

EDILSON DE PAULA LOPES

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE ÉGUAS MANGALARGA
MARCHADOR EM PROJETO COMERCIAL DE
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

Ao Dr. Luiz Arthur Camargo Junqueira

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela capacidade de viver, capacitar, fortalecer e possibilitar as conquistas da vida.

À minha família, por apoiar e acreditar sempre, fazendo-se sempre presentes.

Ao vasto universo de amigos sem os quais nada teria sido possível.

Ao Professor José Domingos Guimarães, por ser a pessoa que é e, antes de tudo, um grande amigo.

A Rose, secretária do Departamento de Pós Graduação de Medicina Veterinária, pelo apoio nas questões burocráticas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Arthur Camargo Junqueira, meu mais querido amigo, meu professor e meu exemplo.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de desenvolvimento do curso.

Aos membros da banca examinadora, professores Eduardo Paulino da Costa, Giovanni Ribeiro Carvalho, Ciro Alexandre Alves Torres e Orlando Marcelo Vendramini, pelas valiosas críticas e sugestões.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação profissional e para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!!!

BIOGRAFIA

EDILSON DE PAULA LOPES, filho de Verotides Lopes Moreira e Maria Eugênia de Paula Moreira, nasceu na cidade de Alto Jequitibá, Minas Gerais, em 03 de novembro de 1968.

Técnico em agropecuária, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG em 1992, graduando-se em fevereiro de 1997. Desde então vem desenvolvendo programas de Transferência de Embrião em fazendas de criação de eqüinos da raça Mangalarga Marchador.

Em agosto de 2002 iniciou o programa de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Reprodução na espécie eqüina.

Em Dezembro de 2004 concluiu o presente estudo.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Ciclo Estral da Égua.....	4
2.2. Transferência de Embriões em Eqüinos.....	5
2.2.1. Geral.....	5
2.2.2. Fatores que afetam e recuperação embrionária.....	6
2.2.2.1. Número de ovulações.....	6
2.2.2.2. Dia da colheita do embrião.....	7
2.2.2.3. Égua doadora.....	8
2.2.2.4. Qualidade do sêmen.....	8
2.2.3. Fatores que afetam as taxas de prenhez pós- transferência.....	9
2.2.3.1. Idade do embrião.....	9
2.2.3.2. Sítio de deposição do embrião.....	10
2.2.3.3. Método de transferência do embrião.....	11
2.2.3.4. Égua receptora.....	11
2.2.3.5. Qualidade do embrião.....	13

2.2.3.6. Refrigeração e transporte de embriões eqüinos.....	13
2.2.3.7. Intervalo do parto ao primeiro cio, intervalo de partos e utilização do cio do potro.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Locais e Períodos da Coleta de Dados.....	16
3.2. Manejo das Éguas Doadoras e Receptoras.....	16
3.3. Palpação e Ultra-sonografia Transretal.....	17
3.4. Monta Natural e Inseminação Artificial.....	17
3.5. Colheita, Manipulação e Transferência dos Embriões.....	18
3.6. Diagnóstico de Gestação.....	20
3.7. Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Taxas de recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.....	22
Tabela 2. Taxas de recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador, segundo a ordem de colheitas durante a estação reprodutiva.....	25
Tabela 3. Taxas de recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador, inseminadas no cio do potro ou em outros cios.....	26
Tabela 4 . Correlação Simples de Pearson de características biométricas reprodutivas e procedimentos técnicos de inseminação artificial em éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador.....	26
Tabela 5. Taxas de prenhez aos 15 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.....	27
Tabela 6. Taxas de prenhez aos 30 dias e de perda embrionária precoce (PEP) entre 15 e 30 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.....	27

Tabela 7. Taxas de prenhez aos 45 dias e de perda embrionária precoce (PEP) entre 15 e 45 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.....	28
Tabela 8. Taxas de prenhez aos 60 dias e de perda embrionária precoce (PEP) entre 15 e 60 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.....	28
Tabela 9. Taxas de prenhez e perda embrionária precoce (PEP) em éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador após transferência de embriões transportados ou transferidos imediatamente pós-colheita.....	30
Tabela 10. Correlação Simples de Pearson de características biométricas reprodutivas com o status reprodutivo (gestantes, não gestantes ou perda embrionária precoce), em éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador.....	31
Tabela 11. Status reprodutivo (prenhez, aborto) em éguas da raça Mangalarga Marchador, de acordo com a sincronia entre doadoras e receptoras.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Desenho esquemático da disposição das colunas de ar, meio de manutenção e do embrião na palheta francesa durante o envasamento.....	19
Figura 2. Percentual de embriões com 7, 8 e 9 dias recuperados nas diferentes estações reprodutivas de éguas da raça Mangalarga Marchador.....	24

RESUMO

LOPES, Edílson de Paula, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2004. **Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga Marchador em projeto comercial de transferência de embriões.** Orientador: José Domingos Guimarães. Conselheiros: Eduardo Paulino da Costa e Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Objetivou-se com este estudo caracterizar e avaliar a eficiência reprodutiva de éguas doadoras e receptoras da raça Mangalarga Marchador em programas comerciais de transferência de Embriões (TE) e verificar a relação de algumas características reprodutivas, zootécnicas e metodologia na TE com taxas de prenhez em receptoras. Foram analisados dados coletados em quatro diferentes fazendas, de 1998 a 2004, onde foram realizadas 1141 colheitas com recuperação de 830 embriões. O percentual de recuperação de embriões observado em função do número de colheitas das seis estações reprodutivas foi de 72,74%. Não foi observada diferença entre as taxas de recuperação embrionária nas diferentes estações reprodutivas ($P > 0,05$). No geral 90% dos embriões recuperados encontravam-se com 8 a 9 dias de idade. Não houve diferença entre a recuperação embrionária da primeira a nona colheita de embriões da estação reprodutiva, assim como entre éguas inseminadas durante o cio do potro e em outros cios subseqüentes ($P > 0,05$). O tamanho do primeiro folículo e a inseminação artificial da doadora na fase pré-ovulatória foram as características que apresentaram correlação positiva com a recuperação embrionária em doadoras ($P < 0,05$). As taxas de prenhez observadas na

soma de todas as estações aos 15, 30, 45 e 60 dias foram de 73,4; 69,9; 66,7 e 64,46% respectivamente. As perdas embrionárias precoces entre 15-30; 15-45 e 15-60 dias foram de 4,8; 9 e 12,15%, respectivamente, não diferindo entre as estações ($P>0,05$). Não foi observada diferença na taxa de prenhez e perda embrionária precoce nos embriões transferidos imediatamente após a colheita (66,8 e 13,5%) e embriões transportados à temperatura ambiente por períodos inferiores a 1 hora (62,9 e 14,4%) ($P>0,05$). Não foi observada correlação entre as variáveis estudadas e a taxa de prenhez nas receptoras ($P>0,05$). Com relação à taxa de perda embrionária precoce, não houve diferença entre os diferentes intervalos de sincronia de ovulação entre as doadoras e receptoras ($P>0,05$). Com relação à taxa de gestação, melhores resultados foram verificados nos intervalos de -3 e -2 dias com relação à sincronia de ovulação das doadoras e receptoras ($P<0,05$) e as menores taxas nos intervalos de -6 ($P<0,05$) com valores intermediários nos intervalos de -1, 0 e +1, sendo que os dois últimos não diferiram do intervalo -6 ($P>0,05$). A utilização dessa flexibilização na técnica proporciona vantagens para programas comerciais de transferência de embriões eqüinos, possibilitando otimização no uso de receptoras, redução de custos e melhorias no manejo das fazendas.

ABSTRACT

LOPES, Edílson de Paula, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2004. **Reproductive parameters of Mangalarga Marchador mares in commercial project of embryos transfer.** Adviser: José Domingos Guimarães. Committee members: Eduardo Paulino da Costa and Giovanni Ribeiro de Carvalho

It was objectified with this study to characterize and evaluate the reproductive efficiency in donor and recipient mares of Mangalarga Marchador race in commercial programs of Embryos Transfer (TE) and verify the relationship of some reproductive characteristics, zootechnics and methodology in the TE among conception rates in recipients. Data collected in four different farms, from 1998 to 2004, were analyzed where 1141 crops were accomplished with recovery of 830 embryos. The percentile of embryos' recovery found because of the number of crops of the six reproductive seasons was 72.74%. Differences were not observed among the rates of embryonic recovery in the different reproductive seasons ($P>0.05$). Generally, 90% of the recovered embryos were 8 to 9 days of age. There was no difference among the embryonic recovery from the first to the ninth embryos' crop of the reproductive season, as well as among mares inseminated during the colt heat and another subsequent heat ($P>0.05$). The size of the first follicle and the donor's artificial insemination in preovulatory phase were the characteristics that presented positive correlation with the embryonic recovery in donors ($P<0.05$). The conception rates observed in the sum of all of the seasons in 15, 30, 45 and 60 days were 73.4; 69.9; 66.7 and 64.46%, respectively. The early embryonic losses between 15-30; 15-45

and 15-60 days were 4.8; 9 and 12.15%, respectively, not differing among the seasons ($P>0.05$). Differences were not observed in the conception rate and early embryonic loss in the embryos transferred immediately after the crop (66.8 and 13.5%) and embryos transported at room temperature for periods inferior to 1 hour (62.9 and 14.4%) ($P>0.05$). A correlation was not observed between the studied variables and the conception rate in the recipients ($P>0.05$). Regarding the rate of early embryonic loss, there was no difference among the different intervals of ovulation's synchrony among the donors and recipients ($P>0.05$). Related to the conception rate, better results were verified in the intervals of -3 and -2 days regarding the ovulation's synchrony of donors and recipients ($P <0.05$) and the smallest rates in the intervals of -6 ($P <0.05$) with intermediary values in the intervals of -1, 0 and +1, although the last two didn't differ of the interval -6 ($P>0.05$). The use of that flexibility in the technique provides advantages for commercial programs of equine embryos transfer, making possible the optimization in the use of recipient mares, costs' reduction and improvements in the farms' management.

1. INTRODUÇÃO

A Transferência de Embriões (TE) é a técnica que permite a transferência de embriões de éguas doadoras para o útero de éguas receptoras, a fim de explorar racionalmente as características genéticas melhoradoras das doadoras.

Entre as vantagens da TE podemos citar: 1) obtenção de potros de éguas com problemas reprodutivos que as impeçam de levar a gestação à termo; 2) permitir que éguas de competição continuem sua carreira atlética; 3) aumentar a produção de éguas com alto valor genético; 4) aumentar o número de produtos de éguas idosas, otimizando sua vida reprodutiva; 5) teste de progênie em potros reservas, os quais possuam características ótimas para tornarem-se ganhões; 6) otimizar o processo de seleção dentro de um determinado plantel.

Com relação aos aspectos comerciais do negócio “criação de cavalos”, a TE traz consigo uma série de vantagens para o criador, já que com sua implantação o criatório aumenta o leque de opções de produtos que podem ser oferecidos a seus clientes, tais como: 1) aumento no volume de venda de coberturas de ganhões consagrados; 2) possibilidade de comercialização de ovócitos de matrizes aprovadas; 3) mercado de embriões prontos; 4) volume maior de animais jovens, e 5) comercialização de animais em sistema de cotas. Esses são exemplos de como a tecnologia

pode alavancar o mercado, aquecendo-o e fazendo com que o capital investido gire mais rapidamente, aumentando a liquidez do negócio.

Mesmo diante de tantas vantagens o programa de TE possui limitações e desvantagens, tais como: 1) exige presença de profissionais mais qualificados; 2) aumenta o custo da criação por aumentar os gastos com alimentação, medicamentos, vacinas, funcionários de apoio, equipamentos e material; 3) exige melhorias na infra-estrutura da propriedade, em função do aumento do número de animais e de prováveis modificações nas instalações; 4) aumento no número de animais predispondo o plantel a maior incidência de doenças e lesões, pela maior densidade populacional nas fazendas. Em virtude disso, todo o programa de TE deve passar por criterioso processo de otimização de resultados e diminuição de custos. Para isso as técnicas devem ser adequadas ao objetivo comercial da empresa.

A utilização da técnica de transferência de embriões (TE) na espécie equina cresceu de modo expressivo nas últimas duas décadas. Nos anos 70 somente a Associação Americana do Cavalo Quarto de Milha (AQHA) permitia o uso da TE, ainda assim, em casos específicos. Na década seguinte, a técnica começou a ser utilizada em outros países e atualmente a maior parte das associações de raça em todo o mundo permite a colheita e transferência de embriões equinos a fresco, refrigerados ou congelados.

O Brasil possui um dos maiores rebanhos equinos do mundo. Existem várias associações de raças com número expressivo de criadores e animais inscritos. Deve-se salientar que as raças nativas estão em fase de formação e assim, qualquer meio capaz de reduzir o intervalo de gerações e aumentar o número de bons reprodutores e matrizes é de grande valia no aprimoramento de nossos animais (CARVALHO, 2000). O Brasil é um dos líderes no uso da TE no mundo, junto com EUA e Argentina (SQUIRES et al., 1999).

A demanda pelo desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida de aplicação na equideocultura tem aumentado muito (SQUIRES et al.,

1999). Embora o uso da TE tenha aumentado nas últimas duas décadas, seus números têm flutuado junto com a saúde financeira da indústria eqüina (SQUIRES et al., 1999). Atualmente, o alto custo da TE tem ditado que somente animais geneticamente superiores sejam usados como doadoras (SQUIRES et al., 1999).

A indústria eqüina representa um desafio único na aplicação de biotecnologias da reprodução. Devido ao amplo leque de esportes e atividades de lazer envolvendo a espécie, inúmeras raças e associações esportivas interessadas na utilização dessas biotecnologias.

Muitas associações eqüinas têm estado na vanguarda da utilização de novas biotecnologias da reprodução e têm recebido com entusiasmo a implementação das mesmas como ferramentas para melhorar a performance genética das raças e aumento da lucratividade.

O presente estudo teve como objetivos: 1) caracterizar e avaliar a eficiência reprodutiva de éguas doadoras e receptoras da raça Mangalarga Marchador em programas comerciais de transferência; 2) Verificar a relação de algumas características reprodutivas, zootécnicas e metodologia na Técnica de Transferência de Embriões com taxas de prenhez em receptoras e 3) propor condutas que tornem a TE mais simples e exeqüível em fazendas de criação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo Estral da Égua

A égua é um animal poliestral sazonal. A atividade reprodutiva é regulada primariamente pelo fotoperíodo, mas também pela nutrição e clima (principalmente temperatura). A maioria das éguas tem atividade sexual durante a primavera e o verão (estação de monta) e somente poucas éguas são cíclicas durante o final do outono e inverno (estação de anestro) (DAELS e HUGHES, 1993).

A definição clássica de ciclo estral é o intervalo que vai de uma ovulação a outra. Baseado nesta definição a média de um ciclo estral eqüino varia de 19 a 22 dias. O estro (fase folicular ou estrogênica) varia de 5 a 7 dias e o diestro (fase lútea ou progesterônica) de 14 a 15 dias. Existe uma considerável variabilidade individual nessas médias (DAELS e HUGHES, 1993).

O estro é o período onde a égua está sexualmente receptiva ao garanhão, tem o trato genital preparado para aceitar e transportar os espermatozoides e é o período onde ocorre a ovulação. Durante o estro, o(s) folículo(s) produz(em) e secreta(m) estrógeno, o qual induz a receptividade sexual. A ovulação, evento onde ocorre a liberação do ovócito acontece aproximadamente 24 a 48 horas antes do fim do estro (DAELS e HUGHES, 1993).

Diestro é o período durante o qual a égua não está receptiva ao garanhão e apresenta o ambiente uterino em condições adequadas para permitir o desenvolvimento embrionário. Após a ovulação, ocorre a total luteinização das células da granulosa e da teca, formando assim o corpo lúteo que sintetiza e secreta progesterona. O fim da fase lútea é marcado pela regressão do CL (luteólise) 14 a 15 dias após a ovulação e poucos dias depois tem início um novo estro. A luteólise é provocada pela síntese e liberação de PGF₂ pelo endométrio na ausência do reconhecimento materno da gestação (DAELS e HUGHES, 1993; MALINOWSKY, 2002).

A duração da fase folicular é primariamente influenciada pela estação, mas pode também sofrer variações individuais ou raciais. A duração do estro decresce com o correr da estação coincidindo com o auge do verão, época na qual os dias são mais longos, o fotoperíodo é maior e a foliculogênese é acelerada. A duração média do estro para observações individuais varia de 2 a 12 dias e parece imparcialmente ter repetibilidade dentro de cada indivíduo (DAELS e HUGHES, 1993; MALINOWSKY, 2002).

No quinto ou sexto dia após a ovulação, o embrião chega ao útero onde migrará até que ocorra a nidação, em média, no décimo oitavo dia após a ovulação. A migração embrionária no lúmen uterino e a secreção de substâncias pelas células trofoblásticas do zigoto são fatores importantes no reconhecimento materno da gestação. Caso esse reconhecimento não ocorra, as células endometriais sintetizarão e liberarão PGF₂ que atuará no corpo lúteo, determinando sua lise e o fim da produção de progesterona, o que culminará em um novo ciclo estral.

2.2. *Transferência de Embriões em Eqüinos*

2.2.1. Geral

O uso da Transferência de Embriões (TE) em eqüinos tem aumentado rapidamente nas últimas duas décadas. Contudo, algumas características biológicas peculiares assim como problemas técnicos têm

limitado seu amplo uso na espécie eqüina quando comparado com a espécie bovina (SQUIRES et al., 1999). As maiores candidatas para o programa de TE incluem éguas idosas com histórico reprodutivo ruim que não conseguem produzir um potro por monta natural ou inseminação artificial e éguas que estão em competição (SQUIRES et al., 2003; LOPES, 2002a), embora as taxas de perda embrionária em éguas idosas sejam mais altas (SQUIRES et al., 2003) e a fertilidade decresça com a idade da égua (MERKT et al., 2000).

Uma técnica bastante difundida no Brasil é descrita por FLEURY et al. (1999) para coletas de embriões variando de 7 a 9 dias após a ovulação da doadora. Os autores obtiveram taxa de recuperação embrionária, de visualização do embrião no filtro e a taxa de prenhez de 58,0; 72,1 e 74,7 % para embriões de 8 dias e de 54,5; 94,7 e 76,5 % para embriões de 9 dias, respectivamente.

2.2.2. Fatores que afetam a recuperação embrionária

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

2.2.2.1. Número de ovulações

Não é difícil concluir que quanto maior o número de ovulações uma égua doadora apresentar, maior será a chance de se recuperar pelo menos um ou mais embriões dessa égua. Squires et al. (1987) estudaram as características reprodutivas de éguas que apresentaram ovulações simples ou duplas espontâneas e de éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina. A recuperação embrionária no sétimo dia pós-ovulação foi de 58,2% para éguas com ovulação simples e de 106% para éguas com ovulação dupla espontânea. Adicionalmente, as éguas superovuladas produziram cerca de 3 vezes mais embriões do que as éguas controle (2,0 vs. 0,65

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

2.2.2.2. Dia da colheita do embrião

O embrião eqüino chega ao útero materno entre o quinto e o sexto dia pós-ovulação (GINTHER, 1992). Embriões eqüinos têm sido comumente recuperados para fins de transferência do sétimo ao nono dia pós-ovulação. Colheitas realizadas seis dias após a ovulação geralmente fornecem resultados ligeiramente inferiores, mas são necessárias quando se deseja congelar os embriões devido a maior viabilidade após a congelação e descongelação dos embriões de seis dias em comparação aos de sete ou mais dias (SQUIRES et al., 1999). IULIANO et al. (1985) obtiveram taxa de recuperação embrionária menor no dia 6 pós-ovulação (66%) do que no dia oito (82%). A taxa no dia sete (75%) não diferiu significativamente dos dias seis e oito. Dados relativos a um programa comercial de TE em eqüinos no Brasil com grande número de colheitas reforçam as informações previamente mencionadas, não tendo sido verificadas diferenças significativas na recuperação embrionária nos dias sete, oito e nove pós-ovulação (49,3, 58,0 e 54,5%, respectivamente; FLEURY e ALVARENGA., 1999).

Recentemente, tem sido sugerido que o desenvolvimento embrionário e o transporte pelo oviduto de éguas mais velhas pode ser retardado, assim coletas feitas no dia 8 ou 9 são mais apropriadas para éguas mais velhas (SQUIRES et al., 1999).

2.2.2.3. Égua doadora

Um dos principais fatores que afetam a recuperação embrionária é sem dúvida alguma o status reprodutivo da égua doadora. Éguas idosas com histórico reprodutivo ruim geralmente produzem menos embriões (SQUIRES et al., 1999). CARNEVALE e GINTHER (1992) relataram que éguas idosas apresentaram maior incidência de inflamação endometrial, taxa de prenhez reduzida e maior incidência de morte embrionária. Além disso, a idade avançada foi relacionada a menor tônus e contratilidade uterina. Posteriormente, em 1995, os mesmos autores transferiram ovócitos de éguas idosas para o oviduto de éguas jovens e vice-versa. Após inseminação artificial, 30,7% (8/26) dos ovócitos de éguas idosas transferidos para jovens resultaram em formação de vesícula embrionária, enquanto os ovócitos de éguas jovens geraram 91,6% (11/12) de gestação. Os autores concluíram então que a reduzida fertilidade das éguas idosas está associada a produção de ovócitos defeituosos.

2.2.2.4. Qualidade do sêmen

A qualidade do sêmen a ser utilizado em um programa de TE é fator de extrema importância. Como a escolha dos garanhões é baseada em suas características morfológicas e de performance atlética e raramente leva em consideração a questão da fertilidade, não é incomum ocorrer queda da recuperação embrionária em função da utilização de sêmen de má qualidade. A fertilidade do sêmen é extremamente variável entre garanhões. As taxas de prenhez por ciclo estral em éguas após inseminação artificial com sêmen fresco de 11 garanhões variaram de 40 a 79% entre garanhões (AMANN e PICKETT, 1987). Adicionalmente, Douglas (1979) reportou taxa de recuperação embrionária de 36% com a utilização de um garanhão e de 72% com outro. Segundo SQUIRES et al., (1999) o sêmen fresco geralmente fornece melhores resultados de recuperação de embriões do que o sêmen refrigerado ou congelado.

2.2.3. Fatores que afetam as taxas de prenhez pós-transferência

Após duas décadas de pesquisa e desenvolvimento da técnica de transferência de embriões na espécie eqüina, não é incomum encontrar nos dias de hoje taxas de prenhez após a TE comparáveis às obtidas por ciclo estral com o uso de monta natural ou inseminação artificial. Dois trabalhos recentes desenvolvidos em programas de TE com a raça Mangalarga Marchador revelaram taxas de prenhez de 70,3% (270/384; JACOB et al., 2002) e 72,5% (95/131; GOMES et al., 2004).

2.2.3.1. Idade do Embrião

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

FLEURY (1998a) e FLEURY et al. (1999) concluíram que, com adequado manuseio e técnica não cirúrgica, as taxas de prenhez obtidas com embriões coletados no dia 8 ou 9 foram similares às obtidas com embriões coletados no dia 7 após ovulação. Se as receptoras são selecionadas baseadas na sincronia da ovulação das doadoras, especialmente quando se transferem embriões com 8 e 9 dias, deve-se modificar a seleção para evitar a transferência em receptoras com muitos dias pós-ovulação (CARNEVALE et al., 2000).

Estudos conduzidos com embriões mais jovens, mostraram que as taxas de prenhez foram menores após a transferência de pequenos

embriões ou mórulas (100 a 299 μ m). Esses resultados não necessariamente indicam que a viabilidade é menor quando os embriões pequenos ou mórulas são coletados inicialmente após a ovulação, por exemplo, no dia 6. Provavelmente, muitos desses embriões encontravam-se atrasados em seu desenvolvimento na ocasião das coletas (CARNEVALE et al., 2000; SQUIRES et al., 2003). Tais observações foram anteriormente relatadas por Vanderwall, o qual verificou em éguas com idade avançada atraso no desenvolvimento embrionário e no transporte dos mesmos pelo oviduto. Recentemente, tem sido preconizado coletas no dia 8 ou 9 pós-ovulação em éguas mais velhas (SQUIRES et al., 1999).

Embriões coletados entre 10,5 e 13,5 dias pós-ovulação tiveram perdas de 50 % por terem colapsado nas mangueiras condutoras do líquido sifonado e foram descartados (SIROIS et al., 1987). Da mesma forma, SQUIRES (1993) comenta que os melhores índices de gestação ocorreram para embriões com oito dias que com nove dias de vida.

De acordo com FLEURY et al., (2002) embriões grandes (blastocistos expandidos) podem ser transportados e transferidos, resultando em boas taxas de prenhez. Os autores obtiveram 77,2 % de prenhez com embriões acima de 1000 μ m, transportados à temperatura ambiente.

2.2.3.2. *Sítio de deposição do embrião*

A deposição do embrião no corno uterino pode ser testada como forma de se verificar possível vantagem do mesmo na migração pelos cornos uterinos, processo importante no reconhecimento materno da gestação (CARVALHO, 2000). O mesmo autor não encontrou diferenças nas taxas de prenhez de embriões depositados no corno uterino ou no corpo do útero, muito embora cite que as taxas de prenhez em receptoras com deposição do embrião no corno uterino encorajem sua utilização.

2.2.3.3. Método de transferência do embrião

Embriões eqüinos têm sido transferidos pelo método cirúrgico através de incisão no flanco e pelo método não-cirúrgico via transcervical. Segundo SQUIRES et al. (1999), o método cirúrgico apesar de ser mais oneroso fornece taxas de prenhez mais consistentes do que o transcervical (65 a 75% vs. 50 a 75%). No entanto, dados provenientes de pesquisas (SILVA, 2003) e de programas comerciais de TE no Brasil conduzidos por profissionais criteriosos e experientes nas raças Mangalarga (FLEURY e ALVARENGA, 1999), Mangalarga Marchador (JACOB et al., 2002; GOMES et al., 2004) e Quarto de Milha / Paint Horse (PESSÔA et al., 2004) têm mostrado que o método transcervical gera taxas de prenhez consistentes em torno de 70%, o que não justifica a realização do procedimento cirúrgico.

Considerando somente o método transcervical, diferentes dispositivos têm sido utilizados na transferência. PERES et al. (2002) não observaram diferenças significativas nas taxas de prenhez pós-transferência com a utilização do transferidor francês (59%, 217/371), pipeta de inseminação artificial (54%, 95/176), transferidor alemão (44%, 17/39) ou comum aparato constituído por um tubo de aço inox dentro do qual passava um tubo de polietileno contendo o embrião (62%, 64/103).

Recentemente foi desenvolvido um método alternativo para a transferência de embriões eqüinos que consiste em depositar o embrião no útero da receptora por meio de uma injeção intra-uterina guiada por ultrasonografia. Essa nova técnica foi comparada ao método transcervical e não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez (76,9 e 78,9%, respectivamente; SILVA, 2003). Entretanto, trata-se de uma técnica mais onerosa e complexa cuja aplicação se restringe a situações especiais.

2.2.3.4. Égua receptora

Seleção e manejo de receptoras podem ser fatores muito importantes afetando o sucesso de um programa de transferência de embriões em eqüinos. Os critérios de seleção incluem tamanho ideal, idade, temperamento dócil e bom desenvolvimento mamário. As receptoras

necessitam ter um ciclo estral normal e serem livres de problemas reprodutivos (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; LOPES, 2002b; SQUIRES et al., 2003).

O momento fisiológico em que a receptora recebe o embrião é sem dúvida um dos principais determinantes da taxa de prenhez, juntamente com a qualidade do embrião e idade da égua doadora (SQUIRES et al. 1999). Em estudos mais antigos, havia grande preocupação com a sincronia entre doadora e receptora. Resultados de um programa com grande número de transferências cirúrgicas utilizando éguas receptoras que haviam ovulado de dois dias antes (+2) a três dias depois (-3) da doadora revelaram apenas uma queda na taxa de prenhez quando do uso de receptoras +2, sem diferenças entre os demais dias (McKINNON e SQUIRES, 1988). OGURI e TSUTSUMI (1980) reportaram 63% de prenhez após transferência não-cirúrgica para receptoras que ovularam 48 h depois da doadora contra 0% em receptoras que ovularam 48 h antes da doadora. Dessa forma, preconizou-se por muitos anos a transferência dos embriões para receptoras +1 a -2, ou seja, que ovularam um dia antes até dois dias depois da doadora.

Trabalhos mais recentes têm mostrado que a sincronia entre doadoras e receptoras pode ser bem mais flexível do que se pensava, até porque pode-se realizar a colheita do embrião em dias diferentes. Segundo JACOB *et al.* (2002), receptoras ovuladas um dia antes até cinco dias após a doadora podem ser utilizadas sem afetar as taxas de prenhez. Na verdade, mais relevante que a sincronia entre doadora e receptora é o número de dias pós-ovulação que a receptora apresenta no momento da transferência, conforme salientado por CARNEVALE *et al.* (2000). A esse respeito, dados de diversas estações reprodutivas em dois programas comerciais no Brasil com as raças Mangalarga e Mangalarga Marchador foram analisados e revelaram similaridade ($P > 0.05$) nas taxas de prenhez em receptoras que foram utilizadas do terceiro ao oitavo dia pós-ovulação (FLEURY et al., 1989; JACOB et al., 2002). Esses resultados são de grande importância prática, uma vez que conferem maior flexibilidade à utilização das receptoras

reduzindo, por conseguinte, o número de receptoras alojadas e o tempo necessário para torná-las gestantes.

2.2.3.5. Qualidade do embrião

Após a colheita, é comum avaliar a morfologia e estágio de desenvolvimento do embrião. A qualidade do embrião equino antes da transferência afeta dramaticamente as taxas de prenhez (SQUIRES, 1993). CLARK et al. (1987) reportaram 50% (13/26) de prenhez após transferência de embriões com grau de qualidade menor que 2 comparada a apenas uma prenhez de seis transferências de embriões de grau maior ou igual a 2 (grau 1 = excelente, grau 4 = ruim). De forma similar, as taxas de prenhez aos 50 dias após transferência cirúrgica foram maiores ($P < 0,05$) para embriões grau 1 ou 2 (69%, 214/310) do que para embriões classificados como grau ≥ 3 (18%, 4/22; McKINNON et al., 1988).

2.2.3.6. Refrigeração e transporte de embriões eqüinos

Embriões eqüinos têm sido refrigerados a 5 °C e transportados por até 30 h antes da transferência (SQUIRES et al., 2003). Taxas de prenhez similares para embriões transferidos a fresco ou refrigerados a 5 °C foram reportadas (CARNEY et al., 1991). McCUE et al. (2000) compararam as taxas de prenhez de embriões refrigerados por 24 h em meio Ham's F10 ou em meio de manutenção (Emcare®) e não observaram diferenças significativas.

Recentemente, FLEURY et al. (2002) desenvolveram um novo método de refrigeração e transporte de embriões eqüinos à temperatura de 15-18 °C em meio Ham's F10 contendo tampão Hepes e 0,4% de BSA. Não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez entre embriões mantidos à temperatura ambiente por menos de uma hora (74,9%, 176/235), refrigerados por 1-4 h (73,5%, 50/68), 4-8 h (77,0%, 114/148), 8-12 h (76,7%, 26/34) ou por 12-18 h (76,5%, 26/34).

2.2.3.7. Intervalo do parto ao primeiro cio, intervalo de partos e utilização do cio do potro.

Na espécie eqüina, existe limitação fisiológica em relação ao número de coletas de embriões durante a “estação de monta”, devido ao longo período de gestação e à sazonalidade reprodutiva. Em função dessas limitações, o “cio do potro” que ocorre logo após o parto, deveria também ser utilizado com o objetivo de maximizar o número de coletas e a produção de embriões por estação de monta (CARVALHO, 2000).

No Brasil, aproximadamente no décimo sétimo dia após o parto, 95 % das éguas já apresentaram cio e 85 % já ovularam. A fertilidade do cio do potro aproxima-se da fertilidade por ciclo das demais categorias de éguas (PALHARES, 1989).

Éguas gestantes e paridas são a maior proporção das éguas receptoras presentes em uma fazenda de criação que utiliza a TE como rotina na reprodução. Devido ao alto custo de manutenção dessas éguas é importante que as mesmas tenham intervalo de partos pequeno. CAMILLO et al. (1997) comenta que, como o tempo de gestação eqüino é de 335 a 340 dias, a meta da criação é que a égua produza um potro por ano.

Em um estudo retrospectivo o mesmo autor registrou taxas de prenhez menores (71,9 %) em éguas inseminadas no cio do potro, mas não significativamente diferentes das observadas em éguas que foram inseminadas no segundo cio pós-parto (84,6 %) e similares às éguas solteiras inseminadas no primeiro (77,8 %) e segundo cio (75,7 %) no início da estação reprodutiva. A taxa de prenhez de éguas inseminadas no cio do potro foi maior, mas não significativamente diferente, que daquelas éguas que repetiram o cio e ficaram gestantes quando inseminadas no cio seguinte. Éguas gestantes inseminadas no terceiro e quarto cio tiveram taxas de prenhez significativamente menores (71,9 contra 22,2 %). CAMILLO et al. (1997) concluíram que houve similaridade entre os índices reprodutivos encontrados no estudo e que embora tenha havido taxa menor, mas não significativa, envolvendo éguas inseminadas no cio do potro e

éguas inseminadas no segundo cio pós-parto, a utilização do cio do potro deve ser feita.

Vários autores têm reportado fertilidade diminuída durante o cio do potro em comparação aos cios subseqüentes (MALSCHITZKY et al., 2002). Taxas reduzidas de prenhez e altas taxas de morte embrionária são encontradas durante o cio do potro. Acúmulo de fluido intra-uterino, freqüentemente observado durante o cio do potro, tem efeito negativo nas taxas de prenhez em éguas cobertas nesse período (GINTHER, 1992; BALL, 1993; McKINNON et al., 1998).

Contudo, MALSCHITZKY et al. (2002) fazem algumas considerações: a) presença de fluido intra-uterino (FIU) durante o cio do potro não afeta as taxas de prenhez; b) alta incidência de FIU após cobertura no cio do potro pode ser esperada em éguas que apresentem FIU durante o cio do potro; c) lavados uterinos realizados 36-48 horas após a cobertura no cio do potro não melhoram as taxas de prenhez de éguas nesse período; d) lavados uterinos realizados 6-12 horas após a cobertura no cio do potro melhoram as taxas de prenhez observadas aos 42 de gestação e finalmente, e) taxas de prenhez durante o cio do potro não são diferentes das taxas de prenhez em ciclos subseqüentes.

Segundo GINTHER (1992) éguas que não fiquem gestantes no primeiro cio pós-parto podem passar por um prolongado período até o próximo cio. ALLEN (1994) cita que éguas podem apresentar cios atípicos após o cio do potro e que a utilização desse cio tem como vantagem evitar tal fato.

Tendo em vista a rápida involução uterina e os bons índices de gestação no “cio do potro”, recomenda-se a sua utilização em um programa de transferência de embriões, principalmente pelo limitado intervalo de tempo verificado durante as estações de monta (CARVALHO, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Dados oriundos de programas de transferência de embriões eqüinos sediados em fazendas de criação de cavalos da raça Mangalarga Marchador foram compilados e analisados para a elaboração do presente trabalho. Os resultados apresentados referem-se a seis estações reprodutivas em programas dirigidos pelo mesmo profissional.

3.1. Locais e Períodos da Coleta de Dados

Os dados analisados foram coletados em quatro diferentes fazendas, de 1998 a 2004, sempre de agosto a maio: no Haras Alambari (1), localizado em Resende-RJ, na estação 1998/1999; no Haras Yuri (2), situado em Jequitibá-MG, nas estações 1999/2000 e 2000/2001; no Haras Três Corações (3), em Ponte Nova-MG, nas estações 2001/2002 e 2002/2003; e no Haras Santa Esmeralda (4), situado em Esmeraldas-MG, na estação 2003/2004.

3.2. Manejo das Éguas Doadoras e Receptoras

As doadoras de embriões, na maior parte dos casos, foram mantidas em piquetes gramados (*Cynodon spp.*, coast-cross), salvo aqueles animais que estavam em preparação para competições, que permaneciam em baias. Tinham acesso à água e sal mineralizado *ad libitum* e à fonte de volumoso,

geralmente capim picado ou feno. Recebiam também ração concentrada duas vezes ao dia, geralmente no curral de onde foram levadas para a realização do acompanhamento reprodutivo.

As receptoras comumente tinham como fonte de volumoso pastagens e foram levadas ao cocho uma vez ao dia para fornecimento de ração concentrada nas instalações em que foi realizado o controle reprodutivo. Tinham livre acesso à água e sal mineralizado. Nas fazendas em que as áreas de pastagens foram limitadas, as receptoras recebiam capim picado no cocho como fonte de volumoso.

3.3. Palpação e Ultra-sonografia Transretal

A frequência das palpações e exames ultra-sonográficos variou conforme a fase do ciclo estral em que se encontravam as éguas. Dessa forma, as éguas foram examinadas em intervalos de dois ou três dias até apresentarem folículo com aproximadamente 30 mm de diâmetro, quando passaram a ser examinadas diariamente. Nas palpações foram registrados as estruturas ovarianas presentes (folículos ou corpos lúteos), a consistência uterina e o grau de abertura da cérvix. Exames ultra-sonográficos dos ovários e útero foram realizados sempre que considerados necessários, principalmente para a pesquisa de fluido uterino durante o estro nas doadoras e na avaliação de receptoras.

3.4. Monta Natural e Inseminação Artificial

As éguas doadoras foram cobertas ou inseminadas a cada 48 horas desde a detecção de folículo ≥ 35 mm até a ovulação. Para a realização da monta natural as éguas foram devidamente contidas e tinham as regiões da vulva e períneo higienizados com água e sabão. Para realizar as inseminações, as éguas foram levadas ao tronco de contenção, tinham a cauda erguida e a vulva e períneo higienizados. O sêmen foi aspirado em seringa de 20 mL acoplada a uma pipeta de inseminação própria para éguas

(Provar®) e depositado no corpo ou corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o folículo pré-ovulatório. Sêmen in natura foi utilizado nas inseminações e diluído em meio à base de leite desnatado quando se tratava de garanhões alojados no próprio haras ou diluído, refrigerado e transportado a aproximadamente 15 °C em caixa de isopor por até 12 horas, quando da utilização de garanhões de outras fazendas.

3.5. Colheita, Manipulação e Transferência dos Embriões.

A colheita dos embriões foi realizada de sete a nove dias após a ovulação. Após a devida higienização da vulva e região perineal da doadora uma sonda do tipo “Bivona” foi guiada através da cérvix até o corpo do útero, onde inflavou-se o balonete. Em seguida a sonda foi tracionada em sentido caudal para que o balonete obstruísse a abertura da cérvix. Um circuito em forma de “Y” foi utilizado para infundir e retirar o fluido do útero, além de um filtro próprio para a colheita de embriões (Milipore®) que filtrou o fluido retirado do útero. O meio utilizado para o lavado uterino foi solução de Ringer com lactato pré-aquecida a cerca de 35°C conforme descrito por ALVARENGA et al. (1993). Sempre que o embrião foi visualizado no filtro o restante da solução contida no útero foi drenado e a colheita encerrada. Quando isso não ocorria, prosseguia-se com a colheita até terem sido realizados pelo menos três lavados com um litro de solução de Ringer com lactato cada. Após a colheita do embrião, a égua doadora recebeu uma injeção intramuscular de prostaglandina-F2 α (7,5 mg, Lutalyse®/TUCO) para indução de um novo estro.

Encerrados os lavados, o fluido contido no filtro de colheita foi rotacionado e vertido em uma placa de Petri descartável de 100 x 20 mm. A placa foi levada ao microscópio estereoscópio para o rastreamento do embrião que, quando localizado, foi imediatamente transferido para uma placa menor contendo meio de manutenção próprio para embriões (Emcare®). O embrião foi “lavado” quatro a cinco vezes no meio antes de ser envasado para a transferência. Sempre que o lavado era considerado sujo ou quando havia detritos celulares aderidos ao embrião, este era

transferido para outra placa contendo meio estéril após as primeiras lavagens.

Três tipos de dispositivos para transferência foram utilizados conforme o tamanho do embrião recuperado. Embriões menores, geralmente de sete dias, foram envasados em palhetas francesas de 0,25 mL (Figura 1) e transferidos com o aparato de transferência francês. Embriões de tamanho intermediário, geralmente de oito ou nove dias, foram acondicionados e transferidos em pipetas de inseminação artificial (PROVAR®). O envasamento foi similar ao feito em palhetas francesas. Embriões com idade acima de nove dias foram envasados e transferidos em sistemas adaptados por serem muito grandes. Esse sistema constituiu-se de uma seringa de 3 mL adaptada a uma pipeta de inseminação PROVAR® e a um tudo de PVC flexível estéril de diâmetro superior a 5 mm. Esse método foi utilizado para embriões com tamanho variando entre 3 e 5 mm.



Figura 1 – Desenho esquemático da disposição das colunas de ar, meio de manutenção e do embrião na palheta francesa durante o envasamento.

Os embriões foram depositados aleatoriamente entre o corpo e o ápice dos cornos ipsi ou contra-lateral ao ovário com o corpo lúteo. Nas duas últimas estações grande parte dos embriões foi transportada já envasados na pipeta PROVAR® à temperatura ambiente para outra fazenda onde estavam localizadas as receptoras, com distância inferior a 4 km.

Todos os embriões foram transferidos, independentemente da qualidade embrionária, partindo do princípio que se há uma mínima chance de prenhez esta deve ser considerada em um projeto comercial.

Para a transferência do embrião a égua receptora foi levada ao tronco de contenção e teve a cauda erguida e a vulva e períneo higienizados. A

seleção da receptora baseou-se no número de dias pós-ovulação, tônus uterino e cervical e histórico reprodutivo, quando conhecido. A pipeta ou transferidor francês foi recoberto por uma camisa sanitária e seguro pelo técnico com a mão enluvada. Um auxiliar abriu os lábios vulvares da receptora e o técnico introduzia a mão com o aparato de transferência até o fundo da vagina, guiando-o através da cérvix até o corpo do útero, onde o embrião era depositado. Alternativamente, após a colocação do aparato de transferência no corpo uterino, o técnico o guiava por via transretal até um dos cornos para a deposição do embrião.

Como receptoras para os embriões foram utilizadas éguas da raça Mangalarga Marchador com idade variando entre 3 e 18 anos. Com relação à sincronia entre a receptora e a doadora no momento da transferência foram utilizadas éguas que se encontravam entre o 3^o e o 7^o dia pós-ovulação independente da idade do embrião.

3.6. Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado por técnica de ultra-sonografia aos 15 dias a partir da data de ovulação da doadora. Caso a receptora estivesse gestante o exame foi repetido aos 30, 45 e 60 dias, a fim de verificar a taxa de perda embrionária precoce.

3.7. Análise Estatística

As informações coletadas das fichas individuais desses animais foram compiladas e o programa Excel utilizado para a elaboração das planilhas, as quais foram submetidas às análises estatísticas para a avaliação dos índices reprodutivos e influência dos diferentes procedimentos técnicos nas taxas de eficiência reprodutiva por meio do Programa SAEG (UFV, 1998).

Para todos os parâmetros estudados realizou a estatísticas descritivas. Para as características qualitativas, os dados foram arranjados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de Qui-quadrado, com 5% de probabilidade de erro. Correlação Simples de Pearson foi realizado para estudar a relações entre todos os parâmetros estudados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas seis estações reprodutivas analisadas foram realizadas 1141 colheitas de embrião, as quais propiciaram a recuperação de 830 embriões (Tabela 1). A comparação das taxas de recuperação embrionária nas diferentes estações reprodutivas analisadas não revelou diferenças entre as mesmas ($P>0,05$). A utilização de garanhões e doadoras de boa fertilidade nas diferentes fazendas de criação e a condução dos programas pelo mesmo profissional certamente contribuiu para essa similaridade na recuperação embrionária nos diferentes locais e estações.

Tabela 1 – Taxas de recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador segundo o haras e a estação reprodutiva.

Haras	Estação	Colheitas	Embriões recuperados (%)
Alambari	1998/1999	102	79 (77,4) ^a
Yuri	1999/2000	241	188 (78,0) ^a
Yuri	2000/2001	235	171 (72,8) ^a
Três Corações	2001/2002	210	139 (66,29) ^a
Três Corações	2002/2003	106	81 (76,4) ^a
Sta Esmeralda	2003/2004	247	172 (69,6) ^a
Total	—	1141	830 (72,7)

Valores seguidos de letras semelhantes na mesma coluna não diferem entre si ($\chi^2_{GL1} = 3,84$; $P>0,05$).

O percentual de recuperação de embriões em função do número de colheitas na soma das seis estações reprodutivas (72,74%) foi numericamente superior ao reportado por JACOB *et al.* (2002) em levantamento de três estações reprodutivas em um programa de TE com éguas da raça Mangalarga Marchador (63,4%). Outros relatos com dados de programas comerciais de larga escala em outras raças revelam também percentuais de recuperação embrionária inferior aos obtidos no presente estudo (FLEURY *et al.*, 1989; FLEURY e ALVARENGA, 1999). Em determinados casos, como no estudo de FLEURY *et al.* (1989), tal diferença se deveu à utilização de doadoras de maior idade, o que afetou significativamente a recuperação embrionária conforme mencionado por SQUIRES *et al.* (1999). Outra possível explicação é a utilização de um grande número de garanhões com diferentes fertilidades (AMANN e PICKETT, 1987), prática muito comum em programas comerciais de grande porte. Em contrapartida, na raça Mangalarga Marchador e no caso específico do presente trabalho, por se tratar de programas sediados em fazendas de criação, utilizou-se menor número de garanhões, preferencialmente aqueles pertencentes à própria fazenda e que se encontravam alojados no mesmo haras que as éguas doadoras.

Conforme mostra a figura 2, cerca de 90 % dos embriões recuperados em cada uma das seis estações reprodutivas analisadas encontravam-se com 8 ou 9 dias de idade. Essa distribuição adotada pelo profissional responsável pelo programa justifica-se pelo fato de que nessa idade os embriões são facilmente visualizados no filtro coletor, o que agiliza o procedimento de colheita, identificação e transferência como um todo (FLEURY e ALVARENGA, 1999). Dessa forma, minimizam-se os riscos para as pessoas envolvidas no procedimento, o estresse e risco para o animal por reduzir o tempo e a intensidade da manipulação transretal do útero, o gasto de material e o tempo de exposição do embrião a condições não próprias para o mesmo. Além desses fatores, otimiza-se o tempo do profissional responsável, o que é fundamental tendo em vista o volume de atividades envolvidas num programa de TE comercial em fazendas de grande porte.

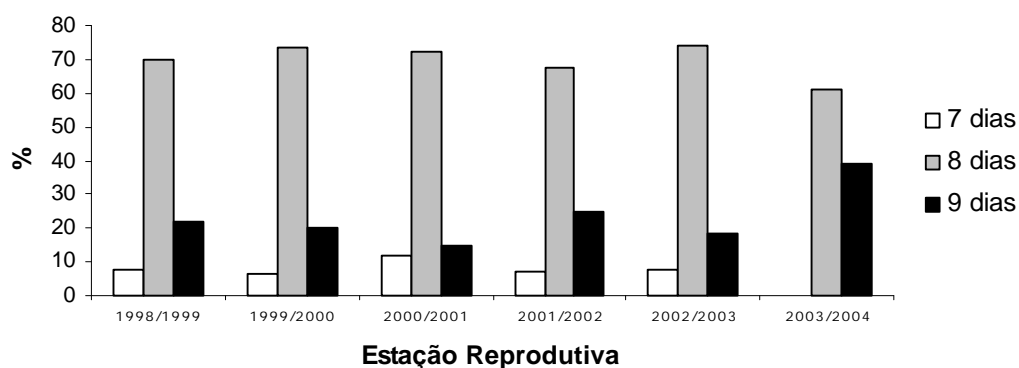


Figura 2 – Percentual de embriões com 7, 8 e 9 dias recuperados nas diferentes estações reprodutivas analisadas.

Com o intuito de compensar a sazonalidade reprodutiva característica da espécie eqüina, tem-se buscado realizar o maior número de colheitas para a obtenção do maior número possível de embriões de determinadas fêmeas de potencial genético comprovadamente superior. No presente trabalho, a recuperação embrionária da primeira a nona colheita de embrião da estação reprodutiva foi analisada, não havendo diferenças entre ordem de colheita ($P > 0,05$; Tabela 2). Isso demonstra que, pelo menos em curto prazo, a freqüente manipulação decorrente de um programa de TE não traz prejuízos à fertilidade das éguas doadoras.

Comparou-se a recuperação embrionária entre éguas inseminadas durante o cio do potro e em outros cios (solteiras ou paridas em cios subseqüentes ao cio do potro), não havendo diferença entre os grupos (Tabela 3). Carvalho (2000) também não observou diferenças significativas nas taxas de recuperação de embriões de éguas paridas no cio do potro e éguas solteiras (57,9% vs 50,0%, respectivamente). Embora o número de éguas doadoras utilizadas no cio do potro tenha sido bastante reduzido no presente trabalho quando comparado ao outro grupo, a taxa de 78,57% de recuperação embrionária mostra não ser problemática nesta categoria de éguas. A utilização do cio do potro permite o rápido ingresso da doadora no programa, antecipando o cumprimento das metas definidas para cada égua na estação reprodutiva. O único inconveniente observado para a utilização

do cio do potro pode ser o tamanho aumentado do útero em éguas que não tenham uma boa involução uterina, o que dificultaria o lavado uterino e a recuperação embrionária. Entretanto, CARVALHO (2000) não observou diferença na duração da colheita e na recuperação do meio de lavagem entre éguas no cio do potro e éguas solteiras.

Tabela 2 – Taxa de recuperação embrionária* de acordo com a ordem do ciclo estral na estação de monta, em um programa de transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador.

ORDEM DO CICLO ESTRAL	TOTAL COLETAS % (n)	COLETAS NEGATIVAS % (n)	COLETAS 1 EMBRIÃO % (n)	COLETAS 2 EMBRIÕES % (n)	COLETAS 3 EMBRIÕES % (n)
1	21,3 (243)	28,0 (68)	68,7 (167)	02,9 (7)	0,41 (1)
2	18,5 (211)	28,0 (59)	67,3 (142)	04,7 (10)	---
3	15,0 (171)	32,8 (55)	65,5 (112)	02,3(4)	---
4	12,4 (141)	36,9 (52)	59,6 (84)	03,5 (5)	---
5	10,2 (116)	31,9 (37)	64,7 (75)	03,4 (4)	---
6	07,6 (87)	31,0 (27)	65,5 (57)	03,4 (3)	---
7	05,3 (60)	30,0 (18)	66,7 (40)	03,3 (2)	---
8	03,3 (38)	31,6 (12)	65,8 (25)	02,6 (1)	---
9	02,7 (310)	32,3 (10)	58,1 (18)	09,7 (3)	---
10	01,7 (19)	31,6 (6)	68,4 (13)	---	---
11	01,0 (11)	27,3 (3)	63,6 (7)	09,1 (1)	---
12	00,6 (7)	28,6 (2)	71,4 (5)	---	---
13	00,3 (3)	33,3 (1)	66,7 (2)	---	---
14	00,2 (2)	---	100,0 (2)	---	---
TOTAL	1140 (100,0)	30,7 (350)	65,7 (749)	351,0 (40)	0,1 (1)

* P> 0,05 pelo teste qui-quadrado ($\chi^2_{GL1}=3,84$).

Foi analisada a correlação de diferentes variáveis na taxa de recuperação embrionária em doadoras submetidas a um programa comercial de TE, sejam elas: utilização do cio do potro; tamanho do primeiro e segundo folículos pré-ovulatórios; intervalo do início do cio à ovulação e

momento da inseminação artificial (pré ou pós-ovulação). As correlações significativas observados foram para o tamanho do primeiro folículo e recuperação embrionária, e inseminação artificial da doadora na fase pré-ovulatória e recuperação embrionária, embora o valor de R tenha sido reduzido (Tabela 4).

Tabela 3 – Taxas de recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador, inseminadas no cio do potro ou em outros cios.

Tipo de cio	Colheitas	Embriões recuperados (%)
Cio do potro	14	11 (78,6) ^a
Outros cios	1123	817 (72,3) ^a
Total	1137	828 (72,8)

Valores seguidos de letras semelhantes na mesma coluna não diferem entre si ($\chi^2_{GL1} = 3,84$; $P > 0,05$).

Tabela 4– Correlação Simples de Pearson de características biométricas reprodutivas e procedimentos técnicos de inseminação artificial em éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador.

Características	R= correlação	P = significância
CIO POT X REEMB	0,012	0,341
TAM1D X REEMB	0,083	0,003
TAM2D X REEMB	0,043	0,319
ICIOVD X REEMB	0,019	0,269
IAPRE X REEMB	0,115	0,0001
IAPOS X REEMB	0,005	0,438
CICLO X REEMB	-0,016	0,294

REEMB= recuperação embrionária; CIOPOT= cio do potro; TAM1D= tamanho do 1^o folículo; TAM2D= tamanho do 2^o folículo; ICIOVD= intervalo do início do cio à ovulação; IAPRE= inseminação artificial da doadora na fase pré-ovulatória; IAPOS= inseminação artificial da doadora na fase pós-ovulatória; CICLO= ordem do ciclo estral dentro da estação reprodutiva.

As Tabelas 5 a 8 mostram as taxas de prenhez e de perda embrionária precoce aos 15, 30, 45 e 60 dias, respectivamente.

Tabela 5 – Taxas de prenhez aos 15 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.

Haras	Estação	Transferências	% Prenhez 15 dias
Alambari	1998/1999	79	67,1 (53) ^a
Yuri	1999/2000	188	71,8 (135) ^a
Yuri	2000/2001	171	71,9 (123) ^a
Três Corações	2001/2002	139	65,5 (91) ^a
Três Corações	2002/2003	81	80,2 (65) ^{ac}
Sta Esmeralda	2003/2004	172	82,6 (142) ^{bc}
Total	—	830	73,4 (609)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($\chi^2_{GL1}=3,84$; $P<0,05$).

Tabela 6 – Taxas de prenhez aos 30 dias e de perda embrionária precoce (PEP) entre 15 e 30 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.

Haras	Estação	Transferências	% Prenhez 30 dias	% PEP 15-30 dias
Alambari	1998/1999	79	63,39 (50) ^{bc}	5,76 (3/53) ^a
Yuri	1999/2000	188	69,7 (131) ^{abc}	3,0 (4/135) ^a
Yuri	2000/2001	171	67,2 (115) ^{bc}	6,5 (8/123) ^a
Três Corações	2001/2002	139	62,6 (87) ^c	4,4 (4/91) ^a
Três Corações	2002/2003	81	80,3 (65) ^a	0,00 (0/65) ^a
Sta Esmeralda	2003/2004	172	76,7 (132) ^{ab}	7,0 (10/142) ^a
Total	—	830	69,9 (580)	4,8 (29/609)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($\chi^2_{GL1}=3,84$; $P<0,05$).

Tabela 7 – Taxas de prenhez aos 45 dias e de perda embrionária precoce (PEP) entre 15 e 45 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.

Haras	Estação	Transferências	% Prenhez 45 dias	% PEP 15-45 dias
Alambari	1998/1999	79	62,0 (49) ^{bc}	7,6 (4/53) ^a
Yuri	1999/2000	188	67,5 (127) ^{ab}	5,9 (8/135) ^a
Yuri	2000/2001	171	64,3 (110) ^{bc}	10,6 (13/123) ^a
Três Corações	2001/2002	139	57,6 (80) ^c	12,19 (11/91) ^a
Três Corações	2002/2003	81	79,0 (64) ^a	1,5 (1/65) ^a
Sta Esmeralda	2003/2004	172	72,1 (124) ^{ab}	12,7 (18/142) ^a
Total	—	830	66,7 (554)	9,0 (55/609)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($\chi^2_{GL1}=3,84$; $P<0,05$).

Tabela 8 – Taxas de prenhez aos 60 dias e de perda embrionária precoce (PEP) entre 15 e 60 dias em receptoras da raça Mangalarga Marchador, segundo o haras e a estação reprodutiva.

Haras	Estação	Transferências	% Prenhez 60 dias	% PEP 15-60 dias
Alambari	1998/1999	79	59,5 (47) ^{bc}	11,3 (6/53) ^a
Yuri	1999/2000	188	65,4 (123) ^{abc}	8,9 (12/135) ^a
Yuri	2000/2001	171	62,6 (107) ^{bc}	13,0 (16/123) ^a
Três Corações	2001/2002	139	54,7 (76) ^c	16,5 (15/91) ^a
Três Corações	2002/2003	81	76,5 (62) ^a	4,6 (3/65) ^a
Sta Esmeralda	2003/2004	172	69,77 (120/172) ^{ab}	15,49 (22/142) ^a
Total	—	830	64,46 (535/830)	12,15 (74/609)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($\chi^2_{GL1}=3,84$; $P<0,05$).

Com relação às taxas de prenhez verificamos o mesmo panorama entre os 15 e 60 dias nas diferentes estações reprodutivas analisadas. As diferenças observadas referem-se ao grau de prática do profissional, qualidade do manejo e instalações nas diversas fazendas de criação.

A queda de resultados na estação 2001/2002, que aparentemente contraria a tendência de aprimoramento do profissional pode ser explicada

pelas dificuldades encontradas na implantação do programa, tendo em vista que a propriedade não sofreu adequada estruturação para sustentar as mudanças impostas pelas necessidades de um programa comercial de transferência de embriões. Com a melhoria das condições da propriedade ocorreu aumento ($p < 0,05$) nas taxas de prenhez na estação seguinte (2002/2003), as quais mantiveram-se no mesmo patamar na estação 2003/2004 em uma nova propriedade onde já havia condições prévias para um bom desenvolvimento de um programa dessa natureza.

Embora tenhamos registrado pequenas variações nas taxas de prenhez, em cada uma das estações e na soma de todas elas, essas se encontram dentro das faixas descritas na literatura internacional em relatos referentes a projetos comerciais de TE sediados no Brasil (FLEURY et al., 1989; JACOB et al., 2002). Mais que isso, as taxas encontradas mostraram menor variação e alcançaram valores superiores aos citados por SQUIRES et al. (1999) para transferência não cirúrgica (50 a 75%). Essas taxas demonstram que a TE pode ser realizada comercialmente mesmo estando sujeita aos obstáculos naturais observados a campo, mantendo resultados comparáveis aos obtidos em condições experimentais.

Com relação às taxas de perda embrionária nas receptoras até os 60 dias de gestação, embora não tenha havido diferença entre as estações analisadas ($p > 0,05$) algumas considerações devem ser feitas. Registrou-se taxa numericamente menor de perda embrionária na estação 2002/2003 quando comparada com a estação anterior, a qual deveu-se a melhorias nas condições da fazenda com adequação da propriedade ao programa de TE como discutido acima. Essa alteração vai ao encontro do interesse comercial onde menor taxa de perda significa maior produtividade e conseqüentemente maior número de produtos nascidos.

Enfim, é importante salientar que as taxas de perda embrionária registradas no presente trabalho são compatíveis com os valores descritos para éguas férteis (5 a 24 %; BALL, 1993), mostrando que a TE não traz prejuízos à eficiência reprodutiva dos plantéis eqüinos. Reforça esse conceito o fato de que as taxas de prenhez pós-transferência registradas

nesse e em outros trabalhos são comparáveis às obtidas após inseminação artificial com sêmen a fresco (40 a 79 %; AMANN e PICKETT, 1987).

As éguas receptoras desempenham papel fundamental para o sucesso do programa de transferência de embriões. Para que isso ocorra é importante que tenham boa qualidade de vida. Muitas vezes a ausência dessa condição pode resultar em falhas e prejuízos. Por representarem a categoria mais populosa dentro do sistema geralmente torna-se impossível que éguas receptoras tenham condições de manejo ideais nas áreas centrais das propriedades. Em função disso temos recomendado que as receptoras sejam alojadas em instalações distantes das áreas de manejo mais intenso das propriedades, o que nos leva a recorrer ao transporte dos embriões colhidos.

Embriões eqüinos têm sido refrigerados e transportados com sucesso em diferentes meios e sistemas por períodos de até 24 h. (McCUE *et al.*, 2000; FLEURY *et al.*, 2002). No presente trabalho comparamos as taxas de prenhez e de perda embrionária precoce para embriões transferidos imediatamente após a colheita e embriões transportados à temperatura ambiente por períodos inferiores a 1 hora, não havendo diferença entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9 – Taxas de prenhez com 60 dias e perda embrionária precoce (PEP) em éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador após transferência de embriões transportados ou transferidos imediatamente pós-colheita.

Tipo de embrião	Número	Taxa de prenhez n(%)	PEP n(%)
Transportado	232	155 (66,8) ^a	21 (13,5) ^a
Não transportado	572	360 (62,9) ^a	52 (14,4) ^a
Total	804	515 (64,0)	73 (14,2) ^a

Valores seguidos de letras semelhantes na mesma coluna não diferem entre si ($\chi^2_{GL1} = 3,84$; $P > 0,05$).

Foi analisada a relação de diferentes variáveis sobre as taxas de prenhez em receptoras de embriões, tais quais: transporte dos embriões; sincronia doadora-receptora na ocasião da transferência; uso do primeiro ciclo pós-parto da receptora; tamanho do primeiro e segundo folículo da receptora; intervalo do início do cio à ovulação e intervalo do parto à transferência do embrião para a receptora. Utilizando a correlação simples de Pearson não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre as variáveis estudadas e a taxa de prenhez nas receptoras (Tabela 10).

Tabela 10 – Correlação Simples de Pearson de características biométricas reprodutivas com o status reprodutivo (gestantes, não gestantes ou perda embrionária precoce), em éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador.

Características	R= correlação	P = significância
IDEMB X STATUS	0,005	0,446
TRANSP X STATUS	-0,040	0,130
IDRCOL X STATUS	-0,075	0,171
IPARCO X STATUS	-0,029	0,341
CIOPOTR X STATUS	-0,064	0,179
TAM1R X STATUS	0,028	0,214
TAM2R X STATUS	-0,272	0,222
ICIOOVR X STATUS	0,015	0,344
IPAINO X STATUS	0,074	0,148
SINCRONIA X STATUS	0,06	0,04

STATUS= gestantes, não gestantes ou perda embrionária precoce; TRANSP= transporte dos embriões; IDRCOL= sincronia doadora-receptora na ocasião da transferência; IPARCO= intervalo do parto à coleta; CIOPOTR= cio do potro na receptora; TAM1R= tamanho do 1^o folículo na receptora; TAM2R= tamanho do 2^o folículo na receptora; ICIOVD= intervalo do início do cio a ovulação na receptora; IPAINO= intervalo do parto à transferência na receptora; SINCRONIA= sincronia entre a égua doadora e receptora.

Os intervalos de sincronia de ovulação entre doadora e receptora utilizados neste estudo, encontram-se sumariadas na tabela 11.

No total de 792 éguas com dados avaliados para esta característica, 97,23% (770) encontravam-se nos intervalos de -6 a +1 com relação a

ovulação da doadora. Em função do baixo número de receptoras (22) utilizadas com +3(3), +2(9), -7(8) e -8(2), os dados não foram utilizadas nas análises referentes a sincronia da ovulação entre doadoras e receptoras. No entanto, obteve-se 54 % (12) de gestação e não se observou nenhum caso de abortamento neste grupo de receptoras.

Tabela 11 – Status reprodutivo (prenhez, morte embrionária) em éguas da raça Mangalarga Marchador, de acordo com a sincronia entre doadoras e receptoras.

SINCRONIA	GESTANTES	NÃO GESTANTES	ABORTOS	TOTAL
-6	38,5 (10) ^a	53,8(14)	07,7(2) ^a	6(03,4)
-5	69,2(36) ^b	25,0(13)	05,8(3) ^a	52(06,7)
-4	65,9(60) ^b	23,1(21)	11,0(10) ^a	91(11,8)
-3	75,9(110) ^{bc}	19,3(28)	04,8(7) ^a	145(18,8)
-2	70,6(120) ^{bce}	18,8(32)	10,6(18) ^a	170(22,1)
-1	59,4(85) ^{bdf}	28,0(40)	12,6(18) ^a	143(18,6)
0	55,9(47) ^{adf}	34,5(29)	09,5(8) ^a	84(10,9)
+1	57,6(34) ^{adf}	35,6(21)	06,8(4) ^a	59(07,7)
TOTAL	502(65,2)	198(25,7)	70(9,1)	770(100,0)

Percentuais seguidos de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($\chi^2_{GL1} = 3,84$; $P < 0,05$).

Com relação à taxa de perda embrionária precoce, não houve diferença entre os diferentes intervalos de sincronia de ovulação entre as doadoras e receptoras ($P > 0,05$).

Com relação à taxa de gestação, melhores resultados foram verificados nos intervalos de -3 e -2 dias com relação à sincronia de ovulação das doadoras e receptoras ($P > 0,05$) e as menores taxas nos intervalos de -6 ($P > 0,05$) com valores intermediários nos intervalos de -1, 0 e +1, sendo que os dois últimos não diferiram do intervalo -6 ($P > 0,05$).

Os melhores resultados observados nos intervalos -3 e -2 estão relacionados diretamente ao número de dias de ovulação das receptoras. Podemos dizer que, considerando-se o dia 0 como uma coleta realizada no

dia 8 pós-ovulação, as receptoras que apresentaram melhores taxas de prenhez encontravam-se com 5 e 6 dias de ovuladas. Esse resultado corrobora aos citados na literatura (CARNEVALE et al., 2000; JACOB et al., 2002), e a prática de flexibilização que a TE tem sofrido nos últimos anos. Esse resultado tem grande relevância, uma vez que valida a prática atual de manejo que separa física e organizacionalmente éguas doadoras de éguas receptoras dentro do programa, o que acaba permitindo maior cuidado com as receptoras, fator mais importante dentro de um programa de TE.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados analisados de programas de transferência de embriões eqüinos em fazendas de criação da raça Mangalarga Marchador, concluímos que:

1. O primeiro ciclo pós-parto das éguas doadoras e receptoras pode ser utilizado sem prejuízo para os resultados, desde que sejam ciclos livres de problemas reprodutivos;
2. Os embriões podem ser coletados com idade variando entre sete e nove dias, visando melhor ajuste para o momento adequado da receptora, sem prejuízo para os resultados;
3. Embriões maiores que 3 mm podem ser transferidos utilizando-se um aparato adaptado sem prejuízo para as taxas de prenhez;
4. O momento ótimo para que a receptora receba o embrião transferido varia entre o dia 4 e 6 pós-ovulação;
5. Os embriões podem ser transportados envasados à temperatura ambiente por curtas distâncias sem perdas significativas para a taxa de prenhez;
6. A utilização dessa flexibilização na técnica proporciona vantagens para programas comerciais de transferência de embriões eqüinos, possibilitando otimização no uso de receptoras, redução de custos e melhorias no manejo das fazendas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, W. E.. **Fertilidade e obstetrícia eqüina**. São Paulo: Livraria Varela, 1994. 207p.
- ALLEN, W. R.. Proceedings of the John P. Hughes International Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p.184-193, 1993.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEIRA, C.. Modifications in the technique used to recover equine embryos. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, n.15, p.111-112, 1993.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- BALL, B.A. Embrionic death in mares. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 517-531.
- CADARIO, M.E.; THATCHER, W.W.; KLAPSTEIN, E. et al. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductively normal mares and mares with delayed uterine clearance. **Theriogenology**, v.52, p.1181-1192, 1999.
- CAMILLO, F.; MARMORINI, P.; ROMAGNOLI, S. et al. Fertility at the first post partum estrous compared with fertility at the following estrous cycles in foaling mares and with fertility in nonfoaling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 17, n. 11, 1997.

- CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M. *et al.* Estudos da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça brasileiro de hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.252-254, 2003.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology Reproduction Monogr.**, v.1, p.209-214, 1995.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v.37, p.1101-1115, 1992.
- CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, E.L.; SQUIRES, E.L. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.
- CARNEY, N.J.; SQUIRES, E.L.; COOK, V.M. *et al.* Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh vs cooled transported equine embryos. **Theriogenology**, v.36, p.23-32, 1991.
- CARVALHO, G.R. **Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões em eqüinos.** Universidade Federal de Viçosa, 2000. Viçosa - MG. 103 p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia).
- CLARK, K.E.; SQUIRES, E.L.; McKINNON, A.O. *et al.* Viability of stored equine embryos. **Journal of Animal Science**, v.65, p.534-542, 1987.
- DAELS, P.F.; HUGHES, J.P. The normal estrous cycle. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 121-132.
- DOUGLAS, R.H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, v.11, n.1, p.33-46, 1979.
- FLEURY, J.J.; COSTA NETO, J.B.F.; ALVARENGA, M.A. Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares in Brazil. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.8, p.73-74, 1989.
- FLEURY, J.J. Non-surgical embryo transfer of day 8 equine embryos. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.26, n.1, p.267, 1998a.

- FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.51, p.261, 1999.
- FLEURY, J.J.; FLEURY, P.D.C.; LANDIN-ALVARENGA, F.C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18 °C – preliminary results. **Theriogenology**, v.58, p.749-750, 2002.
- GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; TORRES, C.A.A. et al. Effect of oxytocin, prostaglandin F₂ and clenbuterol on uterine dynamics in mares. **Theriogenology**, v.50, p.521-534, 1998.
- GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**. Cross Plains: Equiservices, 1992. p. 503-509.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; DOMINGUES, I.B. Utilisation of mares after first post partum ovulation as embryo recipients. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2004, Rio de Janeiro, Brasil. **Proceedings...** Rio de Janeiro: 2004. (no prelo)
- IULANO, M.F.; SQUIRES, E.L.; COOK, V.M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, v.60, n.1, p.258-263, 1985.
- JACOB, J.C.F.; DOMINGUES, I.B.; GASTAL, E.L. et al. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 545, 2002.
- KATILA T. Uterine defence mechanisms in the mare. **Animal Reproduction Science**. V.42, p. 197-204, 1996.
- LOPES, E.P. Desmistificando a transferência de embriões I. **Top 2000 Mangalarga Marchador**. v.1, n.1, p.6, 2002a.
- LOPES, E.P. Desmistificando a transferência de embriões II. **Top 2000 Mangalarga Marchador**. v.1, n.2, p.22, 2002b.

- MALINOWSKY, K. Recent advances in reproduction in horses. In <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs717> , 2002.
- MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A.L.G. et al. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. **Theriogenology**, v.58, p.495-498, 2002.
- McCUE, P.M.; SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C. *et al.* Pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 versus EmCare™ embryo holding solution. In: **Proceedings of the Annual Conference of Society of Theriogenology**, 2000, p.147.
- McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.4, p.305-333, 1988.
- McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. et al. Equine embryo transfer: A review. **Compendium of Continuous Education Practice Veterinary**, v. 10, p. 343-355, 1988.
- McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; HARRISON, L.A. et al. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n.3, p.350-353, 1998.
- MERKT, H.; KLUG, E.; JOCHLE, W. Reproduction management in the german thoroughbred breeding industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n. 12, 2000.
- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical transfer of equine embryos. **Arch. Androl.**, v.5, p.108, 1980.
- PALHARES, M.S. **Avaliação da atividade ovariana e eficiência reprodutiva de potras e éguas da raça Mangalarga Marchador.** Escola de Veterinária – UFMG. Belo Horizonte, 1989. 89p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal).

- PASHEN, R.L.; LASCOMBES, F.A.; DARROW, M.D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, n.15, p.119-121, 1993.
- PERES, K.R.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M. *et al.* Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.558, 2002. Abstract.
- PESSÔA, M.A.; ROCHA FILHO, A.N.; CARMO, M.T. Comparison between short and long acting for non-cycling embryo recipient mares. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2004, Rio de Janeiro, Brasil. **Proceedings...** Rio de Janeiro: 2004. (no prelo)
- SILVA, L.A. **Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões em eqüinos.** MS. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, 123pp, 2003.
- SIROIS, J.; BETTERIDGE, K.J.; GOFF, A.K. PGF2 release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. **Journal of Reproduction Fertility**, v.35, p. 419-427, 1987. Suppl.
- SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. *et al.* Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **Journal of Reproduction Fertility Suppl.**, n.35, p.399-403, 1987.
- SQUIRES, E.L. Embryo transfer. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 357-367.
- SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.91-104, 1999.
- SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M. *et al.* Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

VANDERWALL, D.K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. In: SQUIRES, E.L. (Ed). **The veterinary clinics of north america – equine practice**: diagnostic techniques and assisted reproductive technology. W. B. Saunders, 1996. p.61-83.

VANDERWALL, D.K. Current equine embryo transfer techniques. In: BALL, B.A. (Ed). **Recent advances in equine theriogenology**. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Document n. A0204.0400, 2000.