

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NILMARA LEAL DE SOUSA

**EFEITO DO DIA DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO NA TAXA DE  
PRENHEZ EM ÉGUAS**

SÃO LUÍS - MA  
2016

NILMARA LEAL DE SOUSA

**EFEITO DO DIA DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO NA TAXA DE  
PRENHEZ EM ÉGUAS**

Monografia apresentada ao Curso de  
Medicina Veterinária da Universidade  
Estadual do Maranhão para o grau de  
Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior

Co-orientadora: Msc. Naia de Britto e Alves

SÃO LUÍS - MA  
2016

NILMARA LEAL DE SOUSA

**EFEITO DO DIA DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO NA TAXA DE  
PRENHEZ EM ÉGUAS**

Monografia apresentada ao Curso de  
Medicina Veterinária da Universidade  
Estadual do Maranhão para o grau de  
Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior  
Orientador

---

Ricardo de Macedo Chaves  
1º Examinador

---

Msc. Naia de Britto e Alves  
2º Examinador

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, foi meu alicerce por todos esses anos de graduação, me dando subsídio para realizar mais um sonho, sem vocês nada seria possível, eu amo todos vocês.

Ao meu namorado e à sua família pelo carinho com minha pessoa.

Ao meus amigos e amigas pelo convívio e emoções vividas.

Aos meus orientadores, por permitirem a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Maranhão e o corpo docente do curso de Medicina Veterinária, pelos conhecimentos prestados durante a graduação.

## DEDICATÓRIA

À minha família por compartilharem esse sonho comigo, e sempre incentivarem alcançar meus objetivos..

## RESUMO

A transferência de embriões na espécie equina é uma importante biotecnologia para o melhoramento genético de raças, vários fatores podem influenciar os resultados obtidos pelos técnicos que trabalham com reprodução equina. O presente trabalho buscou avaliar melhor dia para a transferência do embrião, avaliando o estágio de desenvolvimento embrionário e a qualidade do embrião. Foi possível obter uma taxa de recuperação embrionária de 56,06% dos lavados realizados, taxa esta que foi semelhante para embriões coletados com idade de D7, D8 e D9. Não foi encontrada diferença significativa do dia de coleta em relação ao estágio e qualidade dos embriões, tão pouco da idade destes em relação á taxa de prenhez após a transferência.

Palavras chave: coleta embrionária, biotecnologia, equino

## **ABSTRACT**

The embryo transfer in equine species is an important biotechnology for genetic gain, and several factors may influence the results obtained by technicians working with equine reproduction. The present study's aim was to evaluate the best day to the embryo transfer, based on synchronization between donor and recipient, evaluating embryonic development stadium and quality at the embryo. It was possible to get a rate of 56.06% collected embryos, this rate was similar to embryos collected at D7, D8 and D9. There was no significant difference to collection day in relation the stadium and quality of the embryos, and neither to the pregnancy rate after the transfer.

Key words: embryo collection, biotechnology, equine

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	02
2.1 Ciclo estral	02
2.2 Dinâmica Folicular	03
2.3 Sincronização entre doadora e receptora	05
2.4 Colheita e transferência de embrião	07
2.5 Classificação embrionária	09
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	11
3.1 Local de experimentação	11
3.2 Animais	11
3.3 Sincronização de ciclo estral	11
3.4 Ultrassonografia	11
3.5 Colheita de embrião	12
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	13
<b>5. CONCLUSÃO</b>	15
<b>6.REFERÊNCIAS</b>	16

## 1. INTRODUÇÃO

A transferência de embrião na espécie equina é uma biotécnica de suma importância para a indústria do cavalo. A versatilidade desta espécie é o principal fator responsável pelo crescimento mundial da equideocultura, esta biotecnologia possibilita o maior desenvolvimento do setor agropecuário através do ganho na eficiência reprodutiva e no incremento do melhoramento genético, favorecendo o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. Numerosos estudos possibilitaram o avanço desta ferramenta nas últimas décadas (LIRA et al., 2009).

Esta técnica permite obter múltiplos potros por ano, inclusive de éguas geneticamente valiosas, subférteis, idosas, que não consigam manter uma gestação ou de animais em competição sem que necessitem de interromper a sua carreira desportiva (CARVALHO, 2012).

É uma biotécnica baseada no princípio da multiplicação da progênie de fêmeas consideradas superiores dentro de um rebanho. Fundamenta-se na obtenção de embriões de uma fêmea doadora para em seguida transferi-los para fêmeas receptoras, com a finalidade de completar o período de gestação. Avaliando a importância do melhoramento genético do rebanho é uma das técnicas mais acessíveis, e proporciona o melhor aproveitamento de uma doadora, multiplicando seu material genético (BORTOT, 2013).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do dia da transferência de embrião na taxa de prenhez em éguas, com base na sincronização entre doadora e receptora. Bem como avaliar a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ciclo estral

As éguas são animais classificados como poliéstricos estacionais, pois possuem sua estação reprodutiva na primavera e no verão. Três são os fatores básicos, que explicam o caráter estacional dos ciclos estrais nas éguas: nutrição, temperatura e fotoperíodo (ARRUDA et al., 2001). O ciclo estral da égua é caracterizado como poliéstrico estacional de dias longos, representando os meses de outubro a março no hemisfério Sul, e podem variar de fêmea para fêmea (YOUNGQUIST, 1997; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Estes animais apresentam uma ciclicidade de aproximadamente 21 dias, porém podem variar de animal para animal e entre ciclos durante o mesmo ano (ALEXANDER; IRVINE, 1997). Porém, a fêmea da espécie equina é a que apresenta maior variabilidade quanto ao cio entre os animais domésticos, tendo casos de animais verdadeiramente poliéstricas, podendo ficar prenhas durante o ano todo (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

É uma sequência de alterações anatômicas e endócrinas que preparam a fêmea para a ovulação (SAMPER, 2008; FERREIRA, 2009). Na égua, o ciclo estral pode ser dividido em estro (fase folicular) e diestro (fase luteal). A fase folicular dura em média sete dias e a fase luteal em média 15 dias. Durante o estro a égua é sexualmente receptiva ao garanhão. Neste período, o folículo dominante se desenvolve e secreta estrógeno, que induz o comportamento de estro. A ovulação geralmente ocorre 24 a 48 horas antes do final da receptividade sexual (LAGE, 2007).

O proestro é o período em que ocorre a maturação de um ou mais folículos, sob a influência do FSH. O folículo começa a secretar estrógeno, que influencia os órgãos genitais. Os níveis crescentes de estrógenos suprimem níveis de progesterona em declínio. Essa fase de maturação folicular na égua, dura de dois a seis dias. A atividade ovariana e o crescimento folicular ocorrem em resposta ao aumento da duração da luz do dia (GOMES, 2003).

O estro é o momento em que ocorre a ovulação e no qual a égua está receptiva sexualmente. Os folículos secretam grande quantidade de estrógenos, responsáveis pelo surgimento do cio, essa elevada secreção de estrógenos pelos folículos pré-ovulatórios, é responsável pela estimulação do crescimento uterino, através da interação do hormônio com receptores e aumento de processos sintéticos celulares, causando o conhecido edema uterino. Nas éguas, o cio tem duração de cinco a sete dias, a ovulação se dá geralmente no terço final do cio (SAMPER, 2008). Este período é marcado pela receptividade sexual bem característica, mas em algumas éguas, só é perceptível por acompanhamento folicular, através de exame ultrassonográfico, uma vez que as manifestações psíquicas não são demonstradas, denominada de cio silencioso (ROMANO et al., 1998).

O metaestro é um estágio de transição no qual o estrógeno em declínio é contrabalanceado pela P4 em elevação. Após a ovulação ocorre formação de corpo lúteo, que se desenvolve em três ou quatro dias formando uma glândula hormonal. No caso de fecundação e desenvolvimento do embrião, o corpo lúteo é mantido por período mais longo. Quando não ocorre a fecundação, ocorre a luteólise (LAGE, 2007).

O diestro é o período de secreção da P4 pelo corpo lúteo, a fecundação dos ovócitos e a subsequente gestação resultam no prolongamento do diestro. A duração do diestro varia entre as espécies, nos equinos dura, em média, cinco a seis dias (SAMPER, 2008).

## 2.2 Dinâmica folicular

As espécies monovulatórias, como bovinos e equinos, geralmente apresentam uma ou duas ondas foliculares durante os 19-22 dias do ciclo estral. A definição de onda folicular se aplica a um conjunto de folículos que inicialmente exhibe crescimento sincronizado, sucedido pelo crescimento preferencial de apenas um, ou ocasionalmente dois folículos (GINTHER, 1992).

Seleção é um termo geralmente utilizado em espécies monovulvatórias para indicar que, usualmente, somente um folículo da onda folicular chega ao estágio de dominância e adquire a capacidade de ovular (GINTHER, 1993).

O estímulo necessário para o recrutamento folicular, ou seja, para a continuidade do crescimento folicular depende de uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH (GINTHER, 2000).

Ainda conforme o autor anterior, o maior folículo emerge, em média, um dia antes do segundo maior folículo. As concentrações de FSH que estimulam a emergência da onda folicular iniciam seu declínio quando os folículos atingem um diâmetro de aproximadamente de 13mm. Neste momento, os dois maiores folículos crescem paralelamente (fase paralela). Ambos os folículos secretam inibina causando o contínuo declínio das concentrações de FSH, as quais são requeridas por eles para o seu crescimento. Quando o maior folículo atinge 22,5mm de diâmetro, a fase de crescimento paralelo finaliza-se e inicia-se a fase de divergência folicular. A divergência é caracterizada pela contínua taxa de crescimento do maior folículo (ou folículo dominante) e diminuição da taxa de crescimento do menor folículo (ou folículo subordinado).

Possivelmente, durante este recrutamento, o futuro folículo dominante, diferencia-se dos demais folículos e adquire a capacidade de refratariedade aos níveis decrescentes de FSH, desencadeados por ele próprio e por supressores do desenvolvimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994). Este decréscimo das concentrações de FSH, usualmente, ocorre quando o maior folículo atinge um decisivo diâmetro (aproximadamente 22mm) (GASTAL et al., 1997). O futuro folículo dominante é apto a utilizar baixas concentrações de FSH para o seu crescimento e desenvolvimento, devido a um aumento da expressão dos receptores de FSH (WEBB et al., 1999).

O nível circulatório de LH tem se mostrado aumentado durante o momento de divergência folicular (GASTAL et al., 1997). Em um estudo subsequente, demonstraram um aumento transitório na concentração de LH durante a emergência da onda folicular e um constante aumento na proporção de LH: FSH (GASTAL et al., 2000).

De acordo com WEBB e colaboradores. (1999), após ocorrer a divergência e seleção do folículo dominante, os folículos restantes ou subordinados sofrem atresia. Aproximadamente 99% de todos os folículos, em espécies monovulatórias, sofrem atresia, conseqüentemente, somente alguns folículos derivados de uma enorme população de células primordiais, chegam a ovulação. A atresia é geralmente considerada um processo irreversível, que ocorre por morte celular ou apoptose.

Em muitas espécies, a ovulação ocorre sobre o pico de LH. Em éguas, a ovulação ocorre após uma constante e lenta elevação na concentração circulatória de LH (GINTHER, 1987). Sob um certo limiar no estímulo de LH, o folículo rompe-se e o oócito é expelido. Adotando um caminho para a fossa de ovulação, o oócito é recolhido pela fímbria e liberado no infundíbulo do oviduto até ocorrer a fecundação. Ocorre, inicialmente, uma hemorragia após a ruptura do folículo, para a formação do corpo hemorrágico. As células da granulosa e da teca, sofrem luteinização para formar o corpo lúteo. A partir deste momento, inicia-se a fase luteal (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

### 2.3 Sincronização entre doadoras e receptoras

A sincronização do cio entre doadoras e receptoras é condição importante para o sucesso de um programa de transferência de embriões na espécie equina (SQUIRES et al., 1998). PASHEN e colaboradores. (1993) utilizaram a aplicação de uma única dose de prostaglandina F2 alfa, durante o diestro de doadoras e receptoras, para obter a sincronização da luteólise. ALVARENGA e colaboradores. (1993) obtiveram a luteólise por meio da aplicação de microdose de prostaglandina, no ponto apropriado de acupuntura, localizado no espaço lombo sacral.

Entre as espécies de animais de grande porte, a equina é, talvez, a menos rigorosa em suas exigências para sincronização da ovulação entre doadora e receptora no momento da TE (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 é a atividade que consome mais tempo numa central de reprodução equina (RIERA, 2011). Éguas doadoras em estro devem ser ultrassonograficamente examinadas uma vez ao dia assim que o folículo dominante for identificado, sendo essa prática essencial para decidir a hora da inseminação artificial (IA) e para determinar o dia da ovulação, designado como D0 (RIERA, 2009).

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 o embrião 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 et al., 2005).

Estudos mais recentes têm demonstrado que o sincronismo entre as éguas doadoras e receptoras de embriões é fundamental para o sucesso da transferência de embriões, constatando que os melhores índices de gestações para as éguas receptoras são os sincronismos entre -3 e +1 em relação às éguas doadoras - sincronismo "0", é o dia da ovulação (McKINNON et al., 1988b).

Carnevale e colaboradores (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 o tônus uterino reduzido pode indicar ambiente uterino não completamente adequado para o desenvolvimento do embrião. Fleury e colaboradores (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) 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.

#### 2.4 Colheita e transferência de embrião

A transferência de embriões é uma das biotecnologias aplicadas para a maioria das espécies domésticas com o objetivo principal de aumentar o número de produtos nascidos com uma genética superior. Denomina-se transferência de embriões a técnica pela qual, os embriões são colhidos de um animal e transferidos para outro onde ocorrerá a gestação por completo (LENZI, 2008).

Embriões equinos caem da tuba uterina para o útero entre os dias 5 e 6 pós ovulação, os quais normalmente estão na fase de mórula compacta para desenvolvimento inicial de blastocisto, embriões equinos degenerados são comumente retidos na tuba uterina. Após entrar no lúmen uterino, o tamanho do embrião aumenta dramaticamente, desenvolvendo-se para blastocisto expandido. Embora embriões possam ser recuperados nos dias 6 a 9, o período ideal para sua colheita é nos dias 7 ou 8 após a fecundação. A indicação primária para recuperação embrionária no dia 6 é para o congelamento. Embriões não são rotineiramente colhidos no dia 9, porque o sucesso destes nas taxas de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando da recuperação entre os dias 7 ou 8 (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

Dois métodos para colheita de embriões são descritos para éguas: o cirúrgico e o não cirúrgico, utilizando cateteres de uma ou duas vias, com sistemas aberto ou fechado (JAINUDEEN et al., 2004).

A recuperação não cirúrgica de embriões feita por meio de lavagens uterinas em um sistema fechado, com um tipo especial de sonda (BIVONA Inc. Gary. Indiana. USA) apropriada para utilização em éguas, adaptada a uma extensão de silicone, unida a um filtro para coleta de embrião (75 micras), tem sido utilizado por vários pesquisadores, esta técnica permanece praticamente inalterada nas duas últimas décadas (SQUIRES et al., 2003).

A colheita de embrião é executada utilizando-se a lavagem uterina transcervical. Atualmente, usa-se um cateter de silicone com balão (VEUF-80, Bivona, Inc., Gary, IN 46406) com diâmetro de 8,0 mm; porém, outros estilos de cateter estão disponíveis. Uma vez o cateter inserido no corpo do útero, o órgão é lavado três ou quatro vezes com solução salina acrescida com fosfato puro modificado (DPBS), previamente aquecida (30 - 35° C), contendo 1% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml - Vanderwall, 2000). Outra opção para o lavado uterino tem sido o uso de Ringer Lactato, obtendo taxas de prenhez de 64% quando comparadas a 57% obtido pelo DPBS em embriões coletados por estas soluções, conforme Alvarenga e colaboradores., (1992). Atualmente, o Ringer com lactato é a solução de lavado mais utilizada no Brasil.

O útero é infundido com 1 ou 2 litros em cada lavado, realizando-se este procedimento em média 3 vezes. Então, 3 a 6 litros são usados durante todo o processo de recuperação (DAELS, 2007), o qual dependerá do tamanho do útero da égua doadora. A sonda ou cateter é acoplada ao circuito e, esse sistema montado, poderá ter o fluxo de recuperação constante, sendo o fluido recuperado em grandes recipientes, ou ter o fluxo de recuperação interrompido com utilização de pinça e filtro milipore (RIERA; McDONOUGH, 1993; RIERA, 2009). O volume recuperado representa normalmente de 95% a 98% do volume infundido (IMEL, 1981; CARVALHO, 2000; SILVA, 2003). Recentemente, foi proposto um quarto lavado adicional, onde logo antes do procedimento é administrada a ocitocina, devendo-se permitir que o meio permaneça no útero da égua por aproximadamente 3 minutos, seguido de massagem uterina pelo reto. Isto resulta em um incremento da taxa de recuperação embrionária em torno de 10% (HUDSON; McCUE, 2004).

O embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003). O equipamento para inóculo mais amplamente utilizado pelos pesquisadores de embriões equinos é a pipeta de inseminação artificial. Deve ser feita higienização da região perineal

da égua receptora, para posterior inovulação, empregando uma bainha plástica sobre o equipamento de transferência, denominada assim, técnica coberta, com objetivo de proteger o embrião da contaminação vaginal (Squires, 1982a) Este trabalho deve ser realizado por técnico habilitado, devendo ser depositado no corpo do útero na região da bifurcação cornoal, deve ser realizada prévia avaliação do tônus uterino e da cérvix que deve estar firme e fechada ao exame ultrassonográfico, não deve haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina., ressaltando a importância da avaliação da receptora previamente ao ato da transferência, devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião (CARNEVALE et al, 2000).

## 2.5 Classificação embrionária

De acordo com BEM e colaboradores (1995), as estruturas viáveis são: mórula (Mo), mórula compacta (Mc), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be). Essa classificação depende do grau de desenvolvimento que o embrião apresentar no dia da coleta.

Na avaliação individual dos embriões várias características são observadas, tais como: tamanho, forma, cor, homogeneidade do citoplasma, forma e integridade da membrana pelúcida, tamanho e presença de células no espaço perivitelíneo e presença de vesículas (ROBERTSON; NELSON, 1999).

A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society), descritas por McKinnon e colaboradores (1988a). A avaliação da qualidade embrionária leva em consideração a morfologia relacionando-a com sua viabilidade. É atribuído um escore de 1 a 5, avaliando-o quanto ao formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida (Tabela 01).

**Tabela 01.** Classificação da qualidade embrionária de embriões equinos.

<b>Classificação</b>	<b>Qualidade</b>
Grau 1	<b>Excelente</b> – Ideais, esféricos, com tamanho, cor e textura uniforme
Grau 2	<b>Bom</b> – Pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação de trofoblastos
Grau 3	<b>Razoável</b> – Problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocele colapsada
Grau 4	<b>Pobre</b> – Blastocele colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas com aparência viável na massa embrionária
Grau 5	<b>Degenerado</b> – oócito não fecundado ou embrião totalmente degenerado

Fonte: McKinnon et al., 1988a.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Local de experimentação

O experimento foi realizado em um haras localizado no município de São Luís/MA, onde foram realizadas transferências de embriões durante a estação de monta da raça Quarto de Milha. Foram avaliados os dados obtidos das transferências realizadas nas estações de 2013 a 2016.

#### 3.2 Animais

Foram utilizadas 22 matrizes da raça Quarto de Milha, com idade entre 2 a 20 anos, com peso entre 400 e 530 Kg. Os animais eram criados em regime de semi confinamento, com fornecimento de 2 Kg ração três vezes ao dia e água e feno *ad libitum* e suplementados com sal mineral.

As receptoras a usadas eram animais sem raça definida, com idade média de 6 anos, pesando em média 370 Kg. Mantidas em criação extensiva, com suplementação de sal mineral e água à vontade.

#### 3.3 Sincronização do ciclo estral

Foi feito o acompanhamento da dinâmica folicular ovariana das doadoras e das receptoras, para determinação do melhor momento da inseminação artificial nas doadoras e observação da ovulação, definida como D0, considerado como o ponto inicial da sincronização, visando obter a sincronia de +1 a -2 entre doadora e receptora.

#### 3.4 Ultrassonografia

O aparelho de ultrassonografia utilizado foi o CHISON D600VET (USProducts Eletromedicina, Brasil), com transdutor linear transretal de 7,0 MHz, a cada 48h para determinar o desenvolvimento folicular e ovulação durante o ciclo estral.

O diagnóstico de gestação foi realizado sete dias após a inovulação do embrião, com visualização da vesícula embrionária no exame ultrassonográfico.

### 3.5 Colheita de embrião

O dia da ovulação é considerado D0, a partir de então contou-se 7 dias para o lavado uterino e colheita de embrião. Uma vez terminado o lavado, o líquido recuperado foi transferido para uma placa de petri de 100 mm e com fundo riscado para facilitar a busca do embrião com o auxílio do estereomicroscópio, para posteriormente realizar os banhos no meio de manutenção. O embrião foi classificado segundo sua qualidade e estágio de desenvolvimento segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998), e preparado para inovulação na égua receptora, que estava em sincronia com a doadora e com boa qualidade uterina.

### 3.6 Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi pelo método Qui Quadrado, simbolizado por  $\chi^2$  é um teste de hipóteses que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, avaliando a associação existente entre variáveis qualitativas. É um teste não paramétrico, ou seja, não depende dos parâmetros populacionais, como média e variância. O princípio básico deste método é comparar proporções, isto é, as possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas para um certo evento. Evidentemente, pode-se dizer que dois grupos se comportam de forma semelhante se as diferenças entre as frequências observadas e as esperadas em cada categoria forem muito pequenas, próximas a zero (CONTI).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a realização do trabalho, foram realizados 66 procedimentos para coletas de embriões, deste total foi possível recuperar 37 embriões por meio de lavagem uterina; obtendo 56,06% de taxa de recuperação embrionária durante o período experimental. Este resultado pode ser reflexo de vários fatores, dentre eles, a qualidade do sêmen utilizado na inseminação (FRANCL, 1987) e o meio de conservação do sêmen utilizado para inseminar as doadoras, seja ele fresco, refrigerado ou congelado, que influencia no índice de recuperação embrionária (FLEURY et al.1997). Segundo MCCUE (2011) a idade da égua doadora também pode influenciar a taxa de recuperação, este autor obteve em seu estudo 57,1% de recuperação em lavados realizados em éguas com idade  $\leq$  a 15 anos e 39,4% de embriões recuperados em éguas com mais de 15 anos de idade.

A taxa de recuperação embrionária foi semelhante ( $P>0,05$ ) para embriões coletados com idades D7, D8 e D9, sendo 66,67%(4/6), 51,35%(19/37) e 60,87%(14/23), respectivamente. Semelhantes aos achados de FLEURY e ALVARENGA (1999) que registraram taxas de recuperação embrionária de 49,3%, 58,0% e 54,5% nos dias 7, 8 e 9, respectivamente. JACOB e colaboradores (2012) encontraram taxas de 42%, 61%, 66%, 59% e 56% nos dias 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

O dia de coleta não afetou ( $P>0,05$ ) o estágio e qualidade dos embriões (Tabela 02). Isto pode ser explicado, pois os ovócitos não fecundados, zigotos e embriões com degeneração precoce ficam retidos nos ovidutos e não chegam à cavidade uterina na espécie equina. Entretanto, quando existe fecundação, existe trânsito tubário e isso permite a passagem dessas células retidas, favorecendo encontrar dentro do mesmo meio de coleta um embrião e várias dessas estruturas degeneradas, apesar da égua ter apresentado somente uma ovulação (JUNIOR, 2003).

**Tabela 02.** Análise do estágio e qualidade dos embriões coletados em relação ao dia de coleta

	Total de embriões	51	61	71	72
D7	4	1(25%)	3(75%)	0	0
D8	19	2(10,53%)	12(63,16%)	4(21,05%)	1
D9	14	2(14,29%)	6(42,86%)	6(42,86%)	0

Com relação à idade do embrião no dia da coleta D7 (25%; 1/4); D8 (31,38%; 6/19) e D9 (42,86%; 6/14) não foi observado diferença significativa quando relacionada à taxa de prenhez após a transferência de embrião. Nos estudos de VOGELSANG e colaboradores(1985), que compararam as taxas de prenhez de embriões de diferentes idades, obteve 0% de prenhez com embriões de 9 dias e 10 dias, enquanto a taxa de prenhez para embriões D6 foi de 61%, D7 de 55% e D8 de 25%. Já FLEURY e ALVARENGA, (1999), obtiveram taxa de prenhez de 74,5% para embriões D7, 74,7% para embriões D8 e 76,5% para embriões D9 e concluíram que com a adequada manipulação e técnica de transferência, os resultados obtidos com embriões de D8 e D9 são similares àquelas obtidas para embriões D7. SQUIRES (1993) afirma que, em diversos estudos na Universidade do Colorado, não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez entre embriões D6, D7 e D8, tornando, assim, flexível o dia da colheita do embrião.

## **5. CONCLUSÃO**

Este trabalho foi possível verificar que o dia coleta dos embriões não influenciou a taxa de prenhez, esse fato pode ser justificado pelos vários fatores que interferem na taxa de prenhez da técnica de transferência de embriões, como a idade da doadora, a qualidade do sêmen utilizado, a sincronia entre doadora e receptora, o manejo alimentar e sanitário do plantel. Com isso, ressalta-se a importância de manter os estudos sobre transferências de embriões para melhorar os índices alcançados.

## 6. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, S. L.; IRVINE, C. H. G. GnRH secretion in the mare. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 3 – 4, p. 173 – 180, 1997.

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 310 – 329, 2005.

ALONSO, M. A. **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas a receptora de embrião**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

ALVARENGA, M. A.; ALVARENGA, F. C. L.; MEIRA C. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. **Resumos 13<sup>rd</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer**, Buenos Aires, Argentina. p. 34 – 35, .1992

ALVARENGA, M. A.; LANDIN ALVARENGA, F. C.; MEIRA, C. Modification in the technique used to recovered equine embryos. **Equine Vet. Journal. Suppl.**, v. 15, p. 111-112, 1993.

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI E. C. C.; NEVES NETO J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos? **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, p. 233 - 239, 2001.

BEM, A. R.; RUMPF, R.; SOUSA, R. V.; PEIXER, M. A. S. **Manual sobre transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília – DF, EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 123p.

BORTOT, D. C. Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e Transferência de embrião: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano XI, n. 21, 2013.

CARNEVALE, E. M. RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and

early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965 – 979, 2000.

CARVALHO, G. R. **Estudos de alguns aspectos da transferência de embriões equinos**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG. 102p, 2000.

CARVALHO, A. L. **Fatores que influenciam o sucesso de um programa de transferência de embriões equinos**. 2012. 62p. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, 2012.

CONTI, F. Laboratório de Informática - ICB – UFPA Acessado em: <http://www.cultura.ufpa.br/dicas/>.

DAELS, P. Embryo transfer tips and tricks. **Proceedings 5<sup>th</sup> European Veterinary Conference**, Voorjaarsdagen, Amsterdam, p. 213 - 215, 2007.

FERREIRA, A. I. T. **Reprodução equina**. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Porto, Porto, 2009.

FLEURY, J.J.; PINTO, A.J.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; LIMA, C.G. Efeitos do ganhão e técnica reprodutiva sobre os índices de recuperação e gestação em um programa de transferência de embriões em eqüinos da raça Mangalarga. *Anais Arq. Fac. Vet.. UFRGS*, v.25, n.1, p. 226, 1997.

FLEURY, J.J. & ALVARENGA, M.A. (1999). Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**, 51 (1), 261.

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.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology Reproduction**, v. 50, p. 225 - 32, 1994.

FRANCL, A.T.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender over 24h at 20°C. **Theriogenology**, v. 27, p. 517-526, 1987.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology Reproduction**, v. 57, p. 1320 - 1327, 1997.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O., NOGUEIRA, G. P., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares, **Theriogenology**, v. 53, p. 925 - 940, 2000.

GINTHER, O. J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryos fixation in mares. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 82 - 88, 1987.

GINTHER, O. J. Characteristics of the ovulatory season. In: **Reproductive Biology of the Mare**, 2 Ed. Cross Plains: Equiservices, p. 173 - 232, 1992.

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

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 61 - 79, 2000.

GOMES, L. G. **Dinâmica folicular ovariana em potras durante as fases pré-púbere e púbere**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. Functional anatomy of reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 7 a. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000. p. 1- 68.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004.

HUDSON, J. J.; McCUE, P. M. How to increase embryo recovery rates and transfer success. **Proceedings 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Denver, Colorado. p. 1473.1204, 2004.

IMEL, K. J. Recovery, culture and transfer of equine embryos. **MS Thesis**, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, 1981.

JACOB, J.C.F., HAAG, K.T., SANTOS, G.O., OLIVEIRA, J.P., GASTAL, M.O. & Gastal, E.L. (2012). Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a comercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, 77, 1159-1166.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução, ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 409 – 434.

JUNIOR, P. T. **Transferência Embrionária em Equinos**: Uma Técnica ao alcance da Coudelaria de Rincão. Rio de Janeiro: Escola de Equitação do Exército (EsEqEx), 2003. 41p.

LAGE, R. A. **Perfil citológico vaginal de éguas da raça quarto de milha criadas no semi-árido nordestino do Brasil**. 2007. 39 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2007.

LEY, M. B.; **Reprodução em Éguas para veterinários de eqüinos**, 1<sup>a</sup> Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.184-191.

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

MCCUE, P. M. Transferencia de Embrioes em Equinos - Recuperação do Embriao / **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education Animal Science of CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 3 (2011), p. 94–98, 2011

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

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VOSS, J. L.; COOK, V. M Equine embryo transfer: A review. **Comp Cont Educ Pract Vet.**, Princeton Junction, v. 10, p. 343 – 355, 1988b.

PASHEN, R. L., LACOMBES, F. A.; DARROW, M. D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Vet. Journal. Suppl.**, n 5, p. 119 – 121, 1993.

RIERA, F. L.; McDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. **Equine Vet. J.**, v. 15, p. 116 – 119, 1993.

RIERA, F. L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia, Saunders Elsevier, 2009, p. 185 – 199; 229 - 246.

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

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: International Embryo Transfer Society. USA, Abril, 1998. Trad. OLIVEIRA FILHO, E. B. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Uberlândia, SBTE, p.109 – 122, 1999.

ROMANO, M. A.; MUCCILOLO, R. G.; FELICIANO e SILVA, A. E. D. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. **Brazilian**

**Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 25-28, 1998.

SAMPER, J. C. Artificial insemination with fresh and cooled semen. In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2. ed. Estados Unidos: Elsevier Health Sciences, p. 165-174, 2008.

SILVA, L. A. **Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos**. Tese (Pósgraduação em Medicina Veterinária), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, Brasil, 145 p. 2003.

SQUIRES E.L., IMEL K.L., IULIANO M.F. & SHIDELER R.K. 1982a. **Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme**. J. Reprod. Fertil. 32:409-414.

SQUIRES, E.L. Progesterone. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 266 Philadelphia: Lea & Febiger, . cap. 6, p. 57-64, 1993.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin**. Colorado State University, Fort Collins. p. 397, 1995.

SQUIRES, E. L, MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91 – 104, 1998.

SQUIRES, E. L; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, n. 59, p. 151 – 170, 2003.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112 – 113, Illinois, 1998.

VANDERWALL, D. K. 2000. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: Ball B.A. (Ed.) **Recent Advances in Equine Theriogenology**. International Veterinary Information Service. Disponível na Internet <http://www.ivis.org>.

VOGELSANG, S.G.; BONDIOLI, K.R.; MASSEY, J.M. Commercial application of equine 272 embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.3, p.89-91, 1985.

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

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

YOUNGQUIST, R. S. **Current therapy in large animal theriogenology**, 1. ed., Philadelphia: Elsevier, 1997.

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**, v. 41, p. 68 – 71, 2012.