzir progesterona em níveis adequados (SQUIRES, 2003; RIERA, 2009). O uso de progestágenos prepara o útero para receber o embrião e garante a manutenção da prenhez.

Para evitar o uso de éguas em fase transicional e anestro, um bom programa de fotoperíodo artificial é o método mais confiável para garantir a entrada das éguas em ciclicidade no início da temporada. Como protocolo, as éguas são expostas a um total de 16 horas luz a cada 24 horas, com início dois meses antes da temporada. Uma dificuldade encontrada pelos grandes centros é o método de aplicação da luz artificial, quando utilizado para um plantel numeroso, sendo o mais comum a encerra de várias éguas em um piquete, o que pode acarretar estresse devido a superlotação e falta de acesso a alimento e/ou água (HARTMAN, 2011).

As éguas devem passar por um exame reprodutivo completo antes da compra, que deve incluir, além da palpação retal e ultrassonografia, exame citológico, exame de biopsia endometrial, integridade dos genitais externos e exame de competência cervical. Entretanto, geralmente o exame não é feito de uma forma completa, havendo uma grande proporção de éguas aceitas que não estão aptas reprodutivamente (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Éguas com conformação perineal ruim, que predispõe à entrada de ar na vagina são geralmente rejeitadas (SQUIRES, 2003). As receptoras devem apresentar uma cérvix íntegra e não muito torta (STOUT, 2006), com tamanho e tônus adequados (RIERA, 2009). Também devem ser livres de anormalidades ovarianas e uterinas, como fluido uterino, cistos uterinos, presença de ar ou debris no útero, tumores ovarianos ou outra característica ovariana anormal. Ao escolher uma égua receptora cíclica, esta deve apresentar ciclos estrais regulares (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999).

De acordo com a classificação histopatológica de Kenney (1978), éguas receptoras deveriam apresentar biópsias uterinas classificadas como categorias I ou IIA (RIERA, 2009). Em estudo avaliando a classificação endometrial relacionada com a idade das éguas receptoras, Losinno, Alonso e Castaneira (2005) encontraram 27% de categoria IIB e 5% de categoria III em éguas de 2-10 anos, o que indica que na população estudada 32% das éguas com menos de 10 anos estavam comprometidas para levar uma gestação a termo, mesmo tendo sido classificadas como clinicamente aptas como receptoras.

Em relação ao manejo nutricional, este afeta diretamente as taxas de prenhez após a transferência, sendo necessário que as éguas estejam em bom estado corporal, ganhando peso durante a estação de monta (ALONSO, 2008). Segundo Losinno e Alvarenga (2006), é importante lembrar que uma receptora não alimentada adequadamente vai apresentar uma maior dificuldade em ciclar regularmente, gerando um produto de menor qualidade, com o agravante de comprometer sua lactação futura. De acordo com Pessoa (2012), os custos envolvendo alimentação de receptoras em uma central de TE chegam a 25% do custo total, logo, deve-se buscar fontes mais baratas de alimentação, evitando diminuir a qualidade da mesma.

No manejo diário, deve-se objetivar sempre o menor estresse possível. Os piquetes devem ter baixa lotação, fácil acesso à água e boas pastagens. As mudanças de grupos de animais não devem ser feitas individualmente, evitando problemas de hierarquia (ALONSO, 2008). É muito comum que receptoras incorporadas no último trimestre da temporada de monta não

emprenhem e entrem em anestro mais cedo que o resto do grupo. A habilidade de vencer esse problema é um dos maiores desafios de um grande programa comercial de TE (RIERA, 2011).

As receptoras também devem ser examinadas diariamente quando em cio para monitoramento do crescimento folicular e ovulação (VANDERWALL; WOODS, 2007). O conhecimento preciso do dia da ovulação de cada receptora é necessário, sendo indicado realizar o exame diário do trato reprodutivo por palpação transretal e ultrassonografia (HARTMAN, 2011).

Aproximadamente 15 a 20% das éguas inicialmente apresentadas como opção são rejeitadas como receptoras (SQUIRES, 2003). Considerada durante anos uma égua de “segunda”, sendo submetida a condições inferiores em relação à atenção, espaço, sanidade e alimentação, em relação àquelas oferecidas à doadora, hoje a receptora ocupa uma posição importante dentro das decisões de um plantel comercial de TE (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

6.1.3 Sincronização entre doadora e receptora

Entre as espécies de grandes animais, a equina é talvez a menos rigorosa em suas exigências para sincronização da ovulação entre doadora e receptora no momento da TE, para o alcance de altas taxas de prenhez (ALLEN, 2005). Equinos permitem um grau maior de assincronia do que bovinos e outros ruminantes (WILSHER; KÖLLING; ALLEN, 2005). Os métodos utilizados para sincronizar as doadoras e receptoras são: ovulação espontânea, indução da ovulação e terapia hormonal de receptoras que não estão ovulando. Entretanto, a utilização de éguas naturalmente sincronizadas requer um número elevado de receptoras para cada doadora (ZERLOTTI, 2012).

A sincronização entre os ciclos estrais das doadoras e receptoras é a atividade que consome mais tempo em um centro de TE (RIERA, 2011). As éguas devem ser examinadas rotineiramente por palpação transretal e ultrassonografia do trato reprodutivo (RIERA, 2009; HARTMAN, 2011). Éguas doadoras em estro devem ser examinadas uma vez ao dia assim que um folículo dominante é identificado, sendo essa prática essencial para decidir a hora da IA ou monta natural e para determinar o dia da ovulação (RIERA, 2009), que é designado como Dia 0 (D0).

A sincronia entre embrião e ambiente uterino é essencial para o estabelecimento da gestação. O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, sendo que um embrião em um útero não sincronizado pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes à fase na qual ele se encontra. Além disso, uma assincronia pode impedir o embrião de “transmitir” o sinal para o reconhecimento materno e, com isso, não suprimir a resposta luteolítica cíclica da égua (WILSHER; KÖLLING; ALLEN, 2005).

A janela de sincronização comumente aceita entre doadoras e receptoras é aquela na qual receptoras encontram-se entre o quarto e oitavo dia de ovulação, ou seja, relacionado com a ovulação da doadora (D0), e a coleta de embrião no dia 7, a receptora poderia ovular um dia antes (+1) até 3 dias depois (-3), sendo considerada apta a receber embriões neste intervalo (VANDERWALL, 2000; SQUIRES, 2003; LOSINNO; ALVARENGA, 2006; MCKINNON; SQUIRES, 2007; HARTMAN, 2011).

Estudos recentes demonstram que essa janela pode ser mais flexível do que se pensava. 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. Jacob *et al.* (2012) confirmaram esses dados dez anos depois, não obtendo diferenças entre +1 e -5 dias de sincronia, com 76% e 61% de taxa de prenhez com receptoras ovuladas 4 e 5 dias após a doadora, respectivamente. Com esse aumento de intervalo, um menor número de receptoras precisaria ser monitorado para atingir sucesso nas taxas de prenhez por TE, trazendo benefícios ao programa, tais como: menor número de éguas para alimentar e manejar, menos exames reprodutivos, menos custos com tratamentos hormonais e menor necessidade de mão de obra.

Carnevale *et al.* (2000) mostraram que o tempo de ovulação, e não a sincronização entre doadora e receptora, pode ser mais importante no momento da escolha da receptora para a TE. Além disso, o estudo sugeriu que um tônus uterino reduzido pode indicar ambiente uterino não completamente adequado para o desenvolvimento do embrião. Fleury, Alonso e Balieiro (2006) observaram ser possível a utilização de receptoras no dia 3 pós ovulação, não obtendo diferenças nas taxas de prenhez entre D3 e D8, desde que as éguas apresentem boa ecogenicidade e bom tônus uterino na avaliação ginecológica. Alonso (2007) também não encontrou diferença significativa entre as taxas de prenhez das receptoras de embrião transferidas entre os dias 3 a 8 pós ovulação, confirmando que ao utilizar éguas com endométrio homogêneo, ecogenicidade uniforme e útero tubular com bom tônus obtém-se melhores índices de prenhez .

No centro argentino Doña Pilar utilizam-se receptoras que ovularam no mesmo dia da doadora até quatro dias depois, sendo a sincronização melhor compreendida se os dias de influência da progesterona no útero da receptora forem levados em consideração no momento da TE. No centro buscam-se receptoras que estejam sob influência da progesterona por, no mínimo, quatro e não mais que sete dias no momento da TE. Essa influência pode ser endógena, se a receptora ovulou efetivamente, ou exógena, nos casos em que a receptora não está ciclando (RIERA, 2011).

O uso de progesterona em éguas receptoras em anestro ou na fase transicional no início e final da estação reprodutiva é frequente no Brasil. Esse protocolo é indicado, pois é sabido que doadoras ciclam mais cedo que as receptoras no início da estação de monta, bem como deixam de ciclar mais tarde no final da estação (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Em estudo de Caiado *et al.* (2005) verificou-se que o tratamento diário com progesterona oleosa iniciado no dia da ovulação (D0) da receptora até o quinto dia (D5) pós ovulação permite o uso destas já no segundo dia do ciclo (D2), com uma taxa de prenhez de cerca de 72% das éguas tratadas contra 30% das éguas não tratadas.

Segundo Wilsher, Kölling e Allen (2005), o insucesso de muitos estudos que tentaram aumentar demasiadamente a janela de sincronia entre doadora e receptora pode ser explicado pela necessidade do embrião transmitir seu sinal de reconhecimento materno antiluteolítico antes ou no 10º dia após a ovulação. Este sinal previne a regulação cíclica de receptores de ocitocina no endométrio que disparará a cascata luteolítica causada pela PGF2a. Em experimento, os autores utilizaram receptoras que ovularam 2 ou 3 e 4 ou 5 dias antes da doadora, com dois grupos controle e dois grupos tratados com ácido meclofenâmico, um antiinflamatório não esteroide, da família dos fenamatos, do 9º dia pós ovulação até 7 dias após a TE. Ambos os grupos tratados com ácido meclofenâmico apresentaram taxas de prenhez significativamente maiores (2 ou 3= 85% e 4 ou 5= 50%) quando comparados com as éguas dos grupos controle (2 ou 3= 50% e 4 ou 5= 6%). A partir destes resultados, poderíamos utilizar este tratamento quando há apenas uma receptora disponível ovulada de 2 a 5 dias antes da doadora, visto que sem o tratamento a taxa de prenhez é insatisfatória. Conclui-se também que a janela de sincronização pode ser aumentada, usando receptoras no D9 e D10 com bons resultados.

Para realizar a sincronização do estro e a indução da ovulação em doadoras e receptoras são utilizadas várias combinações de esteróides reprodutivos (progestágenos e

estrógenos), prostaglandina (PGF2 α) e análogos, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e análogos (CARD, 2009; BRADECAMP, 2011). O método de sincronização utilizado depende do número de éguas envolvidas no programa. Se há um grande número de receptoras, a sincronização pode ser feita com a administração de uma dose luteolítica de PGF2 α ou análogo a uma ou duas receptoras, 1 ou 2 dois dias após a administração na doadora (RIERA, 2009). Segundo Bradecamp (2011), para atingir os melhores resultados, ao menos 3 receptoras deveriam ser sincronizadas com cada égua doadora. Para isso, a autora cita um protocolo de administração de progesterona ou progesterona e estradiol (P&E) diário, que deve ser iniciado nas éguas receptoras e na doadora no mesmo dia. Aproximadamente 8- 10 dias depois, a terapia com progestágenos deve cessar e uma administração de prostaglandina deve ser feita em todas as éguas. Após 3-4 dias, avaliações ultrassonográficas devem ser realizadas para avaliar a situação folicular de cada égua, seguindo o acompanhamento do estro.

O tratamento para induzir a ovulação é normalmente feito 8 dias após a última aplicação de progestágenos ou P&E. Dois hormônios são comumente usados para indução da ovulação em éguas: hCG e deslorelina (análogo do GnRH). O tempo médio para ovulação após aplicação de hCG é 36 horas, já para a deslorelina é 44 horas. Após aplicação, as éguas devem ser checadas diariamente para confirmar a ovulação. O protocolo de administração de progesterona ou P&E requer menos palpções retais, porém, exige injeções diárias dos hormônios (CARD, 2009).

Segundo Kölling e Allen (2005), o uso de agentes indutores de ovulação pode levar a uma maior eficiência reprodutiva, diminuindo a duração do estro, aumentando o número de ovulações que ocorrem em até 48h após a aplicação destes agentes, diminuindo o número de inseminações artificiais ou montas naturais por estro e sincronizando ovulação e IA. Em estudo comparando o uso de hCG e análogos do GnRH, os pesquisadores chegaram à conclusão de que o análogo do GnRH é uma boa alternativa frente ao hCG, que pode levar a formação de anticorpos após repetidas doses. Entre os análogos de GnRH disponíveis, o Biorelease Deslorelin se mostrou mais eficiente que o acetato de deslorelina (Ovuplant[®]), com uma taxa de recuperação embrionária de quase 70% *versus* 53%. Foram testadas duas doses de Biorelease Deslorelin, (0,75mcg e 1,5mcg), sendo a dose mais baixa considerada adequada para indução de ovulação de éguas tamanho PSC.

6.1.4 Superovulação

A maioria das éguas doadoras apresentam, espontaneamente, ovulações simples. A recuperação embrionária de éguas com ovulação simples é de aproximadamente 50% por ciclo estral e a taxa de prenhez após a transferência destes embriões é de cerca de 75%. Ou seja, em um ciclo estral, há 35% de chance se obter uma prenhez por TE (SQUIRES; MCCUE, 2007). A tentativa de superovular éguas tem como principal objetivo aumentar as chances de recuperação embrionária em um ciclo e, conseqüentemente, melhorar a eficiência e diminuir os custos envolvidos em programas de TE (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Além disso, poderia fornecer embriões extras para congelamento, melhorar a fertilidade de éguas subfêrteis e adiantar a primeira ovulação das doadoras (SQUIRES; MCCUE, 2007).

É bastante complicado superovular éguas, sendo alguns dos problemas encontrados a inconsistência do número de éguas que respondem ao tratamento de superovulação, a falta de drogas comerciais superovulatórias disponíveis, o custo do tratamento e a possível baixa viabilidade dos múltiplos embriões (MCKINNON; SQUIRES, 2007). Alguns autores consideram impossível a superovulação na égua, devido à configuração anatômica do seu ovário, uma vez que, somente uma pequena porção do ovário tem epitélio germinativo para acomodar a ovulação, denominada fossa ovulatória. Outros têm reportado que a coleta de embriões por ovulação é menor em éguas superovuladas e que os embriões obtidos dessas éguas apresentam baixas taxas de fertilidade (SQUIRES; MCCUE, 2007).

Outro grande problema encontrado é a refratariedade da égua aos preparados hormonais à base de FSH Suíno disponíveis comercialmente para outras espécies, como bovinos. Sendo o uso de FSH homólogo necessário para se obter resposta ovariana com o tratamento. Desta forma, o Extrato de Pituitária Equina (EPE) e o FSH equino purificado (eFSH) são indicados para induzir a superovulação na égua (ALVARENGA, 2010). Com esses tratamentos, éguas cíclicas obtêm uma resposta superovulatória satisfatória, com variação de 3 a 5 ovulações por ciclo, entretanto, a recuperação embrionária tem sido baixa, com uma média de 30 a 40% de embriões recuperados por ovulação (ALVARENGA; CARMO; LANDIM-ALVARENGA, 2008).

Há uma grande variabilidade na resposta ovariana da égua tratada com EPE, principalmente em relação à dose utilizada, dia do ciclo estral e características foliculares no

momento do início do tratamento. De maneira geral, o tratamento padrão utilizando EPE ou eFSH consiste em aplicações BID, iniciando-se o tratamento nos dias 5 a 7 do ciclo estral, no começo da onda folicular, antes do aparecimento do folículo dominante (>22,5 mm), sendo a luteólise induzida por administração de PGF2a no mesmo dia ou até dois dias mais tarde do início da administração. O tratamento continua até que a maioria dos folículos alcance um diâmetro maior que 35 mm, sendo então, a ovulação induzida com dose única de hCG (SCOGGIN *et al.*, 2002).

Em estudo avaliando o uso de doses constantes e decrescentes de EPE na indução de superovulação em éguas, Carmo (2003) não encontrou diferenças significativas entre os tratamentos com doses constantes (25mg/IM, BID) e doses decrescentes (40mg/IM, BID, baixando 5mg por dia, até chegar a 10mg/IM) que eram realizados a partir do 7º dia do ciclo, até no máximo 10 dias após o início do tratamento. Os valores médios, 4,25 ovulações e 1,5 embriões por égua obtida nos tratamentos superovulatórios dos dois protocolos estudados, onde 84% das éguas apresentaram múltiplas ovulações, permitem concluir que o EPE superestimulou com eficiência a atividade ovariana em éguas cíclicas, apresentando, entretanto, baixas taxas de recuperação embrionária.

Procurando entender os motivos que levam a essas baixas taxas de recuperação embrionária, Carmo *et al.* (2005) avaliaram ovidutos quanto à presença e qualidade de oócitos obtidos em éguas superovuladas com o mesmo protocolo de doses constantes, citado acima. Constataram superioridade no número médio de ovulações das éguas superovuladas (4,41) *versus* o grupo controle (1,16), entretanto, a taxa de recuperação de oócitos por ovulação foi cerca de 60% nas éguas superovuladas *versus* 85% no grupo controle. Indicando que durante a ovulação ocorre alguma falha na captação e/ou na migração de oócitos para o oviduto nas éguas superovuladas.

Diversos experimentos têm sido realizados buscando a eficiência de baixas doses de EPE (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Em estudo comparando dois protocolos, o primeiro utilizando EPE 6mg BID, e o segundo, EPE 12mg SID, Alonso, Fleury e Alvarenga (2006) encontraram um maior número de ovulações por égua no segundo grupo, entretanto, a taxa de recuperação embrionária não diferiu estatisticamente. Concluindo que o segundo protocolo é mais eficiente, pois além de necessitar somente uma aplicação por dia, obteve uma maior taxa de ovulação do que o primeiro.

O eFSH é um FSH parcialmente purificado de hipófise equina que apresenta uma taxa de FSH:LH de 10:1 e pode ser utilizado com as mesmas finalidades que o EPE (FARIA; GRADELA, 2010). O hormônio eFSH tem sido usado para estimular o desenvolvimento folicular em éguas na fase transicional e éguas acíclicas, assim como para induzir a superovulação (MCCUE; LEBLANC; SQUIRES, 2007). Ele apresenta como principais vantagens o aumento do número de embriões recuperados por lavado e a antecipação da estação reprodutiva em 11,5 dias. Além disso, não interfere na ciclicidade da maioria das éguas após o tratamento, embora tenha sido relatado um maior período de tempo para a ocorrência da segunda ovulação após o tratamento em relação ao grupo não tratado. Entretanto, um dos problemas do uso do eFSH é a possibilidade de superestimulação (>5 ovulações), que geralmente leva a uma recuperação bastante baixa de embriões, ou até mesmo de nenhum embrião. Também podendo levar ao aumento de folículos anovulatórios ou luteinizados (PERES *et al.*, 2007).

Diversos estudos utilizando eFSH obtiveram maior taxa de ovulação (3,4) utilizando 12 mg BID, iniciando 5-6 dias após a ovulação, com média de duração do tratamento de 7,5 dias (MCCUE; LEBLANC; SQUIRES, 2007). Niswender *et al.* (2003), comparando o efeito da administração de 25 e 12 mg de eFSH (BID) seguida pela indução de ovulação com deslorelina ou hCG, observaram maior número de folículos >35 mm e de ovulações nas éguas tratadas com 25 mg associado à deslorelina comparado ao grupo controle, entretanto, as taxas de prenhez não diferiram entre os dois grupos. As éguas tratadas com 12 mg associado à deslorelina ou hCG também desenvolveram mais folículos que as éguas do grupo controle. As maiores taxas de ovulação, prenhez e recuperação embrionária foram observadas nas éguas tratadas com 12 mg associada à 2500 UI de hCG.

A utilização de EPE e eFSH encontra alguns obstáculos, como a dificuldade de preparação do EPE e sua indisponibilidade comercial, o que impede seu uso em larga escala. Recentemente, até mesmo o eFSH não tem sido comercializado nos EUA. Por isso, o uso de hormônios recombinantes parece ter uma perspectiva promissora, já que não será mais necessário extrair FSH da pituitária equina (ALVARENGA, 2010). Segundo Meyers-Brown *et al.* (2010), o eFSH recombinante (reFSH) foi considerado tão efetivo como o eFSH, aumentando o número de folículos maiores de 35 mm, as taxas de ovulação e a recuperação embrionária. O reFSH tem a vantagem de poder ser produzido em grandes quantidades, com qualidade consistente, sendo uma excelente ferramenta para o manejo superovulatório das éguas.

6.2 A Coleta de embrião

A coleta de embrião padrão é realizada por lavagem transcervical uterina não cirúrgica. A égua deve ser colocada em um brete de palpação, seu reto deve ser esvaziado e sua área perineal deve ser bem lavada e secada. Uma sonda de silicone de aproximadamente 80 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro, com um manguito inflável em uma extremidade, deve ser inserida na vagina por um operador com luva estéril (VANDERWALL, 2003). Com a ajuda do dedo indicador, o operador deve passar a sonda pela cérvix até o início do corpo uterino, inflando o balão do manguito com 30- 50 ml de ar. Este deve ser gentilmente tracionado para trás, selando a abertura da cérvix e prevenindo a perda de líquido do lavado. Antes de começar o procedimento, a sonda deve ser conectada a 2 cateteres por uma junção em Y, um cateter deve estar ligado ao recipiente com líquido e o outro, ao filtro de embrião. O sistema deve ser fechado, sendo totalmente preenchido com líquido, eliminando o ar e evitando a formação de bolhas e espuma. A integridade do balão de ar também deve ser checada antes de introduzir a sonda na égua (RIERA, 2009). No Brasil, utiliza-se muito o sistema aberto, no qual o filtro não fica completamente cheio de líquido e o cateter é apenas direcionado a ele, permanecendo com a tampa aberta. Além deste sistema ser mais perigoso, com maior risco de perder o embrião por falha no momento da coleta, a chance de contaminação é muito maior.

O útero deve ser lavado de 3 a 4 vezes com líquido morno (30- 35°C). Em cada lavado, deve-se infundir 1-2 L de fluido, dependendo do tamanho do útero da égua. O fluido geralmente utilizado nos EUA é a solução salina tamponada de Dulbecco (DPBS), com 1% de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ ml) e estreptomicina (100 µg/ ml). Depois de cheio o útero, é permitida a saída do líquido pela sonda, por gravidade, passando por um filtro para embriões de 75 µ. É importante que o filtro nunca fique sem líquido ou transborde. O líquido que passa pelo filtro deve ser coletado, monitorando o quanto já se recuperou. Após a primeira lavagem, o útero deve ser massageado através do reto durante as lavagens seguintes, o que pode ajudar o embrião a ficar suspenso no líquido e também aumentar a recuperação total do líquido. A maior parte do líquido do lavado deveria ser recuperado (>90%) e estar livre de restos celulares e sangue. A recuperação de um líquido opaco indica que a égua apresenta um processo de endometrite ativa no momento do lavado, e necessitará uma avaliação futura. A presença de

sangue pode estar associada com um massageio vigoroso do útero ou com a manipulação da sonda (VANDERWALL, 2000).

O tipo de líquido utilizado para lavagem é uma questão de preferência pessoal. Antibióticos podem ou não ser utilizados. A maioria dos meios para lavagem contém ingredientes que previnem a aderência do embrião a sonda ou a parede do filtro, como albumina de soro bovino (BSA) ou álcool polivinílico (HARTMAN, 2011). Como citado anteriormente, nos EUA o meio mais utilizado para lavagem é o DPBS. Já no Brasil, o Ringer com lactato é a solução de lavado mais utilizada (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009), assim como na Argentina.

Para aumentar as chances de recuperação embrionária, Hinrichs (1990) sugeriu deixar o útero distendido com o líquido de lavagem por 3 minutos, antes de recupera-lo, em cada um dos 3 lavados. Com isso, conseguiu ótimas taxas de recuperação embrionária em éguas de ovulação simples (87%) e éguas de ovulações múltiplas (160%). Para complementar esta técnica, Hudson e McCue (2004) descreveram uma quarta lavagem na qual o meio também era deixado no útero por 3 minutos. Após isso, ocitocina era administrada e o útero era vigorosamente manipulado pelo reto antes da recuperação do fluido. Um total de 32 embriões foi recuperado durante este lavado “extra”, enquanto nenhum embrião tinha sido encontrado nos 3 lavados anteriores, resultando em um incremento na taxa de recuperação embrionária em torno de 10%. A falha em esvaziar completamente o útero, especialmente no último lavado, pode predispor a doadora à endometrite. Logo, um exame ultrassonográfico após o término da lavagem deve ser feito, garantindo que todo o líquido tenha sido recuperado (HARTMAN, 2011).

Após o término da lavagem uterina (duração média: 15 – 20 min), o filtro é drenado deixando cerca de 20 ml de fluído dentro dele. O conteúdo é então colocado em uma placa de Petri, para busca do embrião. O filtro deve ser lavado para garantir que o embrião não fique aderido nas paredes, fundo ou tampa do mesmo (RIERA, 2009). Normalmente, os embriões maiores (dias 8 e 9) podem ser vistos a olho nu, porém para os mais jovens (<8 dias) é necessário o uso de um microscópio estereoscópico (MCKINNON; SQUIRES, 2007). Quando um embrião é identificado, ele é lavado, passando por diversas (3- 10) gotas de 1 ml de meio *holding*, que consiste em um meio de lavagem com formulação enriquecida. Após a lavagem, o embrião é colocado em uma pequena placa de Petri que contém o mesmo *holding*. Ele é então avaliado e classificado em uma escala de 1 a 4 (Tabela 2). Os embriões podem ser manipulados com

palhetas de sêmen congelado de 0,25 ou 0,5 ml acopladas a uma seringa (VANDERWALL, 2003).

Tabela 2 — Escala para classificação e descrição dos embriões

Grau	Categoria	Aparência	Características
1	Excelente	Esférico	Tamanho, cor e textura uniforme
2	Bom	Poucas imperfeições	Alguns blastômeros deslocados, forma irregular, separação do trofoblasto
3	Regular	Problemas óbvios	Blastômeros deslocados, células degeneradas, blastocele colapsada
4	Ruim	Problemas severos Forma irregular	Blastocele colapsada, muitos blastômeros deslocados, células degeneradas

Fonte: Adaptação de Hartman (2011, p. 283).

Após o procedimento de lavagem, os embriões podem ser mantidos em temperatura ambiente, no meio *holding*, por duas ou três horas até a transferência (RIERA, 2011). Caso não sejam transferidos imediatamente, podem ser transportados (mesmo dia ou no dia seguinte) para outro local. Para isso, devem ser colocados em meio *holding* e resfriados no mesmo sistema utilizado para sêmen refrigerado (HARTMAN, 2011). As taxas de prenhez de embriões refrigerados e transportados são similares as de embriões transferidos imediatamente após a coleta, logo, embriões podem ser resfriados e mantidos à 5°C por um período de 24 horas sem diminuição da fertilidade (CARNEY *et al.*, 1991).

6.2.1 Dia da coleta

Os embriões equinos são seletivamente transportados pelo oviduto até a chegada ao útero entre os dias 5 e 6 após a ovulação (ovulação = Dia 0), onde se encontram entre a fase de mórula compacta para blastocisto inicial. Embora embriões possam ser recuperados entre os dias 6 e 9 após ovulação, a decisão de quando realizar a coleta é influenciada por vários fatores. Embriões que serão transferidos imediatamente após a coleta ou serão armazenados resfriados por pouco tempo até serem transferidos, são geralmente recuperados no 7º ou 8º dia após a

ovulação. Já aqueles que serão congelados devem ser coletados no 6º dia após a ovulação (VANDERWALL, 2003), pois são mais resistentes e se encontram na melhor fase de desenvolvimento para congelamento (ZERLOTTI, 2012). Entretanto, a taxa de recuperação no dia 6 tende a ser mais baixa, fato que pode ser explicado por uma falha na descida do embrião até o útero, falha do veterinário em recuperar o embrião do útero devido ao seu maior peso gravitacional, dificuldade de encontrá-lo pelo seu menor tamanho ou perda do próprio durante o processo (RIERA, 2009).

Segundo Hartman (2011), o tamanho ideal de um embrião é normalmente alcançado no 7º dia após ovulação, data na qual seu diâmetro é de aproximadamente 400 a 500 μm (Tabela 3). Entretanto, o tamanho embrionário pode sofrer variações, sendo influenciado por diversos fatores, tais como: a idade da doadora, a fertilidade do garanhão, a sincronização entre a monta ou IA em relação à ovulação e variação do tempo entre a ovulação e fertilização, além da influência do dia em que o embrião vai para o útero. Para o autor, éguas normais devem ser lavadas 7 dias após a ovulação. Como exceções, éguas velhas (com mais de 18 anos), éguas cruzadas com garanhões mais velhos ou subférteis e éguas inseminadas com sêmen congelado devem ser lavadas no 8º dia após ovulação.

Tabela 3 — Características dos embriões recuperados baseadas nos dias após ovulação

Dia	Tamanho (μm)	Média (μm)	Estágio esperado
6	200	130- 750	Mórula a blastocisto inicial
7	400	135- 1460	Mórula a blastocisto expandido
8	1000	120- 4000	Blastocisto a blastocisto expandido
9	2000	750- 4500	Blastocisto expandido

Fonte: Adaptação de Vanderwall (2000, p. 3)

Outros autores preferem sempre realizar as coletas de embrião no dia 8, pois neste estágio os embriões são grandes o suficiente para serem facilmente buscados, diminuindo as chances de não serem encontrados ou de serem perdidos durante seu manuseio (VANDERWALL, 2003; RIERA, 2009). Para Zerlotti (2012), embriões do dia 8 são os maiores que se encaixam confortavelmente dentro de uma pipeta de IA para transferência. Já embriões do dia 9 não são rotineiramente coletados, pois devido ao seu grande tamanho as taxas de prenhez

podem ser mais baixas, provavelmente pelo dano que pode ser causado durante sua manipulação (HINRICHS; CHOI, 2005).

Para Wilsher, Clutton-Brock e Allen (2010) embriões de dias 9 ou 10 tem sido considerados muito grandes e frágeis para sobreviver à rotina dos procedimentos que envolvem a TE. Entretanto, nesse estudo, os pesquisadores transferiram somente embriões de 10 dias, conseguindo bons resultados. A vantagem de recuperar um embrião como este é a possibilidade de identificação da doadora prenhe, por meio da ultrassonografia, antes da realização da lavagem uterina. Deve-se apenas ter o cuidado para que a sonda utilizada seja de maior diâmetro, não causando dano ao embrião. Porém, é importante citar que as taxas de prenhez utilizando embriões no 10º dia após ovulação não são muito altas (MCKINNON; SQUIRES, 2007).

6.2.2 Fatores que afetam a taxa de recuperação

A taxa de recuperação embrionária por égua é a percentagem de embriões coletados por lavado uterino, sendo esta muito importante para o sucesso na implantação de um programa de TE. O dia da coleta, citado acima, é um fator de muita influência na taxa de recuperação de embriões. Características da própria doadora, como a condição uterina e a idade, são fatores importantes que também influenciam fortemente a taxa, assim como a realização de um manejo reprodutivo adequado e o conhecimento e experiência do técnico envolvido na realização do procedimento (GOMES; GOMES, 2008).

De acordo com Losinno e Alvarenga (2006), o ganhão é um fator chave, já que nenhum programa pode sustentar-se comercialmente se não houver um diagnóstico andrológico completo e uma estimativa da capacidade reprodutiva dos reprodutores. No Brasil, o uso do sêmen refrigerado e transportado é crescente e necessário. Entretanto, o uso indevido da técnica de transporte de sêmen parece ser um dos mais importantes fatores que interferem na eficiência de programas de TE no país. Os principais erros apontados pelos autores são: não respeito às regras básicas para processamento (dose, diluente: sêmen), uso de sistemas de transporte inadequados (temperatura), não respeito a limitações do próprio ganhão (qualidade do sêmen, regime de coletas) e momento e frequência da IA inadequados. Como estratégias para melhorar a eficiência da IA com sêmen resfriado, são citadas: determinar o melhor regime de coleta semanal para cada ganhão, o melhor diluente, a temperatura ideal para transporte e o tempo máximo

para transporte. Além disso, remover o plasma seminal através da centrifugação e inseminar o mais próximo possível da ovulação são boas medidas para aprimorar as taxas de recuperação.

Em estudo avaliando a influência do garanhão e da monta natural, IA com sêmen diluído fresco ou resfriado nas taxas de recuperação de embriões e de prenhez, Fleury *et al.* (2001) não encontraram diferenças significativas entre os métodos citados. Entretanto, ao compararem 5 garanhões durante uma estação de monta, encontraram diferenças significativas na recuperação de embriões, com taxas variando entre 28 e 84%, contudo, as taxas de prenhez não diferiram estatisticamente, variando de 50 a 80%. De qualquer forma, conclui-se que devem ser dispensados cuidados especiais aos garanhões nos programas de TE, pois para a obtenção de taxas normais de recuperação de embriões é necessário que éguas férteis sejam inseminadas com sêmen de garanhões férteis com boa longevidade, permanecendo viável por cerca de 48 horas até a detecção da ovulação (RIERA, 2009).

Variações nas condições climáticas também devem ser levadas em consideração. As estações do ano costumavam ser bem definidas e hoje se pode observar alguns períodos de seca durante épocas chuvosas e até mesmo índices pluviométricos acima da média durante a estação de monta. Esses fatores, bem como períodos de seca prolongados, podem atrasar o início da temporada, influenciando as taxas de recuperação embrionária (GOMES; GOMES, 2008). Em estudo recente avaliando éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador, Nogueira *et al.* (2011) concluíram que as éguas têm um melhor aproveitamento reprodutivo no que diz respeito à recuperação embrionária quando são observadas temperaturas inferiores a 25°C, com taxas de 81,8% *versus* 52,8% em dias com temperaturas maiores que 25°C. Em relação à incidência de chuvas, pode-se concluir que dias chuvosos tendem a ser benéficos quanto à recuperação embrionária, com taxas de 65,5% *versus* 46,7% em dias não chuvosos.

Para Riera (2009), outros fatores também influenciam bastante a taxa de recuperação de embriões, como fatores ligados ao manejo geral dos animais, alimentação e condições sanitárias, além do manejo reprodutivo das doadoras e receptoras. É importante observar a técnica de lavagem, avaliando se o fluido não extravasa do útero para a vagina, se o balão não está sendo inflado demais, o que dificultaria a recuperação do embrião. Saber o dia exato da ovulação é importantíssimo para planejar o dia da lavagem, evitando o risco de o embrião ainda estar no oviduto ou estar muito grande, complicando sua manipulação.

6.3 Técnicas de Transferência de Embrião (TE)

A TE em equino pode ser realizada pela técnica cirúrgica, por incisão pelo flanco, ou pela técnica não cirúrgica por via cervical (LIRA *et al.*, 2009; RIERA, 2009). Em 1982, Squires *et al.* encontraram uma taxa de prenhez de 80% por transferência cirúrgica *versus* 46% por transferência não cirúrgica. Iuliano *et al.* (1985) também encontraram taxas de prenhez maiores em transferências pelo método cirúrgico (72%) e menores pelo método não cirúrgico (46%). Em contrapartida, Wilson *et al.* (1987) encontraram 77% de taxa de prenhez por transferência não cirúrgica. De qualquer forma, por sua simplicidade, a transferência transcervical se tornou o método mais usado de TE (HINRICHS, 1993).

O método cirúrgico é realizado por laparotomia pelo flanco, sob anestesia local, com a égua em estação, levemente sedada. A fossa paralombar deve ser tricotomizada e limpa para a cirurgia. Uma incisão vertical grande o bastante deve ser feita para permitir a retração do corno uterino, as camadas musculares são separadas e o peritônio perfurado, acessando o útero, perfurando sua superfície até chegar à luz uterina com a ajuda de um fórceps de íris, implantando o embrião e fechando as camadas musculares e pele (VANDERWALL, 2000). Se feita por um cirurgião experiente, ela é facilmente realizada, porém, requer mais tempo para ser feita, é mais cara, necessita instalações e recursos para sua realização, é mais trabalhosa e demanda cuidados pós-cirúrgicos para a receptora (RIERA, 2009).

Na última década, os resultados obtidos com a transferência não cirúrgica ultrapassaram as taxas do método cirúrgico. Os aspectos mais importantes da transferência não cirúrgica são a realização de uma técnica asséptica, com mínimo insulto a cérvix ao depositar o embrião na luz do útero de uma receptora adequada (HARTMAN, 2011). O embrião deve ser envasado em palheta plástica de 0,25 ml, 0,5 ml ou em uma pipeta de IA, dependendo do seu tamanho, em porções alternadas de solução de manutenção e ar. A primeira coluna é composta de solução, a segunda de ar, a terceira de solução com o embrião no centro, a quarta de ar e a quinta de solução. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta ou pipeta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003).

A TE não cirúrgica é normalmente realizada usando-se um aplicador de inseminação de aço reutilizável, um dispositivo de plástico para a pistola e acoplado a este uma pipeta ou palheta contendo o embrião, devendo-se preferencialmente colocar uma camisa sanitária plástica

estéril para cobrir os instrumentos. Prepara-se a receptora da mesma forma que a doadora é preparada para a coleta de embrião, sedando-a se necessário. O operador entra na vagina com uma luva estéril e os instrumentos, guiando-os para a cérvix. Antes de passar a cérvix, a camisa sanitária deve ser tracionada para trás. O embrião pode ser depositado no corpo uterino ou em algum dos cornos do útero, mas para isso deve ser guiado por palpação transretal (VANDERWALL, 2000). Deve-se sempre verificar a palheta ou pipeta após a transferência, verificando se o embrião não ficou retido na ponta do instrumento. Este problema pode ser minimizado com o uso de uma primeira coluna maior que empurre a coluna do embrião e também garantindo que o instrumento esteja livre dentro da luz do útero, e não contra a parede, ocluindo sua ponta (HARTMAN, 2011).

Segundo Squires (2003), a menos que o embrião transferido fosse extremamente pequeno ($< 150\mu\text{m}$), a maioria das éguas que estão prenhes apresentam uma vesícula visível aos 12 dias de gestação. Éguas nas quais a vesícula não aparece até o 14º ou 16º dia de gestação podem apresentar desenvolvimento embrionário lento e tem mais chance de sofrer perda embrionária precoce. O exame ultrassonográfico inicial permite ao criador decidir se quer realizar uma nova recuperação embrionária da doadora. Éguas que falham em emprenhar após uma TE geralmente são utilizadas uma segunda vez como receptoras, mas não uma terceira.

6.3.1 Escolha da melhor receptora para a transferência

A escolha da receptora no dia da TE possui influência direta sobre a taxa de prenhez (ALONSO, 2008). Além dos cuidados citados anteriormente em relação à sincronização de ambiente uterino entre as éguas, antes da realização da transferência, as possíveis receptoras devem ser palpadas e examinadas com auxílio de um ultrassom. A égua escolhida deve apresentar um bom tônus uterino e uma cérvix fechada, características que indicam uma circulação aceitável de progesterona. No exame ultrassonográfico, deve-se encontrar um corpo lúteo (CL) bem formado e, preferencialmente, algum desenvolvimento folicular, além de uma ecotextura do útero uniforme (HARTMAN, 2011). Apesar de se buscar um CL de qualidade, Arruda et al. (2001) demonstraram não haver diferença significativa na morfoecogenicidade dos CL, no tamanho destes, nem nos níveis circulantes de progesterona nas receptoras que se tornaram gestantes ou não até o 9º dia após as transferências.

Para Riera (2011), os registros das receptoras devem ser cuidadosamente revisados antes da transferência. É importante verificar se a égua já recebeu um embrião durante esta temporada e não emprenhou, ou estava prenhe e sofreu uma perda embrionária precoce. Sendo necessário avaliar algum sinal de anormalidade uterina, como presença de líquido ou alguma evidência de endometrite. Os achados encontrados devem ser todos anotados nos registros de cada égua, auxiliando escolhas futuras.

Como método de auxílio para escassez de receptoras, Souza (2006) demonstrou que a aplicação de hCG no dia 0 ou 1 pós ovulação aumentou o número de receptoras com útero tubular, ecogenicidade uterina homogênea e tônus uterino bom à excelente. É esta uma interessante ferramenta para melhorar a chance da receptora apresentar características desejáveis no dia da TE. O hCG apresenta um efeito luteotrófico, promovendo um aumento no número de células lúteas, o que resulta em uma maior secreção de progesterona pelo CL.

6.3.2 Manejo das receptoras após a transferência

Após a transferência, Hartman (2011) utiliza como medicação de rotina flunixin meglumine (500 mg intravenoso), hCG (3000 UI, intramuscular) e antibioticoterapia (sulfametoxazol e trimetoprim, 24 mg/ kg, BID), sendo esta última continuada até o primeiro diagnóstico de prenhez, normalmente realizado 4 dias após a TE. Em estudo avaliando o uso de anti-inflamatórios não esteroidais em éguas receptoras, Koblischke *et al.* (2010) concluíram que as taxas de prenhez em éguas tratadas são maiores do que naquelas não tratadas, o que pode contribuir para resultados excelentes em programas de TE. Logo, seu uso poderia se tornar um tratamento de rotina, especialmente quando embriões de grande valor são transferidos. Entretanto, no Brasil não é costume usar esses medicamentos após as transferências, sendo somente utilizada progesterona em casos específicos.

As receptoras transferidas devem passar a uma categoria especial dentro do sistema, na medida em que o programa e as instalações permitam, devem permanecer tranquilas, sem mudanças, até a data do primeiro controle pós TE. Visto que as transferências geralmente são realizadas no verão, as éguas devem receber água à vontade, boa alimentação e disponibilidade de sombra nos piquetes. Os controles ultrassonográficos devem ser realizados em datas fixas, evitando movimentos desnecessários de grupos de éguas, sendo sempre importante realizar

mudanças de grupos de pelo menos 3 animais já socialmente adaptados, evitando brigas e estresse (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Para Riera (2011), receptoras prenhes devem receber as melhores pastagens, especialmente do dia da transferência até o 40º de gestação, pois as taxas de prenhez podem ser afetadas dramaticamente se elas estiverem perdendo peso, mesmo quando em boa condição corporal. De acordo com Squires (2003), elas devem receber uma ração de manutenção similar a outras éguas durante os dois primeiros terços da gestação, e então, receber energia extra em forma de ração concentrada durante o último terço da gestação. Com a aproximação do parto, devem ser atentamente monitoradas e os procedimentos de manejo do parto e do neonato devem ser os mesmos usados para éguas “normais”. Segundo Hartman (2011), para melhorar os resultados de programas de TE, é importante tratar cada receptora como um indivíduo, ao contrário da mentalidade de rebanho.

6.3.3 Fatores que afetam as taxas de prenhez após a transferência

As taxas de prenhez após a TE são influenciadas pelas variáveis que envolvem os 3 principais componentes de uma transferência: a receptora, o embrião e o procedimento de transferência. São algumas delas o método de TE, o técnico que realizou o procedimento, tamanho, idade e morfologia dos embriões, procedimentos de cultura e armazenamento destes, estação do ano, sincronia entre doadora e receptora, idade e histórico reprodutivo das doadoras (CARNEVALE *et al.*, 2000). Muitos deles já foram explicados nos itens anteriores do trabalho.

Em relação aos materiais e meios utilizados, todos os utensílios devem ser estéreis e livres de resíduos tóxicos aos embriões. Apesar de muitos deles serem descartáveis, os reutilizáveis devem ser lavados com água destilada e esterilizados. Tubos, sondas, cateteres e filtros são normalmente esterilizados com óxido de etileno durante 24 horas. Entretanto, após a esterilização, deve-se permitir a ventilação destes, pois o óxido de etileno é tóxico a embriões e espermatozoides. Além disso, o embrião nunca deve ser exposto à luz do sol (RIERA, 2009). Qualquer desinfetante utilizado para lavagem de materiais pode ser potencialmente nocivo para o embrião. Por essa razão, Hartman (2011) utiliza os materiais apenas uma vez para TE, reutilizando-os somente para lavagens uterinas terapêuticas. Entretanto, apesar de mais seguro, os

custos envolvendo a compra de novos materiais podem ser altos, não sendo aplicável a nossa realidade.

De acordo com Riera (2009), as taxas de prenhez são normalmente maiores durante a primavera, provavelmente porque as melhores receptoras são usadas no início da temporada e a alimentação neste período é geralmente melhor. Além disso, o estresse causado pelo calor forte do verão pode afetar as taxas de prenhez. Durante o último terço da temporada a eficiência cai significativamente. Gomes e Gomes (2008) demonstraram taxas de lavados positivos superiores a 70% nos meses de setembro, outubro e novembro, corroborando com possíveis taxas de prenhez mais altas durante a primavera.

A eficiência de um programa de TE envolve questões de organização e logística, onde cada item necessário para a operação da técnica deve estar disponível no momento certo. O manejo de doadoras, receptoras e garanhões deve ser bem feito, evitando perdas desnecessárias no plantel devido a falta de cuidados essenciais, ligados ao bem estar básico destes animais. A disponibilidade de receptoras é um fator importantíssimo, que afetará as taxas de prenhez, assim como a fertilidade de éguas e garanhões (RIERA, 2009). Os custos envolvidos em um programa de TE são muito altos, e fortemente dependentes do número de receptoras alojadas em uma central. Por isso, os valores devem ser todos analisados, buscando sempre uma melhor relação custo benefício e com isso, uma maior eficiência do programa (PESSOA, 2012). Por último, a habilidade do técnico que realiza a TE é um fator chave para boas taxas de prenhez, pois não adianta a natureza realizar o seu papel e o homem estragar tudo.

7 EXPERIÊNCIA VIVENCIADA

No período de 15 de novembro até 15 de dezembro de 2011, foi acompanhada a rotina diária do Centro de Transferência Embrionária “La Grappa”, de ELLERSTINA S.A., situado em Casbas, na Argentina. Ellerstina é a organização de polo mais importante do mundo, liderada por Gonzalo Pieres, integrando todas as etapas desenvolvidas no âmbito deste esporte. Além do centro visitado, há outro centro situado em Los Cardales, Buenos Aires, chamado “La Zeta”.

O Centro “La Grappa” possui 2700 hectares, divididos em cerca de 75 piquetes. Há uma área destinada às doadoras, receptoras e embriões e outra, destinada às receptoras prenhes e potros. O estágio foi realizado na área de embriões, onde há um galpão dividido em dois, com um lado para doadoras e outro, para receptoras, apresentando 4 bretes de cada lado. Anexo ao galpão havia um local para coleta de sêmen, um laboratório para processamento de sêmen e embrião, outro laboratório para lavagem de materiais, um escritório e um depósito. Os piquetes dos garanhões e das doadoras eram localizados próximos a este galpão.

Cerca de 500 receptoras, em sua maioria do tipo crioula, eram alojadas no centro de TE, divididas em dois grupos: “Malón” e “Diário”. As éguas do grupo “Malón” eram aquelas que apresentavam um CL do ciclo anterior, ou uma onda folicular emergente, sem nenhum folículo dominante, sendo palpadas dia sim, dia não. Devido ao grande número de éguas, havia dois grupos “Malón”. Já as éguas do grupo “Diário” eram as que possuíam folículos dominantes, requerendo um melhor acompanhamento para determinar a ovulação com precisão, sendo então, palpadas diariamente. Por serem numerosas, as receptoras permaneciam em piquetes mais afastados, sendo trazidas em grupo por um funcionário a cavalo quando necessário. Sua identificação era realizada por meio de marcas de fogo e colares coloridos.

As atividades diárias começavam geralmente às 08h00min da manhã, com a revisão ultrassonográfica das doadoras, lavagens uterinas de éguas com fluido inflamatório, coleta e processamento de sêmen dos garanhões e IA das doadoras. No outro lado do galpão, ao mesmo tempo, as receptoras eram palpadas e, após isso, se necessário, as éguas transferidas eram revisadas por prenhez. A chamada Eco 1 era realizada uma semana após a transferência (gestação de 14- 16 dias), a Eco 2 era feita 15 dias após a 1ª (ao completar um mês de gestação). E por fim, a Eco 3 era realizada ao completar 2 meses de gestação, sendo as éguas do lote Eco 3

acompanhadas periodicamente até o último mês de gestação. Todas essas atividades eram realizadas pela parte da manhã. Durante a tarde, a partir das 14h00min, eram realizadas as lavagens uterinas para recuperação embrionária, o processamento de embriões, a revisão das receptoras sincronizadas e a TE.

No centro eram alojadas cerca de 100 doadoras, identificadas por colares com seus respectivos nomes e números. Cada égua possuía uma ficha, que era revisada no dia anterior, avaliando quais éguas deveriam ser palpadas no dia seguinte. Antes de entrar no brete, cada doadora era rufiada com um garanhão e seu comportamento (positivo, negativo, indiferente) anotado na ficha. As éguas entravam nos bretes, dispostos em duplas, para que nenhuma égua ficasse sozinha. Enquanto um dos veterinários revisava as éguas, outro ia anotando os achados e decidindo qual seria inseminada, com qual garanhão, se havia necessidade de lavagem uterina terapêutica e se alguma deveria receber hormônio ou outra medicação.

Após o término dos exames, os garanhões designados eram coletados. Enquanto um dos veterinários coletava sêmen, o outro realiza o tratamento das éguas com inflamação uterina, otimizando o tempo durante a manhã. Dos nove garanhões alojados na central, o mais utilizado era Sportivo, PSC nascido em 1993, considerado o melhor reprodutor de polo Argentino. As coletas de sêmen eram feitas em um local anexo ao galpão, com o auxílio de um manequim. O pênis do garanhão era lavado com água morna antes da coleta e bem seco. As vaginas artificiais modelo Missouri eram preparadas no laboratório de sêmen e entregues ao veterinário por uma janela ligada ao local de coleta. Os garanhões eram trazidos sempre pelo mesmo funcionário e geralmente montavam rapidamente no manequim. Após a ejaculação, o veterinário passava a vagina para o laboratório e o sêmen era processado na zona limpa deste (sala separada da montagem e recepção da vagina). Além da inseminação das éguas alojadas na central, o sêmen também era enviado refrigerado a outros centros de TE Argentinos.

As receptoras examinadas vinham em grandes lotes, sendo separadas em uma mangueira, onde se colocavam os buçais, sendo então levadas aos bretes. As éguas do “Malón” eram palpadas uma vez a cada dois dias, recebendo PGF2a se ainda apresentassem CL do ciclo anterior. Aquelas com folículo dominante maior que 30-35 mm eram incorporadas ao lote “Diário”. De acordo com a necessidade de éguas receptoras para cada doadora, era administrado hCG naquelas com folículo maior de 40 mm e com edema uterino II ou III, estimulando a

ovulação em até 48h. As receptoras ovuladas recebiam um colar amarelo e eram apartadas ao lote “amarelo” das éguas sincronizadas. As éguas sem colar eram as receptoras vazias.

A lavagem uterina para recuperação embrionária era normalmente realizada no 8º dia pós-ovulação e no 9º dia em éguas mais velhas. As éguas entravam em duplas nos bretes e raramente necessitavam sedação para a realização do procedimento. O veterinário palpava a égua, retirando as fezes acumuladas no reto, sendo então realizada a limpeza perineal, com água e sabão, secagem, limpeza da vulva com algodão úmido e nova secagem. O circuito da sonda, cateteres, filtro e 1L de ringer com lactato morno era preparado dentro do laboratório e levado para o brete somente após a égua estar pronta. O veterinário colocava uma luva de palpação esterilizada, retirava a sonda do pacote esterilizado e com a ajuda de um auxiliar, verificava se o balão da sonda não estava rompido. Introduzia então a mão na vagina da égua, direcionando a sonda à cérvix até chegar ao corpo do útero. O auxiliar inflava o balão com cerca 40 mL de ar. Após verificar que o balão estava bem inflado, o veterinário retirava a mão da vagina da doadora.

Após isso se abria o grampo do cateter conectado ao ringer, liberando a passagem do líquido até à sonda, deixando 1L de fluido entrar no útero. O veterinário colocava o braço no reto da égua, massageando o útero, para então liberar a saída de líquido, que passava pelo filtro. Como em sua maioria embriões de dia 8 são visíveis a olho nu, um auxiliar permanecia sentado, observando o filtro. Se nenhum embrião era visualizado, outro litro de ringer era acoplado ao sistema, até completar 3 ou 4L. As éguas mais importantes, e geralmente as mais difíceis de recuperar embriões, eram normalmente lavadas com 4L. Após isso, a região perineal da doadora era novamente lavada, o balão desinflado e a sonda retirada, sendo o circuito imediatamente levado para o laboratório. Todas as doadoras após a lavagem recebiam uma dose de PGF2a, para lise do CL, evitando a continuação de uma possível prenhez de embrião não recuperado e acelerando o ciclo para uma nova coleta de embrião.

O processamento de embriões era realizado dentro do laboratório, em uma câmara de fluxo laminar e temperatura controlada, por um veterinário vestido com jaleco, touca, máscara e luvas de plástico. A busca era realizada em uma lupa e quando encontrado o embrião este era lavado em quatro bolhas de líquido com diferentes percentagens de ringer e *holding*. A primeira gota apresentava 10 gotas de ringer e 3 gotas de *holding*, a segunda 7:5, a terceira 5:7 e a última, 3 gotas de ringer para 10 gotas de *holding*. Após isso, se colocava o embrião em uma placa apenas com *holding*, a espera da transferência. De acordo com o seu tamanho, os embriões eram

carregados em palhetas de 0,5mL ou em pipetas de IA, intercalando bolhas de ar e líquido, com uma camisa sanitária envolvendo os instrumentos. Até o momento da TE, as pistolas e pipetas eram colocadas em estufa.

Para a escolha das melhores receptoras para TE, as éguas sincronizadas com as doadoras de 0 a +3 dias eram palpadas. Geralmente havia três receptoras ou mais para cada doadora, sendo a escolha facilitada. Era avaliado o tônus uterino e de cérvix por palpação, e após isso, por ultrassonografia, o CL e a ecogenicidade do útero. Juntamente a essa avaliação, a ficha ginecológica da égua era utilizada, observando seu histórico de transferências, partos e resultados de biópsias endometriais. As receptoras consideradas ideais eram aquelas que apresentavam bom tônus uterino, cérvix bem fechada, com CL ecogênico e sem edema uterino. Além disso, os veterinários buscavam éguas que tivessem sido transferidas apenas algumas vezes, ou, de preferência, que nunca houvessem sido transferidas, tivessem parido pelo menos uma vez e possuíssem resultados de biópsias endometriais satisfatórios. Selecionando, finalmente, uma receptora para cada embrião.

As éguas escolhidas eram colocadas nos bretes e suas regiões perineais eram limpas como as das doadoras. O veterinário colocava uma luva de palpação estéril, buscava a pistola de TE correspondente no laboratório e fazia a transferência, sempre colocando o embrião em algum dos cornos uterinos, nunca no corpo. Se houvesse qualquer resistência na passagem da palheta ou pipeta pela cérvix, ou se o veterinário sentisse os instrumentos rasparem a parede uterina, uma dose de flunixin meglumine era administrada na receptora. As éguas recém transferidas recebiam um colar azul e eram encaminhadas ao grupo correspondente. Após a revisão de prenhez, se a Eco 1 fosse positiva, as gestantes recebiam um colar vermelho, sendo incorporadas ao seu lote respectivo, assim como as éguas Eco 2 e 3.

Durante o mês estagiando no centro, foram acompanhadas 117 lavagens uterinas de 78 éguas, com 80 embriões recuperados no total, perfazendo uma taxa de 68,37% de recuperação embrionária. Como as transferências não eram realizadas aos domingos, foram 27 dias de lavados, com uma média de 4,33 lavados e 2,96 embriões recuperados por dia. No período acompanhado, presenciou-se até três lavados da mesma égua, com um intervalo de 15 dias entre eles. Em dez lavados recuperaram-se 2 embriões, e em um lavado, 3 embriões. A égua da tripla ovulação foi uma das dez que ovularam duplo, mostrando que certas éguas apresentam uma maior tendência para múltiplas ovulações, aumentando as taxas de recuperação embrionária de

programas de TE. Os três embriões transferidos resultaram em prenhez nas Ecos 1 e 2, entretanto, dois deles abortaram entre a Eco 2 e a 3.

Das 78 éguas acompanhadas, treze possuíam mais de 15 anos, sendo classificadas como velhas. Vinte e duas éguas possuíam entre 6 e 14 anos, sendo classificadas como jovens. As demais 43 éguas eram consideradas potrancas, com idades variando entre 3 e 5 anos. Dos 80 embriões recuperados, catorze foram lavados das éguas velhas, 26 das éguas jovens e 40 das potrancas. As percentagens de lavados e embriões por categoria estão demonstradas na Tabela 4, podendo-se observar que as categorias com maior taxa de recuperação embrionária são as éguas jovens e as velhas, entretanto, estas perfazem menos de 50% do número total de doadoras.

Tabela 4 — Percentagem de lavados e embriões recuperados por categoria de éguas

Categoria	Número de éguas (%)	Número de lavados (%)	Número de Embriões (%)	Taxa de recuperação embrionária
Potrancas	43 (55%)	65 (56%)	40 (50%)	61,5%
Jovens	22 (28%)	33 (28%)	26 (32%)	79%
Velhas	13 (17%)	19 (16%)	14 (18%)	74%
Total	78 (100%)	117 (100%)	80 (100%)	68,37%

Em 32 dos 80 lavados positivos foi utilizado apenas 1L de ringer com lactato para recuperar os embriões, perfazendo 40% do total. Sete destas éguas eram velhas, sendo isso possível devido ao fato da maioria das éguas de polo nunca terem gestado, possuindo um útero pequeno mesmo com a idade avançada. Para a recuperação de 22 destes embriões, foram utilizados 3L (27,5%). Em 14 lavados utilizaram-se 2L (17,5%). Em 8 éguas, 5 potrancas e 3 jovens, apenas 0,5L de ringer foi preciso para recuperar o embrião, demonstrando que éguas mais novas possuem um útero bastante diminuto. E finalmente, para 4 éguas foram necessários 4L de ringer para recuperar o embrião, sendo que 3 destas eram velhas.

Os 80 embriões foram recuperados em uma média de 10min e 25 seg. O mais rápido deles demorou 2min para ser coletado e o mais demorado 25 min, sendo, obviamente, um lavado de 4L. Apesar da alta taxa de recuperação do mês acompanhado (68,37%), as taxas de prenhez mais avançadas não foram tão altas. Na Eco 1, 62 receptoras foram diagnosticadas prenhes, o que representa uma taxa de prenhez de 77,5%. Na Eco 2, 60 receptoras ainda gestavam. Infelizmente, na Eco 3, com 2 meses de gestação, apenas 33 éguas permaneciam prenhes, o que representa uma taxa de prenhez de 41,25% se considerarmos os 80 embriões transferidos no período.

É importante citar que cerca de 20 éguas jogadoras de polo chegaram ao centro logo após a final do *Campeonato Argentino Abierto de Polo*, no final da primeira quinzena de dezembro. Ao chegarem, foram imediatamente examinadas para começarem a rotina de lavados para recuperação embrionária que segue até o mês de fevereiro. As melhores receptoras, paridas e com biópsias uterinas grau I, das quais se espera uma melhor taxa de prenhez, eram reservadas para receberem os embriões destas jogadoras.

O “La Grappa” é um grande centro de TE da Argentina, tendo realizado cerca de 850 lavados e recuperado quase 500 embriões entre 2010/2011. A temporada de transferências começa em setembro e geralmente vai até o fim de abril ou início de maio, sendo a maioria dos embriões recuperados entre os meses de novembro e fevereiro. A equipe de veterinários é composta por quatro profissionais. Dois deles trabalham com a revisão das doadoras e a realização das recuperações e transferências embrionárias. Um trabalha somente com a revisão das receptoras e outro na parte de manipulação de sêmen e embriões no laboratório. O centro é extremamente organizado, sendo todos os dados computados diariamente após a realização das transferências. Com o grande número de receptoras que possui, a chance de um ambiente uterino adequado para o embrião aumenta, incrementando as taxas de prenhez. Contudo, esse resultado só é alcançado devido ao enorme trabalho realizado, com uma seleção exaustiva das melhores receptoras e um cuidado diferenciado das mesmas.

8 CONCLUSÃO

A TE é cada vez mais utilizada na indústria equina. No Rio Grande do Sul as expectativas são grandes após a liberação de seu uso pela ABCCC. A técnica evoluiu muito desde a década de 70, podendo evoluir ainda mais nos próximos anos, principalmente se um protocolo eficiente para superovulação de éguas for criado e se a refrigeração e criopreservação de embriões forem mais utilizadas. Os procedimentos de recuperação e de transferência embrionária são relativamente simples e quando realizados de maneira correta, ótimas taxas de recuperação de embriões e prenhez são atingidas.

A égua receptora, após anos de negligência, é hoje reconhecida como um dos pontos chave para o sucesso de uma TE. Uma boa seleção, respeitando idade, tamanho, estado corporal, reprodutivo e sanitário, e um manejo diário sem estresse, com qualidade nutricional, refletem diretamente em bons índices de prenhez. Mesmo com dificuldades em adquirir receptoras a um preço acessível, os critérios básicos de seleção devem ser atendidos. A sincronização entre doadoras e receptoras é a atividade que consome mais tempo em um programa de TE, logo, deve ser muito bem feita, pois erros na determinação do momento da ovulação prejudicariam muito o resultado do procedimento.

Os fatores que mais influenciam a taxa de recuperação embrionária são o dia da coleta, com a obtenção dos melhores resultados no 7º e 8º dia após a ovulação, a qualidade do garanhão, sendo de extrema importância o conhecimento da capacidade reprodutiva deste, a eficiência do técnico e as características uterinas e a idade da própria doadora. Já os fatores que mais afetam a taxa de prenhez são aqueles relacionados ao método de transferência, as características dos embriões, como tamanho, idade e morfologia destes, a sincronização de ambiente uterino entre doadora e receptora, e, novamente, a eficiência do técnico.

O período de estágio foi importantíssimo para vivenciar a aplicação prática da técnica em um grande centro de TE, que recupera quase 500 embriões por ano. Com a rotina e a repetição do acompanhamento de numerosos lavados, aprenderam-se detalhes dos procedimentos e fatores que fazem a diferença nas taxas de recuperação e prenhez, como os cuidados com a manipulação dos embriões e a seleção minuciosa das melhores receptoras para a TE. O fato de a central possuir, em média, três receptoras sincronizadas para cada doadora aumenta

consideravelmente as chances do embrião encontrar um ambiente uterino adequado, contribuindo imensamente para o êxito do programa.

O Brasil, mesmo sendo o maior produtor de embriões do mundo, tem muito a aprender com as grandes centrais de TE de cavalos de polo da Argentina, pois estas conseguem produzir uma quantidade enorme de embriões a cada temporada. O fato das éguas da raça Polo Argentino terem origem em éguas PSC faz com que o índice de múltiplas ovulações seja maior, o que incrementa as taxas de recuperação embrionária. Entretanto, não é só esse o fator de êxito dos programas. A organização e o sistema de manejo e seleção utilizado pelos grandes centros argentinos é um diferencial importante que aumenta cada vez mais o sucesso da TE, e que pode e deve ser usado como exemplo para os centros brasileiros.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT DE DAVID, F. F. *et al.* . Artificial photoperiod: it's influence on mare's autumn transition period and seasonal anestrus. **Pferdeheilkunde**, Stuttgart, v. 27, n.3, p. 277-280, 2011.
- ALLEN W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 40, n. 4, p. 310-329, Aug. 2005.
- ALLEN, W. R. *et al.* Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **Reproduction**, 2002; 123; p. 445-53.
- ALONSO, M. A., **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião.** 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Botucatu, 2007.
- ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, p. s207- s214, 2008. Suplemento 2.
- ALONSO, M. A. *et al.* Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 204, 2005. Suplemento 1.
- ALONSO, M. A.; FLEURY, P. D. C.; ALVARENGA, M. A. Efeito da frequência do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária equina na indução de múltiplas ovulações em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 532, 2006. Suplemento 1.
- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Superovulation in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, Stuttgart, v. 24, n. 1, p. 88-91, Jan./Feb. 2008.
- ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, p. s319-s333, 2010. Suplemento 1.
- ARRUDA R. P. *et al.* Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 233-239. 2001.
- BIGGERS, J. D. Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. **Journal of Reproductive and Fertility**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 173-186, Sept. 1991.
- BRADECAMP, E. A., Synchronization of ovulation. In: MCKINNON, A.O. *et al.* (Ed.). **Equine reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011. v.2, cap. 197, p. 1870-1878.
- CAIADO, J.R.C. *et al.* Tratamento de éguas da raça Mangalarga Marchador com progesterona (p4) ou altrenogest visando sua utilização como receptoras de embriões no segundo dia após ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 180, 2005. Suplemento 1.

CAMARGO, C.E. **Fatores reprodutivos que interferem em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo.** 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARD, C. Hormone therapy in the mare. In: SAMPER, J. C. (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination.** Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. cap. 9, p. 89–97.

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

CARMO, M. T. *et al.* Efeito da superovulação com o extrato de pituitária eqüina no transporte de oócitos para o oviduto de éguas (resultados parciais). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 179, 2005. Suplemento 1.

CARNEVALE, E. M. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, n. 6, p. 965-979, Oct. 2000.

CARNEY, N. J. *et al.* Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 36, n. 1, p. 23-31, July, 1991.

DAVIES MOREL, M.C.G. Selection of the mare and stallion for breeding. In: _____. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management.** Wallingford, CAB International, 2003. cap.12, p. 105-130.

FARIA, D. R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada a ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 114-122, abr./ jun. 2010.

FLEURY, J. J. *et al.* Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; BALIEIRO, J. C. C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18. Araxá, 2006. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 502, 2006. Suplemento 1.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 19, n. 4, p. 603-611, Apr. 1983.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare.** 2nd ed. Ann Arbor: McNaughton and Gunn, 1992.

GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M. Fatores que influenciam a produção de embriões em éguas doadoras. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, p. 199-206. Suplemento 2.

- HARTMAN, D.L. Embryo Transfer. In: McKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011. v. 2, cap. 303, p. 2871-2879.
- HINRICHS, K. A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 33, n. 5, p. 937-942, May 1990.
- HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 227-240, Oct. 1993.
- HINRICHS, K.; CHOI, Y.H. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**. New York, v. 4, n. 3, p. 210–218, Sept. 2005.
- HUDSON, J. J.; MCCUE, P. M. How to increase embryo recovery rates and transfer success. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF THE EQUINE PRACTITIONERS, 50., 2004, Denver. **Proceedings...**, Denver: AAEP, 2004. p. 406–408.
- HURTGEN J. P. Management of embryo donor mares with chronic infertility. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF THE EQUINE PRACTITIONERS, 54., 2008, San Diego. **Proceedings...**, San Diego: AAEP, 2008. p. 414-417.
- STROUD, B. **IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report**: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. [Denver]: IETS, 2011. 13 p. Disponível em: <<http://www.iets.org/pdf/December2011.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2012.
- IULIANO, 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**, Champaign, v. 60, n. 1, p. 258-263, Jan. 1985.
- JACOB J. C. F. *et al.* Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 6, p. 1159-1166, Apr. 2012.
- JACOB, J.C.F. *et al.* The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n.1, p. 545, Apr. 2002.
- KENNEY R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, n. 3, p. 241–262, Feb. 1978.
- KOBLISCHKE, P. *et al.* Practical experience with the treatment of recipient mares with a non-steroidal anti-inflammatory drug in an equine embryo transfer programme. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 6, p. 1039–1041, Dec. 2010.
- KOLLING M., ALLEN W.R. Ovulation induction for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue. In: INTERNATIONAL EQUINE GAMETES GROUP WORKSHOP, 2. Kuhlungsborn, Germany, 2005. **Proceedings**. (Expanded abstract). Disponível em:

<<http://www.betpharm.com/doc/Kolling & Allen 2005 DES ET ABSTRACT.pdf>>. Acesso em: 1 maio 2012.

LEY, W. B. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**: São Paulo: Roca, 2006. Seção 12, p. 184.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X. ; SILVA, A. R. . Transferência de embrião em equinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 3, n. 4, p. 132-140, 2009.

LOSINNO, L.; AGUILAR, J. J.; LISA, H. The impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRO TRANSFER; 5., 2000, Saari. **Proceedings...**Saari: Havemeyer Foundation; 2000. p. 81. (Monograph Series n.3).

LOSINNO, L.; ALONSO, C.; CASTANEIRA, C. Escore na biópsia endometrial e aptidão reprodutiva em éguas receptoras de embrião - resultados parciais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33; n. 1, p. 201, 2005.

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2006, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 39-49, 2006.

MCCUE, P.M.; LEBLANC, M.M., SQUIRES, E.L. eFSH in clinical equine practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, n. 3, p. 429-433, Aug. 2007.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A. O. (Ed.). **Current therapy in equine reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. cap. 51, p. 319-334.

MEYERS-BROWN, G.A. *et al.* Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH): Ovulation rates, embryo retrieval and hormone profiles. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 30, n. 10, p. 560-568, Oct. 2010.

NISWENDER, K. D. *et al.* Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 23, n. 11, p. 497-500, 2003.

NOGUEIRA, I. V. *et al.* Influência do clima na recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador no município de Vassouras- RJ. **Revista de Saúde**, Vassouras, v. 2, n. 1, p. 27-34, jan./jun., 2011.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 41, n. 2, p. 313-320, Dec. 1974.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non surgical recovery os equine eggs, and an attempt at non surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, n. 2, p. 187-195, Nov. 1972.

PERES, C.F., ALVARENGA, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F. Effect of eFSH on ovarian cyclicity and embryo production of mares in spring transitional phase. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 176-180, 2007.

PESSOA, M.A. Custos envolvidos em central de reprodução equina (central de TE). In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 13., 2012, Campinas: ABRAVEQ, 2012. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, São Paulo, v. 41, p. 99-102, 2012.

RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 23, n. 3, p. 189-192, May, 1991.

RIERA F.L. General techniques and organization of large commercial embryo transfer programs. **Clinical Theriogenology**, Philadelphia, v. 3, p. 318-324, 2011.

RIERA F.L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p. 185-199.

SCOGGIN, C. F. *et al.* Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 1, p. 151-164, July, 2002.

SILVA, L.A. **Técnica ultrassonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões em equinos**. 2003. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,. 2003.

SOUZA, F.A.C.S. **Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga 2006.

SQUIRES, E. L. Management of the embryo donor and recipient mare. In: ROBINSON, N. E. (Ed.). **Current therapy in equine medicine 5**. Philadelphia: Saunders, 2003: p. 277-279.

SQUIRES, E. L. *et al.* Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer programme. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 32, p. 409-414, 1982. Suplemento.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 1-2, p. 1-8, May, 2007..

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 1, p. 91-104, Jan. 1999.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 38, n. 5, p. 467-78, Sept. 2006.

SUMMERS P. M. *et al.* Successful transfer of the embryos of Przewalski's horses (*Equus przewalskii*) and Grant's zebra (*E. burchelli*) to domestic mares (*E. caballus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 80, n. 1, p. 13-20, May, 1987.

VANDERWALL D. K.; WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2007, p. 211-219.

VANDERWALL D. K. Current equine embryo transfer techniques. In: BALL, B. A. (Ed.) **Recent advances in equine theriogenology**, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: < <http://www.ivis.org> >. Acesso em: 11 abr. 2012.

VANDERWALL, D.K. Embryo collection, storage and transfer. In: RONBINSON, N. E. (Ed.). **Current therapy in equine medicine 5**. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 280-285.

WILSHER S., ALLEN W. R. The influence of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 4, p. 833-835, Aug. 2002.

WILSHER S.; KÖLLING, M.; ALLEN, W. R. The use of meclofenamic acid to extend donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. In: ALM, H.; TORNER, H.; WADE, J. F. (Ed.). **Proceedings of a workshop: international equine gamete group**. Kuhlungsborn: Havemeyer Foundation, 2005, p. 56 – 57.

WILSHER, S.; CLUTTON-BROCK, A.; ALLEN, W. R. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 3, p. 575-585, Mar. 2010.

WILSON, J. M. *et al.* Successful non-surgical transfer of equine embryos to post-partum mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 27, n. 1, p. 295.

ZERLOTTI, M. Como selecionar e preparar éguas receptoras para a transferência de embriões. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 13., 2012, Campinas. **Anais da Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, Campinas, v. 41, p. 68- 71, 2012.