

LUCIANO ANDRADE SILVA

**TÉCNICA ULTRA-SONOGRÁFICA DE INJEÇÃO
INTRA-UTERINA PARA TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EM EQUINOS**

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
2003

LUCIANO ANDRADE SILVA

**TÉCNICA ULTRA-SONOGRÁFICA DE INJEÇÃO INTRA-UTERINA
PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQÜINOS**

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*".

APROVADA: 20 de agosto de 2003.

Prof. Rúbens Paes de Arruda
USP – Pirassununga, SP

Prof. Marc Roger Jean M. Henry
UFMG – Belo Horizonte, MG

Prof. Orlando Marcelo Vendramini
UFV – Viçosa, MG

Prof. Francisco Aloizio Fonseca
UENF – Campos, RJ

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Conselheiro)
UFV – Viçosa, MG

LUCIANO ANDRADE SILVA

**TÉCNICA ULTRA-SONOGRÁFICA DE INJEÇÃO INTRA-UTERINA
PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUÍNOS**

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*".

APROVADA: Agosto de 2003.

Prof. Eduardo Leite Gastal
(Orientador)
UFV - Viçosa, MG

Esta dissertação foi desenvolvida no Setor de Eqüideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa sob a orientação do Prof. **Eduardo Leite Gastal**, e com auxílio das seguintes instituições:

- Departamentos de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil;
- University of Wisconsin, Madison, WI – U.S.A. (Convênio nº 280/98);
- Eutheria Foundation, Cross Plains, WI – U.S.A.

À
Minha Família,
Meu bem mais precioso.
Queridos pais, Paulo e Lucila,
E irmãos,
Patrícia, Lucas e Phelipe.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, fonte e plenitude da existência humana.

Aos meus pais, **Paulo e Lucila**, pelo exemplo de vida, pela sustentação, confiança, estímulo e amor...

Aos meus irmãos, **Patrícia, Lucas e Phelipe**, pela consideração e amor...

Ao meu orientador, Professor **Eduardo Leite Gastal**, fonte de inspiração científica.

À Professora **Melba Maria Furtado Oliveira Gastal**, pela amizade e apoio.

À Coordenadora da Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Professora **Rilene Ferreira Diniz Valadares**, pelo apoio.

Aos **Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia** - professores e funcionários - da Universidade Federal de Viçosa pela estrutura e apoio.

Ao **Corpo Docente** da Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, responsável pelo fortalecimento das bases dos meus conhecimentos.

Aos Professores **José Domingos Guimarães** e **Eduardo Paulino da Costa** do Laboratório de Reprodução Animal do DVT-UFV, presentes desde os meus primeiros contatos com a Ciência Reprodução Animal.

Ao Professor O. J. Ginther, do Department of Animal Health and Biomedical Sciences (AHABS), University of Wisconsin, Madison, WI, USA, pelo suporte técnico.

Ao grande amigo **Fernando Antônio de Freitas**, funcionário responsável pelo Setor de Eqüideocultura, pela amizade fraterna, pelos conselhos e pela saudável convivência em todo desenvolvimento desse trabalho.

Aos companheiros e colegas de pós-graduação **Daniel Barbosa Godoi e Luiz Gustavo Gomes**, exemplos de dedicação, de caráter, de amizade e de simplicidade.

Às três Marias, **Aline, Juliana e Marilu**, colegas de curso e muito mais do que isso, grandes amigas.

Ao companheiro de todos os dias, Médico Veterinário **Cássio**, braço direito nos momentos de maiores dificuldades e nos momentos de maiores descontrações.

Aos estudantes de graduação **Alexandre e Márcio** (hoje pós-graduandos) **Janice e Anderson** (hoje médicos veterinários), **Daniela, Luciana, Reno, Karen, Gilberto, Cristiano, Luciana, Maria Cláudia e Bruno**, pela ajuda imprescindível durante o trabalho de campo no Setor de Eqüideocultura e por vários momentos de alegria.

Aos funcionários do Setor de Eqüideocultura do DZO-UFV, **José Paulo, Dimas, Sebastião, José Antônio, Donizete, Júlio César, Roberto, Arcínio, Sílvio e Bernardo**, pelo apoio e amizade.

À **Beth**, minha professora de inglês, incentivadora e grande amiga.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, grande amiga **Rose**.

Ao funcionário do Laboratório de Reprodução Animal do DVT-UFV, **Sr. Nenzinho (Sr. José Cândido)**, pelos exemplos de humildade, dedicação e simplicidade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Luciano Andrade Silva, filho de Paulo Andrade da Silva e Lucila Maria Andrade Silva, nasceu em 01 de Novembro de 1975 em Bom Repouso - MG, nas altitudes da Serra da Mantiqueira, onde cursou o primeiro grau até 1990, na Escola Estadual Coronel Ananias de Andrade.

De 1991 a 1993 cursou o segundo grau no Colégio Universitário – COLUNI, na Universidade Federal de Viçosa.

Obteve diploma de Médico Veterinário, em Março de 1999, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em Agosto de 2001, iniciou o programa de Mestrado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

A **Felicidade** é um estado de espírito.

É fruto da nossa paz existencial e da realização natural de nossas
potencialidades,

Pode ser conquistada com atos simples, ingênuos, dedicados e de
coração.

Está ao alcance de todos.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito do dia da coleta sobre as taxas de recuperação embrionária em coletas efetuadas entre os Dias 6 e 9 (Dia 0 = ovulação)..... **14**
- Tabela 2.** Efeito do dia da coleta (Dia 0 = ovulação) no diâmetro (mm) do embrião..... **29**
- Tabela 3.** Critério de classificação do grau de qualidade de embriões eqüinos.. **32**
- Tabela 4.** Resultados obtidos após injeções intra-uterinas de diferentes volumes de solução salina a 0,9% (pré-experimento)..... **50**
- Tabela 5.** Eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal (injeções de 20 mL de solução NaCL 0,9%)..... **51**
- Tabela 6.** Comparação entre a avaliação global das IIU (notas atribuídas pelo operador no momento da IIU), com os pontos calculados posteriormente com base nas anotações das observações ultra-sonográficas..... **53**
- Tabela 7.** Freqüência de ocorrência do grau de qualidade de cada observação ultra-sonográfica do procedimento de IIU..... **54**
- Tabela 8.** Comparação entre resultados de eficiência em IIU realizadas com uma ou duas tentativas (perfurações)..... **55**
- Tabela 9.** Análise dos valores médios (\pm EPM) do tônus uterino, da ecotextura uterina, tempo (segundos), notas e escores entre os grupos com uma ou duas tentativas (perfurações) na IIU..... **55**
- Tabela 10.** Taxas de prenhez obtidas pelas técnicas de TE por IIU e via TC nas estações reprodutivas 2001/2002 e 2002/2003..... **60**
- Tabela 11.** Comparação dos valores médios, no Dia 7, do tônus e ecotextura uterina, notas e pontos versus técnicas de TE subdivididas em resultados de prenhez (estações 2001/2002 e 2002/2003)..... **61**
- Tabela 12.** Distribuição do número de vesículas embrionárias e seus percentuais nos dias da primeira detecção..... **101**
- Tabela 13.** Número médio de deslocamentos das vesículas embrionárias, entre os diferentes segmentos uterinos, em cada grupo..... **105**

Tabela 14. Distribuição do número de vesículas embrionárias fixadas por dia de detecção.....	106
Tabela 15. Observações ultra-sonográficas individuais dos parâmetros de eficiência da IIU, pontos calculados, nota atribuída imediatamente pós-IIU e resultado (observação de fluido no lúmen uterino).....	120
Tabela 16. Taxas de recuperação embrionária nas estações 2001/2002 e 2002/2003.....	121
Tabela 17. Tempo médio gasto no procedimento de recuperação embrionária nas estações 2001/2002 e 2002/2003.....	122
Tabela 18. Volume de déficit e percentual de fluido nos lavados de recuperação embrionária.....	122
Tabela 19. Número de embriões transferidos no Dia 7, subdivididos por classificação, técnicas de TE e estações reprodutivas.....	123

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Desenhos esquemáticos da técnica de lavagem uterina não-cirúrgica para recuperação embrionária. Posicionamento da sonda Bivona (A) e manipulação uterina para recuperação do fluido infundido (B).....**31**
- FIGURA 2.** Extensão plástica para procedimentos transvaginais, agulha de 16 ga e cateter para anestesia peridural humana (Foto A). Visualização aproximada do tubo e agulha dentro do canal guia metálico da extensão plástica (Foto B). Ilustração de todo equipamento utilizado nas injeções (Foto C).....**34**
- FIGURA 3.** Desenho esquemático da disposição das colunas de ar, meio de manutenção e do embrião no processo de envasamento.....**35**
- FIGURA 4.** Desenho esquemático da técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal.....**36**
- FIGURA 5.** Ultra-sonogramas da seqüência da injeção intra-uterina.....**37**
- FIGURA 6.** Divisão esquemática do útero em segmentos para mapeamento..**46**
- FIGURA 7.** Desenho experimental (Experimento 3).....**48**
- FIGURA 8.** Comparação da ecotextura uterina, do tônus uterino e da nota atribuída pelo operador à IIU entre as diferentes qualidades do parâmetro ejeção de fluido.....**56**
- FIGURA 9.** Comparação da influência da ecotextura uterina nas médias dos parâmetros pontos, notas e tônus.....**57**
- FIGURA 10.** Comparação da influência do tônus uterino nas médias dos parâmetros pontos, nota e ecotextura uterina.....**58**
- FIGURA 11.** Contratilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7 nos diferentes grupos.....**65**

-
- FIGURA 12.** Contratibilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7, nos subgrupos com DG positivo e DG negativo.....**66**
- FIGURA 13.** Contratibilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7, em éguas com DG positivo nos diferentes grupos.....**67**
- FIGURA 14,** Contratibilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7 em éguas com DG negativo nos diferentes grupos.....**69**
- FIGURA 15.** Contratibilidade uterina diária (média \pm EPM) nos diferentes grupos.....**72**
- FIGURA 16.** Contratibilidade uterina diária (média \pm EPM) nos subgrupos com DG positivo e DG negativo.....**73**
- FIGURA 17.** Contratibilidade uterina diária (média \pm EPM) nas éguas com DG positivo, nos diferentes grupos.....**74**
- FIGURA 18.** Contratibilidade uterina diária (média \pm EPM) nas éguas com DG negativo, nos diferentes grupos.....**75**
- FIGURA 19.** Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos diferentes grupos.....**76**
- FIGURA 20.** Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos subgrupos com DG positivo e DG negativo.....**77**
- FIGURA 21.** Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG positivo nos diferentes grupos.....**78**
- FIGURA 22.** Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG negativo, nos diferentes grupos.....**79**
- FIGURA 23.** Tônus uterino diário (média \pm EPM) nos diferentes grupos.....**80**
- FIGURA 24.** Tônus uterino diário (média \pm EPM) nos subgrupos com DG positivo e DG negativo.....**81**

- FIGURA 25.** Tônus uterino diário (média \pm EPM) em éguas com DG positivo nos diferentes grupos.....**82**
- FIGURA 26.** Tônus uterino diário (média \pm EPM) em éguas com DG negativo nos diferentes grupos.....**83**
- FIGURA 27.** Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos diferentes grupos.....**84**
- FIGURA 28.** Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos subgrupos com DG positivo e DG negativo.....**85**
- FIGURA 29.** Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG positivo nos diferentes subgrupos.....**86**
- FIGURA 30.** Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG negativo nos diferentes grupos.....**87**
- FIGURA 31.** Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) nos diferentes grupos.....**88**
- FIGURA 32.** Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) nos grupos com DG positivo e DG negativo.....**89**
- FIGURA 33.** Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) em éguas com DG positivo nos diferentes grupos.....**90**
- FIGURA 34.** Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) em éguas com DG negativo nos diferentes grupos.....**91**
- FIGURA 35.** Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) nos diferentes grupos, subdivididos em DG positivo e DG negativo.....**92**
- FIGURA 36.** Diâmetro do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes subgrupos com DG positivo e DG negativo.....**94**
- FIGURA 37.** Diâmetro do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG positivo.....**96**
- FIGURA 38.** Diâmetro do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG negativo.....**97**

FIGURA 39. Área do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes subgrupos com DG positivo e DG negativo.....	98
FIGURA 40. Área do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG positivo.....	99
FIGURA 41. Área do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG negativo.....	100
FIGURA 42. Distribuição diária do número de vesículas embrionárias no dia da primeira detecção.....	102
FIGURA 43. Distribuição diária do diâmetro médio das vesículas embrionárias no dia da primeira detecção.....	103
FIGURA 44. Distribuição do número de vesículas embrionárias fixadas por dia.....	106

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
BIOGRAFIA	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Ultra-sonografia	5
2.1.1. Histórico e Fundamentos da Técnica Ultra-sonográfica.....	5
2.1.2. Avaliação Ultra-sonográfica do Útero.....	6
2.1.3. Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina.....	7
2.2. Transferência de Embriões em Eqüinos	9
2.2.1. Introdução.....	9
2.2.2. Métodos Atuais de Transferência de Embriões em Éguas.....	10
2.2.3. Sincronização do Estro.....	12
2.2.4. Recuperação Embrionária.....	13
2.2.5. Avaliação da Qualidade Embrionária.....	16
2.2.6. Sub-fertilidade x Recuperação e Qualidade Embrionária.....	17
2.2.7. Seleção da Receptora.....	19

2.3. Manipulação Cervical e Liberação de Agentes Útero-cinéticos.....	19
2.4. Interações Maternas Embrionárias.....	22
2.4.1. Formação e Desenvolvimento Precoce do Embrião.....	22
2.4.2. Dinâmica do Embrião no Útero.....	23
3. OBJETIVO E HIPÓTESES.....	25
3.1. Objetivo Geral.....	25
3.2. Hipóteses.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Animais.....	28
4.2. Controle da Ovulação e Inseminações.....	28
4.3. Recuperação Embrionária.....	29
4.4. Transferência de Embriões (TE).....	33
4.4.1. Geral.....	33
4.4.2. TE pela Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina (TE por IIU).....	33
4.4.3. TE pela Técnica Transcervical Convencional (TE via TC).....	38
4.5. Experimentos.....	39
4.5.1. Experimento 1. Avaliação <i>In Vivo</i> da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina Via Transvaginal.....	39
4.5.1.1. Objetivo.....	39
4.5.1.2. Metodologia.....	39
4.5.1.3. Análises Estatísticas.....	40

4.5.2. Experimento 2. Comparação da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina com a Técnica Transcervical Convencional para a Transferência de Embriões.....	41
4.5.2.1. Objetivo.....	41
4.5.2.2. Metodologia.....	41
4.5.2.3. Análises Estatísticas.....	42
4.5.3. Experimento 3. Comparação dos Métodos de TE pelas Técnicas Ultra-sonográfica de IIU e Transcervical: Estudo da Contratilidade, Tônus e Ecotextura Uterina, de Corpo Lúteo e da Dinâmica da Vesícula Embrionária.....	43
4.5.3.1. Objetivo.....	43
4.5.3.2. Metodologia.....	43
4.5.3.3. Análises Estatísticas.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1. Experimento 1	49
5.1.1. Pré-experimento.....	49
5.1.2. Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de IIU.....	51
5.1.3. Parâmetros Ultra-sonográficos.....	52
5.2. Experimento 2	59
5.2.1. Estudo da Eficiência das Técnicas.....	59
5.2.2. Recuperação Embrionária.....	61
5.2.3. Qualidade Embrionária.....	63
5.3. Experimento 3	63
5.3.1. Estudo da Eficiência das Técnicas.....	63
5.3.2. Dinâmica Uterina.....	64
5.3.2.1. Contratilidade Uterina.....	64
5.3.2.2. Tônus Uterino.....	76
5.3.2.3. Ecotextura Uterina.....	84
5.3.3. Corpo Lúteo.....	93
5.3.4. Dinâmica da Vesícula Embrionária.....	101
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

8. APÊNDICE	120
8.1. Parâmetros Ultra-sonográficos	120
8.2. Recuperação Embrionária	121
8.3. Qualidade Embrionária	122

RESUMO

SILVA, Luciano Andrade, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto, 2003. **Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina para Transferência de Embriões em Equinos.** Orientador: Eduardo Leite Gastal. Conselheiros: Melba Oliveira Gastal e Eduardo Paulino da Costa.

Embriões eqüinos têm sido comumente transferidos por dois métodos: transcervical ou cirúrgico. As taxas de prenhez originadas pelo primeiro oscilam bastante, embora seja de mais fácil aplicação. O método cirúrgico tem originado taxas de prenhez mais elevadas e mais homogêneas. No entanto, é mais oneroso por demandar condições e pessoal especializados. Em 1998, GASTAL et al. desenvolveram uma técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (IIU) em eqüinos e a sugeriram como método alternativo para transferência de embriões (TE), pois evitaria algumas desvantagens da técnica transcervical advindas da manipulação cervical. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da técnica ultra-sonográfica de IIU como método alternativo de TE em eqüinos, comparando-a com a técnica transcervical (TC), assim como estudar a dinâmica uterina, do corpo lúteo e da vesícula embrionária. Para as injeções intra-uterinas foram utilizados transdutor setorial de 5 MHz, agulha de 16-ga e cateter colocados em uma extensão plástica para procedimentos transvaginais. A extensão foi introduzida na vagina e o operador tracionou o corno uterino contra a parede vaginal via transretal, posicionando-o frente à face do transdutor transvaginal. A IIU foi realizada quando o operador visualizou a ponta da agulha, do cateter e movimentos de vai-e-vem do cateter no lúmen uterino, por ultra-sonografia. As TE foram realizadas no Dia 7 (Dia 0 = ovulação). Diagnósticos de gestação foram realizados no Dia 15, por ultra-sonografia transretal. No Experimento 1, 33 IIU foram realizadas com 20 mL de solução estéril de NaCl a 0,9%. A eficiência da técnica foi verificada por pesquisa de fluido uterino imediatamente após as injeções, por meio de exame ultra-sonográfico transretal. No Experimento 2, 77 embriões foram transferidos por IIU (n=39) ou via TC (n=38), em duas estações reprodutivas. No Experimento 3, três grupos foram estudados: TE por IIU, TE via TC e Controle. O grupo Controle foi formado com

éguas previamente inseminadas e submetidas ao mesmo protocolo de coleta de dados dos grupos de TE. No Experimento 1, obteve-se taxa de sucesso de 97% (32/33) na deposição de solução salina no lúmen uterino por IIU. Adicionalmente, verificou-se que os parâmetros ultra-sonográficos de visualização da ponta da agulha, da ponta do cateter, dos movimentos de vai-e-vem e da ejeção de fluido, foram fundamentais na avaliação da eficiência da técnica de IIU. A taxa de recuperação embrionária total nas duas estações foi de 71,8% (122/170). No Experimento 2, as taxas de prenhez obtidas pelas técnicas de TE por IIU (76,9%; 30/39) e TE via TC (78,9%; 30/38), não diferiram ($P>0,05$). No Experimento 3, as taxas de prenhez das técnicas de TE por IIU (75,0%; 12/16), TE via TC (73,3%; 11/15) e do grupo Controle (68,7%; 11/16) foram similares ($P>0,05$). Nas TE por IIU e no grupo Controle não foram detectadas alterações na contratilidade uterina no Dia 7. No entanto, efeito estimulatório na contratilidade uterina foi detectado entre 5 a 60 minutos após TE via TC ($P<0,0001$). Não foram detectadas diferenças entre tônus e ecotextura uterina no Dia 7 entre as técnicas de TE e o grupo Controle. Entre os Dias 6 e 16 as éguas receptoras de embriões e do grupo Controle apresentaram o mesmo padrão diário de tônus e ecotextura uterina. Não foram detectadas alterações na vida média do corpo lúteo entre os grupos estudados. Os padrões de mobilidade da vesícula embrionária e o dia de fixação da mesma foram similares entre os grupos. Os resultados do presente estudo indicam que a técnica ultra-sonográfica de IIU é um método alternativo de TE, originando taxas de prenhez similares ao método transcervical. Esta pode ser uma opção valiosa para éguas com histórico de dificuldade de transposição cervical durante o procedimento de inovulação. Além disso, esta técnica poderá colaborar para estudos futuros de utilização de TE em outras espécies de animais domésticos e silvestres.

ABSTRACT

SILVA, Luciano Andrade, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2003. **Ultrasound-guided Intra-uterine Injection Technique for Embryo Transfer in Mares.** Advisor: Eduardo Leite Gastal. Committee Members: Melba Oliveira Gastal and Eduardo Paulino da Costa.

Embryo transfer (ET) in mares has been performed by transcervical or surgical methods. Pregnancy rates resulting from the transcervical method are more variable; however this is the more routine ET technique used nowadays. The surgical method has resulted in higher and less variable pregnancy rates. Although, this technique is much more invasive than the transcervical method and it demands a surgical environment and specialized personnel. In 1998, GASTAL et al. developed a transvaginal ultrasound-guided intra-uterine injection (IUI) technique and suggested it as a possible method for ET in mares. This technique would likely avoid cervical manipulation, one of the disadvantages of the transcervical ET technique. The objective of this study was to evaluate the efficiency of the IUI technique as an alternative method to the transcervical technique for ET in mares. In addition, dynamics of the uterus, corpus luteum, and embryonic vesicle were also studied. A real-time ultrasound scanner, equipped with a 5.0 MHz sector-array convex transducer, placed in a plastic extension for transvaginal procedures, a plastic epidural catheter (1.05 x 0.6 x 1000 mm), and a 16-ga needle (56 cm) were used. Immediately prior to ET, mares were sedated using detomidine (1 mg, i.v.). The right uterine horn was positioned transrectally against the vaginal wall over the transducer face. The needle with the catheter was introduced through the needle-guide of the transducer extension and inserted into the uterine lumen. The position of the catheter was verified by ultrasound and the embryo was placed into the uterus. Pregnancy diagnosis was done by ultrasound on Day 15. In Experiment 1, 33 IUI of 0.9% sterile saline (20 mL) were performed in 15 cyclic mares. The success of injection, indicated by the presence of fluid within the uterine lumen, was confirmed by transrectal ultrasonography. In Experiment 2, 77 embryos were transferred on Day 7 (Day 0 = ovulation) by IUI (n=39) or

transcervical method (n=38). In Experiment 3, 31 embryos were transferred on Day 7 by IUI (n=16) or transcervical method (n=15). The control group consisted of inseminated mares (n=16) which were subjected to the same protocol of data collection as the ET groups. In Experiment 1, the operator successfully deposited saline into the uterus in 97% (32/33) of the IUI procedures. The overall embryo recovery rate in Experiments 2 and 3 was 71.8% (122/170). In Experiment 2, the pregnancy rates resulting from IUI (76.9%) and transcervical (78.9%) ET techniques were not different ($P>0.05$). In Experiment 3, the pregnancy rates obtained from IUI (75.0%, 12/16), transcervical (73.3%, 11/15), and control (68.7%, 11/16) groups were similar. On Day 7, mares treated by transcervical ET displayed increased ($P<0.0001$) uterine contractility from 5 to 60 min following the procedure compared to the other groups. No changes in uterine contractility were observed between control and IUI treated mares. No differences in uterine tone or echotexture were detected among groups. From Days 6 to 16 there were no differences in daily uterine contractility, tone, and echotexture between ET treated and control mares. In addition, similar luteal lifespan was observed among treatments. Patterns of transuterine embryonic vesicle mobility and the day of embryo fixation were not different among groups. Results of the present study suggest that the ultrasound-guided IUI ET technique may be a suitable alternative to the traditional transcervical method of ET in mares. In addition, the IUI ET technique may be a valuable tool for future studies involving ET in other species.

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros sucessos da técnica de transferência de embriões (TE) na espécie eqüina foram obtidos na década de 70 (ALLEN & ROWSON, 1972; OGURI & TSUTSUMI, 1974). Apesar da substancial evolução da técnica nas últimas duas décadas (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; VOGELSANG et al., 1985; McKINNON & SQUIRES, 1988b; RIERA & McDONOUGH, 1993; SQUIRES & SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999), o insuficiente suporte financeiro para pesquisas e a adoção de determinadas normas e regulamentos por algumas associações de raças especializadas têm prejudicado os avanços no desenvolvimento e na aplicação de biotécnicas ligadas à reprodução eqüina.

Independentemente dos fatores acima mencionados, a TE em éguas tem sido considerada uma ferramenta capaz de incrementar a eficiência reprodutiva e o melhoramento genético da espécie, pois: 1) promove o aumento da descendência de éguas de alto potencial genético; 2) favorece o uso de éguas subférteis incapazes de levar a gestação a termo; 3) permite a utilização de potras, que podem produzir oócitos, porém não se encontram fisiologicamente preparadas para uma gestação; e 4) permite a obtenção de produtos de éguas envolvidas em programas de competição e/ou treinamento (CARNEVALE, 1996; SQUIRES et al., 1985a; EAST et al., 1998). Em relação ao aumento de descendentes, a TE em eqüinos tem permitido a obtenção de quatro ou mais potros de éguas férteis por estação (AGUILAR & WOODS, 1997). Além disso, a técnica como instrumento de pesquisa permite o estudo

mais profundo de vários aspectos da reprodução eqüina, tais como: 1) avaliação da fertilidade de garanhões (SQUIRES et al., 1984); 2) determinação do papel da tuba uterina e do útero na sobrevivência e na perda embrionária (PEYROT et al., 1987); 3) estudos da interação precoce entre o embrião e o útero, como a identificação do sinal embrionário por meio de liberação de prostaglandina E₂ (WEBER et al., 1991a,b), e; 4) determinação de causas de sub-fertilidade em éguas (BALL et al., 1986, 1987, 1989).

Diversos aspectos biológicos, bem como problemas associados às diferentes técnicas de transferência, têm limitado a difusão da TE na espécie eqüina quando comparado a outras espécies domésticas (SQUIRES et al., 1999). Dentre os fatores biológicos relacionados com a coleta de embriões podem ser citados: o dia da coleta, o número de ovulações por ciclo, a idade da doadora e a qualidade do sêmen. Por outro lado, as taxas de prenhez obtidas após a transferência têm sido relacionadas principalmente com o método de transferência utilizado, com a estação do ano, com o grau de sincronia entre doadora e receptora, com a idade e tamanho do embrião (SQUIRES et al., 1982a,b; 1999), com a qualidade do embrião e com o manejo da receptora (SQUIRES et al., 1999).

Vale ressaltar também que, comparado à espécie bovina, a eficiência da TE em eqüinos é baixa porque a recuperação embrionária ainda não pode ser aumentada satisfatoriamente pelos atuais métodos de superovulação (PALMER et al., 1993; McCUE, 1996). Enquanto a média de ovulações por ciclo em vacas superovuladas é de 11 a 12, em éguas obtém-se em torno de 3 a 7 ovulações por ciclo quando estimuladas com extrato de pituitária eqüina (AGUILAR & WOODS, 1997; ALVARENGA et al., 2000). Outro fator limitante na espécie eqüina é a baixa sobrevivência de embriões eqüinos quando submetidos a criopreservação (SEIDEL, 1996).

A TE em eqüinos tem sido realizada, basicamente, por dois métodos: o cirúrgico e o não-cirúrgico. Na técnica não-cirúrgica, os resultados variam muito, com taxas de prenhez oscilando entre 26 a 83% (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b; IULIANO et al., 1985; MULLER & CUNAT, 1993; RIERA & McDOUGH, 1993; FLEURY, 1998; SQUIRES et al., 2003). Por outro lado, com a TE pela técnica cirúrgica tem-se obtido taxas de prenhez com menor amplitude de variação, ou seja, mais homogêneas, em torno de 65 a 80% (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b; IULIANO et al., 1985; CARNEY et al., 1991; MULLER & CUNAT, 1993; SQUIRES & SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999).

Em 1974, OGURI & TSUTSUMI reportaram o primeiro resultado positivo de TE em eqüinos utilizando uma técnica de inovulação não-cirúrgica, via transvaginal, a qual evitava a manipulação cervical por meio do uso de injeção intra-uterina, e que tinha sido descrita anteriormente para bovinos por SUGIE (1965). Em 15 TE realizadas, obteve-se 40% de prenhez e 26,7% de nascimentos. Essa técnica foi, posteriormente, substituída pelas técnicas atualmente utilizadas.

PALMER et al. (1992), na tentativa de contornar os pobres resultados obtidos com a TE via transcervical em pôneis, desenvolveram uma técnica de TE alternativa. Por meio de procedimento cirúrgico de colpotomia, o corno uterino era puncionado para a realização da inovulação. Em 18 tentativas, os autores obtiveram 33,3 % de prenhez (6/18).

Em 1993, MULLER & CUNAT desenvolveram uma técnica de injeção intra-uterina transvaginal para TE em éguas, utilizando tubo de espéculo vaginal, similar à de SUGIE (1965). No entanto, baixa taxa de prenhez (38%; 3/8) foi obtida. De acordo com MULLER & CUNAT (1993), o limitante desta técnica consistiu em confirmar a penetração da agulha e do tubo com o embrião no lúmen uterino, o que não foi possível em algumas tentativas, visto que o procedimento com esta técnica foi feito sem monitoração visual.

Recentemente, GASTAL et al. (1998b) desenvolveram uma técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina, sugerindo sua utilização para a TE. Esta técnica de injeção intra-uterina, ao contrário das anteriormente citadas, permite a deposição de substâncias dentro do útero com total controle do procedimento de injeção pelo monitor do ultra-som, assegurando assim maior eficiência.

O principal objetivo de se testar métodos alternativos para TE não-cirúrgica é o desenvolvimento de técnicas que evitem ou minimizem o manuseio e a dilatação da cérvix durante o processo de TE. Tem sido sugerido que a manipulação excessiva dos órgãos genitais de éguas durante transferência não-cirúrgica de embriões está relacionada com a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SQUIRES et al., 1985a; KASK et al., 1997; SIROIS et al., 1987) e ocitocina (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000; HANDLER et al., 2003). A função biológica desses hormônios em estimular a musculatura lisa do útero pode ser um dos fatores responsáveis pelas baixas e inconstantes taxas de prenhez após a transferência não-cirúrgica de embriões em éguas (SQUIRES et al., 1985b; KASK et al., 1997; SIROIS et al., 1987). Além disso, a possibilidade de infecção uterina e de refluxo do embrião, devido à invasão e dilatação cervical, são também fatores que podem interferir negativamente nas taxas de prenhez quando da utilização da técnica de transferência não-cirúrgica de embriões via transcervical em éguas (SQUIRES et al., 1982a,b; 1999).

Em face do exposto acima e, principalmente devido à grande variação dos resultados obtidos com a técnica transcervical de TE na espécie eqüina, este trabalho foi delineado com o intuito de desenvolver e avaliar um método alternativo de transferência não-cirúrgica com o auxílio da ultra-sonografia visando obter taxas de prenhez mais homogêneas e elevadas, bem como tornar o uso desta tecnologia mais eficiente no manejo reprodutivo da espécie eqüina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ultra-sonografia

2.1.1. Histórico e Fundamentos da Técnica Ultra-sonográfica

A introdução da ultra-sonografia no monitoramento de eventos reprodutivos em éguas (PALMER & DRIANCOURT, 1980) representou um marco importante na ciência da reprodução animal em várias espécies. A principal vantagem da ultra-sonografia é ser um procedimento de caráter não-invasivo e atraumático, além de permitir resultados imediatos (GINTHER, 1995b). Um dos maiores avanços do uso da ultra-sonografia na reprodução de grandes animais foi o desenvolvimento de instrumentos específicos que permitem a realização de procedimentos ultra-sonográficos via transvaginal (SQUIRES, et al., 1988; PIETERSE et al., 1991; BRUCK et al., 1992; COOK et al., 1993; MEINTJES et al., 1995).

Além do exame clínico de rotina por imagem, diversas técnicas auxiliadas pela ultra-sonografia têm contribuído para o incremento da eficiência reprodutiva em várias espécies, como: 1) aspiração folicular guiada por ultra-sonografia em bovinos (PIETERSE et al., 1991; KANITZ et al., 1993) e eqüinos (BRUCK et al., 1992; CARNEVALE & GINTHER, 1993; COOK et al., 1993; MEINTJES et al., 1995); 2) recuperação de

oócitos e transferência intrafolicular em bovinos (BERGFELT et al., 1998) e eqüinos (CARNEVALE & GINTHER, 1993); 3) predição de ovulação em eqüinos (GASTAL et al., 1998a); 4) sexagem em eqüinos (CURRAN, 1989; 1993), entre outras.

Os aparelhos de ultra-sonografia usados para examinar o trato reprodutivo de grandes animais são do tipo B-modal em tempo real, ou seja, as imagens são formadas na tela em variadas tonalidades de cinza (variando do preto = ausência de brilho, até o branco = brilho máximo) e atualizadas em frações de segundos. O transdutor linear é orientado no plano longitudinal com relação ao corpo da fêmea. Dessa forma, imagens da cérvix e do corpo do útero são visualizadas longitudinalmente, enquanto os cornos uterinos aparecem em secção transversal (GRIFFIN & GINTHER, 1992; GINTHER, 1995a,b).

Transdutores com alta freqüência (5 a 7,5 MHz) fornecem imagens detalhadas de estruturas pequenas dos órgãos próximos ao transdutor e com boa resolução e, os de mais baixa freqüência (3 a 3,5 MHz) apresentam maior poder de penetração permitindo a visualização de estruturas maiores e distantes do transdutor porém, com resolução de imagem inferior aos anteriormente citados (GINTHER, 1995a,b).

2.1.2. Avaliação Ultra-sonográfica do Útero

O exame ultra-sonográfico do útero de éguas consiste em avaliações da ecotextura do endométrio, das contrações uterinas, do diâmetro dos cornos uterinos e de patologias como cistos e coleções de fluido. As alterações da ecotextura uterina em éguas são resultantes, primariamente, de mudanças no grau de edema das pregas endometriais (GINTHER & PIERSON, 1984; HAYES et al., 1985; GINTHER, 1986), as quais são influenciadas pela concentração sangüínea de esteróides ovarianos (GINTHER, 1993). O líquido intersticial nas pregas do endométrio, além de possíveis secreções das glândulas endometriais no lúmen uterino, são responsáveis pela formação da textura tecidual. A

ecotextura uterina visualizada pelo ultra-som é classificada por meio de um sistema de escores variando de 1 (mínimo – textura homogênea) a 4 (máximo – textura bastante heterogênea), baseado no grau de edema das pregas endometriais (HAYES et al., 1985).

A contratilidade uterina é determinada por meio de avaliação contínua do corpo uterino, visualizado em secção longitudinal, durante um minuto, com base nos movimentos de vai-e-vem dos pontos de reflexão do endométrio ou dos movimentos de ondas observados na superfície ventral do corpo do útero (CROSS & GINTHER, 1987; GRIFFIN & GINTHER, 1990).

Além dos exames sobre a dinâmica e morfo-estrutura do útero, a ultra-sonografia permite a visualização de cistos, coleções de fluidos, sejam elas límpidas ou purulentas, fetos e diversos tipos de debris, possibilitando o diagnóstico dessas patologias (GINTHER & PIERSON, 1984).

2.1.3. Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina

A técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via canal vaginal foi descrita por GASTAL et al. (1998b). Resumidamente, os autores utilizaram tubo de teflon ou polietileno (0,8 mm de diâmetro externo e 70 cm de comprimento) inserido em uma agulha longa (56 cm de comprimento) de 17 gauge. Ambos são introduzidos no canal guia metálico, que está acoplado à extensão plástica do transdutor linear convexo para procedimentos via transvaginal em grandes animais (FIG. 2 e 4, Materiais e Métodos, pp. 34 e 36). Após introdução no canal vaginal, o transdutor é girado (90°) para a visualização do segmento posterior do corno uterino direito em secção longitudinal. As paredes vaginal e uterina são perfuradas pela agulha a qual é visualizada na tela do ultra-som dentro do lúmen uterino. A confirmação do posicionamento da ponta do tubo no lúmen uterino é realizada por meio de movimentos de

vai-e-vem do tubo contra a parede oposta do endométrio (GASTAL et al., 1998b; FIG. 5, Materiais e Métodos, p. 37).

Gastal et al. (1998b) obtiveram eficiência de 96% (24/25) na injeção de substâncias útero-cinéticas no lúmen uterino. Foi também verificado que o procedimento de perfuração da parede vaginal e uterina não resultou em transtorno para o ambiente uterino, visto que não houve alteração na contratilidade uterina entre os grupos estudados. Sendo assim, esses pesquisadores sugeriram que a técnica poderia ser adaptada para a TE, pois permitiria o monitoramento constante, na tela do ultrassom, da injeção do fluido com o embrião no lúmen uterino.

Segundo os autores anteriormente citados, essa técnica pode apresentar vantagens em relação às outras técnicas de TE, devido ao fato de: 1) ser um procedimento rápido (1-2 min); 2) necessitar de leve tranquilização do animal; 3) ser um procedimento pouco invasivo; 4) não necessitar de muita manipulação do útero e de nenhuma manipulação cervical, evitando assim possível liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e ocitocina; e 5) ser um procedimento com mínimas chances de contaminação.

Mais recentemente, foi avaliada *in vitro*, em genitálias de abatedouro, a eficiência de referida técnica na deposição de substâncias e de oócitos no lúmen uterino. As taxas de sucesso da injeção variaram de 75,0 a 89,8%. Mostrou-se também que essa técnica é de rápida execução (MILLAN, 2001; GASTAL et al., 2002).

2.2. Transferência de Embriões em Equinos

2.2.1 Introdução

A TE em equinos tem sido uma biotecnologia utilizada em níveis crescentes nas duas últimas décadas em vários países, principalmente nos EUA, Brasil e Argentina. Animais com grande potencial genético, dentre eles, éguas velhas, éguas com pobre histórico reprodutivo e éguas em competição ou treinamento, são as maiores candidatas a esse procedimento, embora haja limitações impostas pelas associações de raças ao número de descendentes nascidos numa mesma estação (SQUIRES et al., 2003).

A ciência da reprodução assistida teve grandes avanços nos últimos anos. Técnicas de maturação *in vitro* (MIV) e de fertilização *in vitro* (FIV) de gametas têm sido realizadas com sucesso na espécie bovina, em humanos e em roedores. Infelizmente não se tem obtido os mesmos resultados na espécie eqüina (PISCOPO, 2000). Além dessas biotecnologias, a superovulação, o congelamento de embriões, a transferência de oócitos, a transferência de gametas intra-tubárica (GIFT) e o congelamento de oócitos, também não têm sido realizados comercialmente, em larga escala, nessa espécie (HINRICHS, 1998; SQUIRES et al., 2003).

Os primeiros relatos sobre TE em equinos datam da década de 70. OGURI & TSUTSUMI (1972), baseados em resultados positivos obtidos de TE via transcervical em bovinos, fizeram a primeira tentativa de TE em equinos utilizando essa via e não obtiveram sucesso. Em contrapartida, utilizando o método cirúrgico, ALLEN & ROWSON (1972) obtiveram o primeiro resultado positivo de TE em equinos. Posteriormente, OGURI E TSUTSUMI (1974), baseados na técnica de TE em bovinos por punção da parede vaginal e do corno uterino, utilizando o aparato de SUGIE (1965), obtiveram o primeiro resultado positivo de TE eqüina por um método não-cirúrgico.

O aparato de SUGIE (1965) constituiu-se por três tubos plásticos, um dentro do outro. O primeiro funciona como um espéculo vaginal, o segundo leva uma agulha em sua extremidade e o terceiro possui na extremidade um tubo plástico mais delgado que acondiciona o embrião e passa pela luz da agulha. A agulha transpassa a parede vaginal (próximo ao fórnix) e a parede uterina. O embrião no terceiro tubo é então depositado no lúmen uterino.

2.2.2. Métodos Atuais de Transferência de Embriões em Éguas

Os embriões eqüinos têm sido transferidos, convencionalmente, por dois métodos: o cirúrgico, por incisão no flanco, e o não-cirúrgico via transcervical (SQUIRES et al., 1985a).

O método não-cirúrgico, mais prático, tem sido mais utilizado entre técnicos e pesquisadores (SQUIRES et al., 1999). Os resultados obtidos por esse método variam muito, sendo observadas taxas de prenhez entre 26% a 83% (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b; IULIANO et al., 1985; MEIRA et al., 1990; MULLER & CUNAT, 1993; RIERA & McDOUGH, 1993; FLEURY, 1998; SQUIRES et al., 2003). Diversos fatores têm sido sugeridos estarem relacionados com as variações nas taxas de prenhez obtidas por meio da técnica não-cirúrgica de TE, tais como:

- 1) local de deposição do embrião;
- 2) danos sofridos pelo embrião durante a transferência;
- 3) possível expulsão do embrião do útero;
- 4) possível introdução de contaminantes dentro do útero;
- 5) manipulação excessiva da genitália durante a introdução do inovulador ou da pipeta contendo o embrião (HURTGEN & GRANJAM, 1979; IULIANO et al., 1985; LAGNEAUX & PALMER, 1989).

A TE pela técnica cirúrgica, com incisão no flanco, tem originado taxas de prenhez mais homogêneas variando entre 65 a 80% (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; IULIANO et al., 1985; CARNEY et al., 1991; MULLER & CUNAT, 1993; SQUIRES et al., 1982a,b; SQUIRES & SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000).

Estudos em éguas que compararam os dois métodos de transferência mostraram maiores taxas de prenhez após transferência cirúrgica que a não-cirúrgica (IMEL, 1981; SQUIRES et al., 1982b; IULIANO et al., 1985). Recentemente, CARNEVALE et al. (2000) compararam os dois métodos de TE (não-cirúrgica e cirúrgica) e obtiveram taxas de prenhez aos 12 dias de 47,4% (37/78) e 68,3% (381/558), e aos 50 dias de 39,7% (31/78) e 57,9% (323/558), respectivamente. No entanto, esses autores salientaram que os resultados superiores obtidos pela TE cirúrgica provavelmente tenham sido devido à melhor qualidade dos embriões utilizados (grau de qualidade $1,4 \pm 0,0$, TE cirúrgica vs $1,9 \pm 0,1$ TE transcervical; $P < 0,05$).

O procedimento cirúrgico é considerado por alguns técnicos como simples e de rotina e apresenta até o momento bons resultados e mais homogêneos. No entanto, trata-se de uma intervenção de caráter invasivo demandando pessoal altamente qualificado, tempo, equipamentos especiais e medicamentos (inclusive no pós-operatório), o que onera seu custo e torna sua aplicação questionável em termos práticos.

MULLER & CUNAT (1993), seguindo o princípio da técnica desenvolvida por SUGIE (1965) em bovinos e aplicada em eqüinos (OGURI & TSUTSUMI, 1974), desenvolveram uma outra técnica alternativa transvaginal de injeção intra-uterina para TE em éguas. Por esta técnica o embrião era depositado dentro de um tubo de teflon (1,0 x 0,7 mm de diâmetro e 50 cm de comprimento), o qual era colocado dentro de uma agulha de 1,2 mm de diâmetro e 48 cm de comprimento. A transferência era realizada "às cegas" com o auxílio de palpação retal e

de um tubo (espécuro) vaginal. A taxa de prenhez foi abaixo do esperado, aproximadamente 38% (3/8), sendo a confirmação da penetração da agulha e do tubo com o embrião no lúmen uterino o fator limitante nas injeções.

2.2.3. Sincronização do Estro

O grau de sincronia entre doadoras e receptoras é muito importante em programas de TE em eqüinos. Normalmente são selecionadas receptoras com sincronia entre -1 (ovulação um dia antes da doadora) a +3 (ovulação três dias após a doadora) não sendo as taxas de prenhez entre elas diferentes neste intervalo (DOUGLAS, 1982; IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; IULIANO, 1983; IULIANO et al., 1985; SQUIRES et al., 1982a, 1985a).

Adicionalmente, JACOB et al. (2002) concluíram recentemente, em estudo realizado com grande número de animais (n=384), que o grau de sincronia pode ser usado com maior flexibilidade em transferências transcervicais, podendo ser utilizadas receptoras com sincronia -1 a +5 sem interferências significativas nas taxas de prenhez.

A administração de PGF_{2a} é o método mais utilizado para a sincronização do estro, sendo dependente da presença e da funcionalidade do corpo lúteo. Éguas sem corpo lúteo ou que estejam ovuladas a menos de cinco dias não são candidatas a esse tratamento. Recomendam-se duas receptoras para cada doadora, sendo elas sincronizadas um a dois dias após a administração de PGF_{2a} na doadora (SQUIRES et al., 1985a; BERGFELT, 2000).

Outra forma de sincronização de estros é o uso de progestágenos. Estes hormônios são administrados por um período de 10 a 15 dias. Quando são removidos, o estro é exibido. O uso de PGF_{2a} permite a diminuição do tempo de tratamento de 15 para em torno de 8 dias.

Retirando o progestágeno e aplicando-se PGF_{2a} , normalmente a égua exibirá o estro dentro de 3 dias (BRISTOL, 1993; BERGFELT, 2000).

VENDRAMINI (1997), em estudo de sincronização de estro em jumentas francesas "Baudet du Poitou", obteve 70% das ovulações dos animais estudados entre os dias 6 a 10 após os tratamentos. Foram utilizados dois tratamentos. No tratamento misto utilizou-se a combinação de progestágeno por 8 dias com uma aplicação de prostaglandina, onde 65% dos animais ovularam entre os dias 7 e 10 pós-tratamento. No tratamento homogêneo utilizou-se duas aplicações de prostaglandina com intervalo de 15 dias, onde 76,5% dos animais ovularam entre os dias 6 e 10 pós-tratamento.

Com a seleção de duas receptoras por doadora pode ser necessária a estimulação da ovulação com a utilização de hCG. A administração de 2000 a 2500 UI de hCG no estro, após detecção de um folículo de 35 mm, induz a ovulação dentro de 24 a 48h pós-administração (SQUIRES et al., 1985a; PALMER, 1993).

2.2.4. Recuperação Embrionária

Vários fatores podem interferir na taxa de recuperação embrionária, como: 1) o dia da coleta; 2) o efeito do operador no lavado uterino, no rasteamento e na manipulação do embrião; 3) a idade da doadora; 4) efeito do garanhão ou dos tratamentos efetuados ao sêmen, entre outros (SQUIRES et al., 1985a,b).

O dia mais precoce para se efetuar o lavado é aquele em que o embrião já se encontra no útero. A maioria dos embriões passa da tuba uterina para o útero, em média, no Dia 5,5 (Dia 0 = ovulação). Contudo, tentativas de lavado antes e no Dia 6 resultam em baixas taxas de recuperação quando comparado aos Dias 7, 8 e 9 (TAB. 1). Nos Dias 8 ou 9 os embriões têm de 1 a 2 mm de diâmetro, são mais frágeis e podem ser visualizados macroscopicamente. Dessa forma, para se

recuperar embriões não muito pequenos ou não muito grandes, têm sido preconizados os Dias 7 e 8 como preferenciais para a coleta e TE em eqüinos (AGUILAR & WOODS, 1997).

Tabela 1. Efeito do dia da coleta sobre as taxas de recuperação embrionária em coletas efetuadas entre os Dias 6 e 9 (Dia 0 = ovulação).

Referência	P	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Castleberry et al. (1980)	$P < 0,05$	3/13 (23)	15/22 (68)	4/8 (50)	-
Bowen et al. (1985)	$P < 0,05$	12/23 (52)	-	25/31 (81)	-
Iuliano et al. (1985)	$P < 0,1$	21/32 (66)	68/90 (76)	50/61 (82)	-
Wade & Gallagher (1989)	$P > 0,05$	-	26/45 (58)	31/47 (66)	-
Squires et al. (1990)	$P < 0,05$	86/137 (63)	73/96 (76)	218/293 (74)	43/53 (81)
Meira et al. (1993)	$P > 0,05$	70/127 (55)	23/41 (56)	-	-
Médias		192/332 (58)	205/294 (70)	328/440 (75)	43/53 (81)

(Adaptado de AGUILAR & WOODS, 1997).

Outro fator limitante para se escolher o dia do lavado é o tamanho do embrião e sua adaptação à biotécnica que se propõe utilizar. Quando o interesse é congelar embriões, o ideal são embriões menores, preferencialmente coletados no Dia 6 (SQUIRES et al., 1985a,b).

Em levantamento de dados de três estações reprodutivas em programa comercial de TE, CARNEVALE et al. (2000) mostraram que não

há diferença de taxa de prenhez no Dia 12 quando transferidos embriões variando de 100 a 2000 µm. No entanto, a taxa de prenhez foi inferior quando transferências de mórulas foram comparadas à estágios mais avançados de desenvolvimento. Esses resultados confirmam os dados encontrados por IULIANO (1983) e IULIANO et al. (1985).

Para efetuar o lavado uterino, utiliza-se o método não-cirúrgico, descrito primeiramente em eqüinos por OGURI & TSUTSUMI (1972) que utilizaram um cateter de três vias. Esses autores efetuavam o lavado no corno ipsilateral à ovulação inflando o balão do cateter na base desse corno. Atualmente, o balão é inflado no corpo do útero com aproximadamente 60 mL de ar lavando-se os dois cornos simultaneamente (IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1984; ver FIG. 1, Materiais e Métodos, p. 31).

A solução mais utilizada para esse procedimento (VOGELSANG et al., 1979; IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a; MEIRA, 1990; SQUIRES & SEIDEL, 1995) é a solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco & Vogt modificada por WHITTINGHAN, 1971 (DPBS - contendo glicose, piruvato e 1% de soro fetal bovino). ALVARENGA et al. (1992) compararam as soluções DPBS e Ringer Lactato para lavado uterino. Esses últimos autores obtiveram taxas de prenhez de 57% (8/14) e de 64% (14/22) de embriões coletados respectivamente pelos meios citados e, lavados e transferidos em meio DPBS + 10% de soro fetal bovino. Outra opção para o lavado uterino tem sido a utilização de soluções com base tampão zwitterionic que têm demonstrado resultados positivos, principalmente de manutenção de embriões *in vitro*, superiores ao DPBS modificado quando utilizado em embriões bovinos (BARROS & BÉNYEI, 2000). Adicionalmente, recentes estudos demonstraram que os tampões zwitterionic podem ser utilizados satisfatoriamente na estocagem de embriões eqüinos a 5°C (McCUE et al., 2000; MOUSSA et al., 2002).

Pelo método não-cirúrgico de lavado uterino normalmente são utilizados de dois a três litros de solução dividida em alíquotas de 500 a

1000 mL, dependendo do tamanho do útero da doadora. A sonda ou cateter é acoplado 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, 2000). O volume recuperado representa normalmente de 95 a 98% do volume infundido (IMEL, 1981; CARVALHO, 2000).

Fatores ambientais estressantes podem interferir nas taxas de recuperação embrionária. CARVALHO (2000) mostrou que temperaturas ambientes elevadas no dia da ovulação da doadora diminuíram as taxas de recuperação embrionária dos animais nestas condições.

2.2.5. Avaliação da Qualidade Embrionária

“Uma análise ideal da competência do desenvolvimento embrionário poderia, dentro das espécies, e dentro de um determinado estágio de desenvolvimento pré-implantação, possuir a habilidade de, objetivamente *in vitro*, avaliar, identificar e distinguir embriões que são intrinsecamente competentes para se desenvolverem *in vivo* e, subseqüentemente, originar um indivíduo” (OVERSTRÖM, 1996).

A probabilidade de estabelecimento de prenhez depois da transferência é altamente dependente da qualidade do embrião (BALL et al., 1989b; CARNEY et al., 1991; VANDERWALL, 1996) e da higidez do útero da receptora (PASCOE et al., 1985).

A avaliação morfológica de rotina é um procedimento rápido, não-invasivo e requer equipamentos relativamente simples. A avaliação do embrião em programas de TE é visual, sendo necessário um técnico treinado para tal procedimento. Este procedimento é subjetivo e dependente de treinamento (BUTLER & BIGGERS, 1989; VANDERWALL, 1996).

O critério de classificação de embriões eqüinos (McKINNON & SQUIRES, 1988a) tem sido adaptado de bovinos e de estudos de criopreservação de embriões eqüinos (SLADE et al., 1985). Os embriões são classificados em graus de qualidade variando de grau 1 (excelente) a grau 5 (morto ou oócito não-fertilizado; ver TAB. 3, Materiais e Métodos, p. 32).

Em geral, embriões de pobre qualidade resultam em baixas taxas de prenhez e os de boa qualidade em altas taxas. Em transferências de embriões eqüinos, as taxas de prenhez, quando transferidos embriões de grau 1 ou 2, foram significativamente maiores comparadas às de embriões de grau 3 ou 4 (McKINNON & SQUIRES, 1988b; CARNEY et al., 1991; CARNEVALE et al., 2000).

2.2.6. Sub-fertilidade versus Recuperação e Qualidade Embrionária

O grau de fertilidade das éguas doadoras de embriões está diretamente relacionado com a taxa de recuperação e com a qualidade dos embriões e, o grau de fertilidade das éguas receptoras, com a taxa de prenhez. Doadoras com fluido uterino, um a dois dias após o estro, apresentaram taxa de recuperação embrionária inferiores às doadoras normais (McKINNON et al., 1987). Infecções uterinas têm sido reportadas como responsáveis por falhas na recuperação embrionária de éguas sub-férteis (DOUGLAS, 1982; PASCOE et al. 1985). Sugere-se que o processo inflamatório pode produzir substâncias embriotóxicas. PASCOE et al. (1985) demonstraram que patologias endometriais interferem na recuperação embrionária.

A idade e a higidez uterina e tubária da doadora podem também ter efeitos adversos na qualidade do embrião recuperado (BALL et al., 1989). Tem sido sugerido que a baixa taxa de recuperação embrionária é causada por falha da fertilização e/ou falha do transporte do oócito ou espermatozóide, ou por morte do embrião antes da coleta (SQUIRES et

al., 1985b). No entanto, BALL et al. (1986) sugeriram que a falha de fertilização pode não ser a maior causa de baixas taxas de prenhez em éguas subférteis, pois não encontraram diferença significativa nas taxas de fertilização no dia 2 entre éguas férteis e subférteis.

Semelhantes taxas de prenhez foram obtidas quando embriões de éguas subférteis ou embriões de éguas férteis foram transferidos para receptoras normais (DOUGLAS, 1982; SQUIRES et al., 1982a). BALL et al. (1987) transferiram embriões morfológicamente normais para úteros de éguas normais e de éguas subférteis, não encontrando diferença nas taxas de sobrevivência embrionária entre os dias 12 a 28. Contudo, as taxas de sobrevivência até 50 dias foram menores no grupo de éguas subférteis. SQUIRES et al. (1982a) foram os primeiros a reportarem a alta incidência ($P < 0,05$) de perda embrionária (entre os dias 35 e 50) em éguas subférteis (4/8) quando comparado às éguas férteis (2/15).

BALL et al. (1989b) recuperaram embriões no Dia 4 de tubas uterinas de éguas normais e subférteis, e transferiram para o útero de éguas normais. Tiveram menor taxa de prenhez com os embriões das éguas subférteis. Esses pesquisadores suspeitaram que os embriões das éguas subférteis possuísem algum defeito intrínseco ou que os mesmos podiam ter sofrido danos durante seu desenvolvimento dentro da tuba uterina até o Dia 4. GRONDAHL et al. (1993), reportaram que a ativação do genoma embrionário ocorre no quarto ciclo celular, entre os Dias 2 e 4 depois da ovulação. Sendo assim, pode-se especular que os oócitos de éguas subférteis podem ser fertilizados, mas sua capacidade de desenvolvimento poderá estar comprometida, o que será evidenciado quando seu genoma for ativado.

A transferência intra-tubária de gametas (GIFT) tem sido usada para estudar a baixa fertilidade em éguas velhas. Oócitos de éguas jovens e velhas foram transferidos por GIFT para receptoras jovens. Detectou-se a presença de vesícula embrionária em 92% dos oócitos de éguas jovens e em 31% dos oócitos de éguas velhas ($P < 0,001$; CARNEVALE & GINTHER, 1995). Esses resultados indicam

que oócitos defeituosos ocorrem mais em éguas velhas subférteis independentemente dos efeitos da tuba e de patologias uterinas.

2.2.7. Seleção da Receptora

O sucesso de um programa de TE é muito dependente da qualidade das receptoras. O histórico reprodutivo, o exame de rotina do trato reprodutivo e, se possível, citologia, cultura e biópsia uterina são parâmetros importantes para se escolher as melhores receptoras. Além disso, o estado corporal e as características fenotípicas também deverão ser considerados (SQUIRES et al., 1985a; SQUIRES et al., 1999; CARVALHO, 2000; RIERA, 2000).

Em estudo realizado com grande número de animais (638 TE), CARNEVALE et al. (2000) avaliaram receptoras em programa comercial de TE por meio de palpação e ultra-sonografia transretal. O tônus uterino e cervical, a morfologia do corpo lúteo (CL) e a presença de edema, cistos, fluido ou ar no útero foram avaliados. As receptoras foram classificadas como: 1) aceitáveis – CL bem definido, tônus uterino e cervical variando de bom a excelente, e nenhuma outra alteração no útero; e 2) marginalmente aceitáveis – imagem pobre do CL ou pouco tonicidade uterina ou cervical. Os autores comprovaram, baseados nas taxas de prenhez, que as receptoras classificadas como aceitáveis foram estatisticamente superiores àquelas classificadas como marginalmente aceitáveis.

2.3. Manipulação Cervical e Liberação de Agentes Útero-cinéticos

Em 1979, HURTGEN & GANJAM postularam que manipulações intra-cervicais ou intra-uterinas em éguas durante a fase luteal do ciclo estral estimularia direta ou indiretamente a liberação de luteolíticos endógenos (prostaglandinas) resultando na regressão do corpo lúteo.

A ação mecânica ou traumática no trato genital da fêmea pode ativar o processo de reação em cascata do ácido araquidônico, resultando na síntese e liberação de vários mediadores inflamatórios (HIGGINS & LEES, 1984), bem como de substâncias útero-cinéticas, tais como, PGF_{2a} (HURTGEN & GANJAM, 1979; BETTERIDGE et al., 1985; PASCOE et al., 1989; CADARIO et al., 1999; HANDLER et al., 2003) e ocitocina (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000; HANDLER et al., 2003).

A liberação de PGF_{2a} após a manipulação cervical no processo de transferência não-cirúrgica de embriões tem sido objeto de estudos (KASK et al., 1995; HANDLER et al., 2000). Entretanto, os resultados das pesquisas relacionadas ao efeito da manipulação uterina na liberação de PGF_{2a} são contraditórios. KASK et al. (1995; 1997) obtiveram concentrações plasmáticas elevadas de PGFM (15-cetodihidro-PGF_{2a}) após transferência transcervical de embriões. Por outro lado, SIROIS et al. (1987) e HANDLER et al. (2000) não encontraram incremento na concentração plasmática dessa substância após transferência não-cirúrgica de embriões em éguas. Contudo, HANDLER et al. (2003), encontraram pequenas elevações das concentrações plasmáticas de PGFM após certo grau de dilatação cervical. A discordância dos resultados destas pesquisas possivelmente está relacionada à diferença dos protocolos experimentais adotados, com relação à coleta de sangue para dosagem de PGFM e aos diferentes graus de estímulo ao trato genital. Sendo assim, a possibilidade dessa substância afetar o embrião e o ambiente uterino não pode ser ignorada em éguas submetidas à transferência transcervical (KASK et al., 1997).

Além da liberação de PGF_{2a} (HURTGEN & GANJAM, 1979; BETTERIDGE et al., 1985; PASCOE et al., 1989; CADARIO et al., 1999), a dilatação cervical e/ou palpação do útero, em combinação com inserção de objetos através da cérvix (ex: cateteres, pipetas, etc.), têm sido citados como responsáveis pela liberação de outro agente mioativo, a ocitocina (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000; HANDLER et al., 2003). A cascata luteolítica envolve a ocupação dos receptores de ocitocina no endométrio e subsequente síntese de PGF_{2a} (SHARP, 2000).

Em experimentos onde a cérvix de éguas prenhes e não-prenhes foram estimuladas, observou-se aumento dos níveis plasmáticos de ocitocina e aumento dos níveis de PGFM somente nas éguas não-prenhes (BETTERIDGE et al., 1985; SHARP et al., 1997).

Simulando a TE em eqüinos, KASK et al. (1995; 1997) observaram alterações na concentração de PGFM em duas éguas as quais tinham a cérvix fechada e conseqüentemente a passagem da pipeta foi dificultada.

HANDLER et al. (2003) investigaram o efeito da manipulação cervical sobre o ciclo estral e secreções de progesterona, PGFM e ocitocina. Um cateter foi introduzido na cérvix e seu balão foi inflado com o máximo de 50 mL de solução salina. A secreção de progesterona e a duração do diestro foram reduzidas. A concentração plasmática de ocitocina atingiu o pico máximo de liberação 30 minutos após a manipulação. As concentrações plasmáticas de PGFM praticamente não se alteraram com a manipulação.

Baseado no acima exposto, acredita-se que a liberação de agentes útero-cinéticos e luteolíticos possam colaborar em conjunto para a queda das taxas de prenhez em programas de TE em eqüinos.

Vale ressaltar que, em experimento realizado com utilização de substâncias útero-cinéticas, GASTAL et al. (1998) demonstraram que a ocitocina é capaz de elevar o tônus uterino sem interferir na contratilidade em éguas em anestro. Esses autores também demonstraram a capacidade da PGF_{2a} em elevar a contratilidade uterina em éguas vazias cíclicas.

2.4. Interações Maternas Embrionárias

2.4.1. Formação e Desenvolvimento Precoce do Embrião

A fertilização acontece na junção do ístimo com a ampola, na tuba uterina, e requer um oócito viável e um espermatozóide capacitado (McKINNON & SQUIRES, 1988a; VANDERWALL, 1996). Propõe-se que a prostaglandina E₂ (PGE₂), secretada pelos embriões, seja responsável pelo transporte do embrião no oviduto de éguas (WEBER et al., 1991a,b; ROBINSON et al., 1998). O embrião eqüino está na fase de mórula quando entra no útero, por volta do Dia 5,5 a 6,5 depois da ovulação (Dia 0 = ovulação; BETTERIDGE et al., 1982; FREEMAN et al., 1991; BATTUT et al., 1997). Contudo, o período entre a entrada no útero e a blastulação é muito pequeno, provavelmente menor que oito horas (SKIDMORE et al., 1989), não havendo diferença de diâmetro entre embriões na tuba uterina com aqueles que imediatamente entraram no útero (FREEMAN et al., 1991).

Na maioria dos mamíferos, os embriões e os oócitos não fertilizados entram no útero após ovulação (HARPER, 1988). Na égua, os embriões são seletivamente transportados para o útero, sendo os oócitos não fertilizados geralmente retidos no oviduto por meses depois da ovulação (BETTERIDGE & MITCHELL, 1974; FLOOD et al., 1979).

Nos embriões eqüinos, a mórula ou o blastocisto jovem está envolvido pela zona pelúcida. Quando a blastocela começa a se formar, uma cápsula acelular é depositada entre a camada de blastômeros e a zona pelúcida (ORIOLO et al., 1993). Sugere-se que proteínas uterinas e proteínas das células trofoblásticas formem a cápsula (BETTERIDGE, 1989). Com o rompimento da zona pelúcida, na eclosão do blastocisto, a cápsula persiste e envolve completamente o embrião até por volta do Dia 21 ou 22 (BETTERIDGE et al., 1982; ORIOLO et al., 1993). A cápsula permite que o embrião mantenha sua forma esférica e facilita sua migração pelo útero até o dia da fixação, Dia 15 ou 16 (GINTHER, 1983a,b). Além disso, é responsável pelas interações de proteção,

reconhecimento e adesão entre o embrião e o útero (CHU et al., 1997). A perda de ácido siálico pelas glicoproteínas por volta do Dia 16 possivelmente esteja relacionada com a fixação do embrião, sendo que a falha desse processo pode alterar as propriedades da cápsula e afetar a sobrevivência do embrião (ORIOLE et al., 1993; CHU et al., 1997).

2.4.2. Dinâmica do Embrião no Útero

Com o advento da ultra-sonografia, o fenômeno normalmente observado de fixação da vesícula embrionária e manutenção da gestação no corno uterino oposto à ovulação pôde ser compreendido. Descobriu-se que não era uma simples migração da vesícula embrionária para o corno oposto e sim, a cessação de um período de alguns dias de alta atividade móvel da vesícula embrionária por todo o útero da égua (GINTHER, 1983a; 1983b; 1985).

Depois de entrar no útero, o embrião é altamente móvel até sua fixação. A ultra-sonografia permitiu o monitoramento da mobilidade da vesícula embrionária que atinge um máximo no Dia 13 (GINTHER, 1983a; 1993; 1995b; GRIFFIN & GINTHER, 1990). Sabe-se que a mobilidade da vesícula embrionária em éguas é de suma importância para o processo de reconhecimento materno da gestação. A migração da vesícula embrionária provoca uma interação com o útero diminuindo ou modulando a secreção de PGF_{2a} e conseqüentemente impedindo a luteólise (GINTHER, 1985; SHARP, 2000; ALLEN, 2001).

A contratilidade uterina aumenta paralelamente ao aumento da mobilidade embrionária. Postulou-se que a presença da vesícula embrionária estimula o útero provocando aumento da contratilidade (GRIFFIN & GINTHER, 1993a; GINTHER, 1995a). Em outro experimento, com utilização de uma falsa vesícula de mesmo diâmetro da vesícula embrionária no Dia 13, demonstrou-se que a mobilidade desta foi menor. Comprovou-se assim, a existência da participação de fatores intrínsecos à vesícula embrionária estimulando a contratilidade

uterina, não bastando somente sua presença física (GINTHER, 1985; 1995b). O papel da vesícula embrionária como responsável pela sua própria mobilidade estimulando as contrações uterinas também foi confirmado por GASTAL (1998).

O dia exato da fixação da vesícula embrionária é definido como o dia da cessação de sua mobilidade, sendo verificada por meio de exames ultra-sonográficos repetidos, a cada 5 minutos, durante duas horas, e pela manutenção dessa fixação em exames diários repetidos (LEITH & GINTHER, 1984). A fixação da vesícula embrionária em éguas ocorre em média nos Dias 15 ou 16. Postulou-se que esta fixação é resultado de uma confluência do aumento do diâmetro da vesícula embrionária e da diminuição da luz uterina na flexura da base dos cornos, sendo esta diminuição associada ao aumento do tônus uterino nessa fase (GINTHER, 1983b, 1985; GASTAL, 1998).

3. OBJETIVO E HIPÓTESES

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (IIU) via transvaginal para transferência de embriões em éguas.

3.2. Hipóteses

- 1) A técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal é um método alternativo viável para transferência de embriões em éguas;
 - 2) A técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal possibilita a obtenção de taxas de prenhez maiores e mais homogêneas, quando comparada à técnica de transferência não-cirúrgica transcervical;
 - 3) A técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal não altera as contrações e a ecotextura uterina, visualizadas pela ultra-sonografia, bem como o tônus uterino, quando comparados com a técnica transcervical e com o grupo controle;
-

- 4) A técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal não afeta a vida média do corpo lúteo;

 - 5) A técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal não interfere na dinâmica da vesícula embrionária – mobilidade e fixação – quando comparada à técnica de transferência não-cirúrgica transcervical e ao grupo controle;

 - 6) A técnica ultra-sonográfica de IIU via transvaginal origina menor liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ uterina e ocitocina, quando comparada à técnica transcervical. Amostras de plasma sanguíneo foram coletadas, mas as dosagens hormonais não serão apresentadas nesta dissertação, sendo esta hipótese avaliada futuramente com os resultados inseridos em futuras publicações.
-

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os três experimentos desta dissertação foram desenvolvidos no Setor de Eqüideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, entre os meses de outubro a março, nas estações reprodutivas de 2001/2002 e 2002/2003.

Experimento 1: Avaliação *In Vivo* da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina Via Transvaginal;

Experimento 2: Comparação da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina com a Técnica Transcervical Convencional para a Transferência de Embriões;

Experimento 3: Comparação dos Métodos de TE pelas Técnicas Ultra-sonográfica de IIU e Transcervical: Estudo da Contratilidade, Tônus e Ecotextura Uterina, do Corpo Lúteo e da Dinâmica da Vesícula Embrionária.

4.1. Animais

Foram utilizadas éguas solteiras mestiças da raça Bretão-Postier com 3 a 15 anos de idade e peso vivo entre 350 e 600 kg. Todas as éguas apresentavam bom escore de condição corporal e foram mantidas em regime de pasto ou semiconfinadas, suplementadas com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, sal mineral *ad libitum* e concentrado (protéico e energético).

Éguas com atividade ovariana cíclica foram selecionadas mediante exame ginecológico completo por palpação e ultra-sonografia transretal no início de cada experimento. Aquelas que apresentaram qualquer anormalidade uterina ou ovariana foram descartadas. A caracterização de ciclicidade foi baseada na presença de corpo lúteo, pela avaliação do tônus e da ecotextura uterina, bem como pela existência de folículos =25 mm em crescimento (GINTHER, 1995b).

4.2. Controle da Ovulação e Inseminações

As éguas dos Experimentos 2 e 3 foram monitoradas por palpação ou ultra-sonografia transretal para acompanhamento da dinâmica ovariana e detecção do dia da ovulação (Dia 0). Avaliou-se a presença do corpo lúteo, o grau de edema (ecotextura), o tônus e a presença de fluido no lúmen uterino. Éguas que apresentavam folículos com diâmetro médio <30 mm foram monitoradas a cada 48 h e aquelas com diâmetro médio =30 mm foram monitoradas diariamente até o dia da ovulação.

As éguas doadoras e receptoras foram escolhidas aleatoriamente entre os animais com folículos =30 mm na estação reprodutiva 2001/2002. Na estação reprodutiva 2002/2003 foram selecionadas 10 éguas doadoras de embrião permanecendo as mesmas até o final do experimento.

Na estação reprodutiva 2001/2002 as éguas doadoras foram inseminadas a cada 48 h até a ovulação com sêmen fresco colhido de garanhões com fertilidade conhecida, do Setor de Eqüideocultura da UFV, e diluído em meio base de leite em pó desnatado com glicose (Meio Kenney modificado; VARNER, 1986).

Na estação reprodutiva 2002/2003, seguindo a mesma metodologia de manipulação do sêmen empregada na estação 2001/2002, foram utilizados 2 garanhões sendo a utilização destes distribuída entre os tratamentos.

D-Cloprostenol (75 µg – Prolise^R, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e hCG (2500 UI – Ovusyn^R, Tecnopec, São Paulo, Brasil) foram usados com o objetivo de promoção de luteólise precoce e de indução de ovulação, respectivamente.

4.3. Recuperação Embrionária

Os embriões, nos Experimentos 2 e 3 para todos os tratamentos, foram recuperados no Dia 7 por melhor se adaptarem aos cateteres utilizados na técnica de transferência de embriões por injeção intra-uterina (IIU) guiada por ultra-sonografia. A TAB. 2 demonstra o diâmetro médio e a variabilidade de tamanho de embriões eqüinos entre os dias 6 a 9 pós-ovulação.

Tabela 2. Efeito do dia da coleta (Dia 0 = ovulação) no diâmetro (mm) do embrião.

Dia da coleta	No. embriões	Média	Varição
6	121	0,208	0,132-0,756
7	144	0,406	0,136-1,460
8	142	1,132	0,120-3,980
9	41	2,220	0,730-4,520

(SQUIRES et al., 1985a).

As éguas doadoras eram conduzidas ao brete de contenção e seu preparo consistia em bandagem e suspensão da cauda, retirada das fezes da ampola retal e anti-sepsia da região do períneo com água e sabão neutro.

O útero das éguas doadoras era lavado com três alíquotas de aproximadamente 1 litro de solução Ringer lactato de sódio a 37°C (ALVARENGA et al., 1992), sendo utilizado no máximo 3 litros de solução por lavado. O útero era cateterizado com uma sonda flexível com balão inflável na extremidade, tipo Bivona, acoplada a uma conexão em Y com dois tubos de silicone formando um circuito com duas vias (entrada e saída). Após a sonda ser transpassada pela cérvix via transvaginal, seu balão era inflado com 60 mL de ar e ela era então tracionada caudalmente para se ajustar no óstio cranial da cérvix (FIG. 1).

Na primeira alíquota do lavado, a solução de Ringer lactato de sódio (Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) infundida por gravidade, era retida no útero por 3 minutos antes de ser recuperada. Objetivava-se com esse tempo de espera conseguir uma boa distribuição da solução pelo útero, além de estimular as contrações uterinas que facilitaríamos a expulsão da mesma na recuperação (HINRICHS et al., 1987).

A solução era recuperada por gravidade, sendo esse processo auxiliado por manipulação uterina transretal, passando por um filtro milipore (75 µm, Millipore, Brasil) para coleta de embriões (FIG. 1). Em torno de 30 a 50 mL da solução e o possível embrião ficavam retidos neste filtro. O excedente era descartado em recipiente com graduação de volume para conhecimento e controle dos possíveis déficits de recuperação. Após a infusão das três alíquotas do lavado, o filtro era encaminhado ao laboratório de manipulação embrionária.

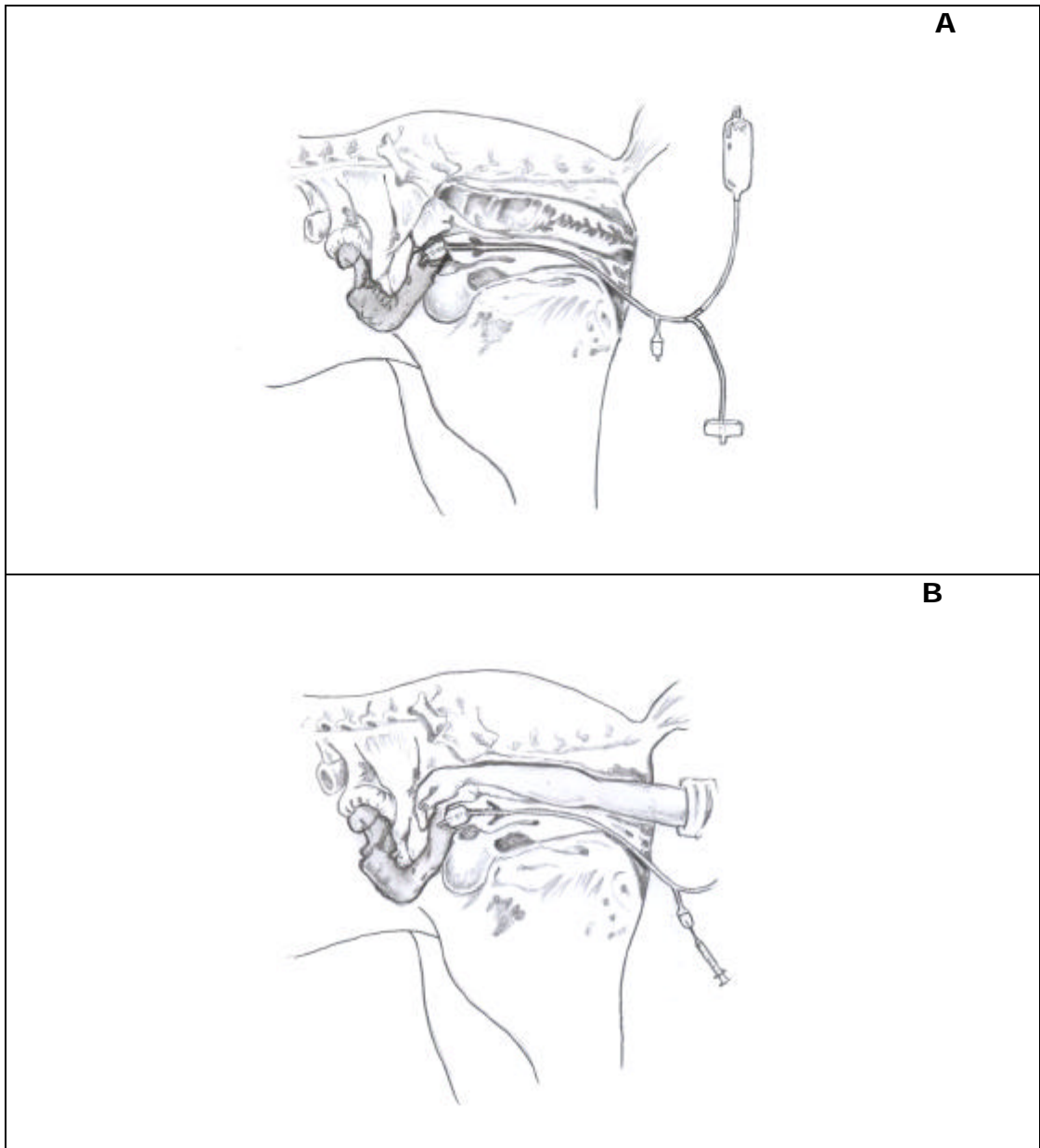


Figura 1. Desenhos esquemáticos da técnica de lavagem uterina não-cirúrgica para recuperação embrionária. Posicionamento da sonda Bivona (A) e manipulação uterina para recuperação do fluido infundido (B).

No laboratório, o excesso da solução de Ringer lactato de sódio do filtro era descartado e, o menor volume possível de solução transferido para uma placa de Petri riscada para rasteamento embrionário. O filtro

era lavado com solução tampão de lavagem (30 mL; Meio Zwitteronic, Cultilab, Campinas, Brasil) sendo este conteúdo também transferido para a placa de Petri. Objetivava-se, com esse procedimento, ter certeza que o embrião não tinha ficado aderido à película do filtro e ao mesmo tempo oferecer um meio tampão mais apropriado à manutenção do embrião durante o rasteamento e manipulação.

Com o auxílio de um microscópio esterioscópico (aumento 40X), o embrião era rasteado e avaliado, sendo seu grau de qualidade classificado de 1 a 5 (TAB. 3; McKINNON & SQUIRES, 1988a). Depois disso, o embrião passava por uma série de 10 lavagens (STRINGFELLOW, 1998) em meio de manutenção (Meio Zwitteronic + 0,4% BSA, Cultilab, Campinas, Brasil) e estava então pronto para ser envasado e transferido.

Tabela 3. Critério de classificação do grau de qualidade de embriões eqüinos.

Grau 1	Excelente – embriões ideais, esféricos, com tamanho, cor e textura das células uniformes
Grau 2	Bom – pequenas imperfeições como poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação do trofoblasto
Grau 3	Razoável – com problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocele colapsada
Grau 4	Pobre – com problemas sérios como blastocele colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária
Grau 5	Não fertilizado ou morto – oócito não fertilizado ou embrião totalmente degenerado

(Adaptado de McKINNON & SQUIRES 1988a)

4.4. Transferência de Embriões (TE)

4.4.1 Geral

Os embriões foram transferidos pela técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina ou pela técnica transcervical.

Antes da inovulação, foram selecionadas as melhores receptoras por meio de palpação transretal e ultra-sonografia. Estas foram caracterizadas como aceitáveis se tivessem um corpo lúteo com boa definição, baixa ecotextura uterina (pouco edema), boa tonicidade uterina e cervical, e ausência de coleção de fluido ou qualquer outra patologia (CARNEVALE et al., 2000).

Para todas as transferências de embriões, a receptora era conduzida a um brete de contenção, sendo a região perineal preparada assepticamente como já descrito para a recuperação embrionária. As receptoras, em todos os experimentos e tratamentos, eram sedadas com sub-dose de detomidina, 1 mg/animal (Dormosedan^R; Pfizer Animal Health, West Chester, PA).

4.4.2. TE pela Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina (TE por IIU)

Para o procedimento de TE pela técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina utilizou-se um aparelho de ultra-sonografia (Aloka SSD-500, Aloka, Wallingford, CT), equipado com transdutor convexo de 5,0 MHz, acoplado a uma extensão plástica para procedimentos transvaginais em grandes animais (FIG. 2).

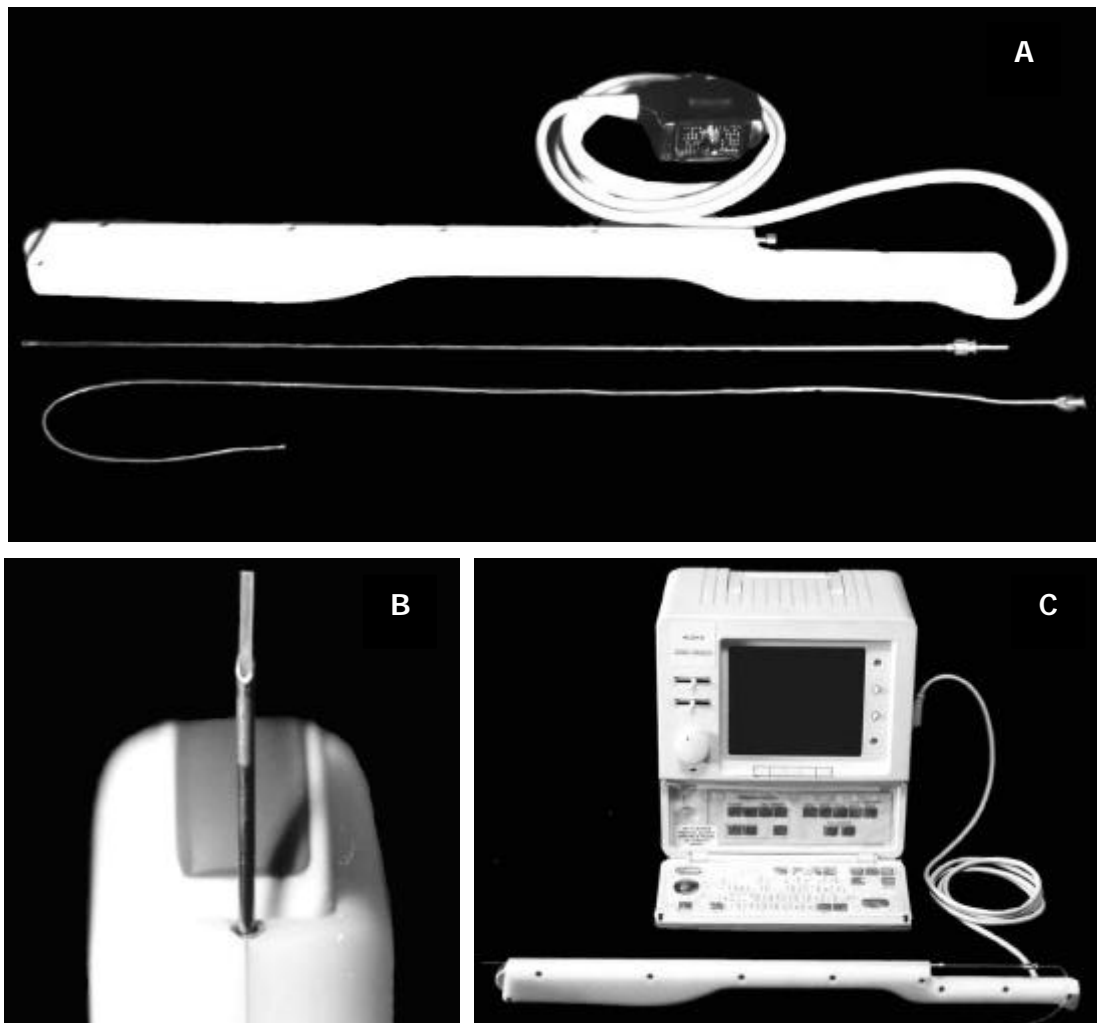


Figura 2. Extensão plástica para procedimentos transvaginais, agulha de 16 ga e cateter para anestesia peridural humana (Foto A). Visualização aproximada do tubo e agulha dentro do canal guia metálico da extensão plástica (Foto B). Ilustração de todo equipamento utilizado nas injeções (Foto C).

Foram utilizados, para a inovulação, cateteres flexíveis de polietileno com aproximadamente 0,8 mm de diâmetro externo, 0,6 mm de diâmetro interno e 100 cm de comprimento (cateter para anestesia peridural de humanos, PERISAFE^R BD, NJ, USA ou PERIFIX^R – B.Braun, Alemanha).

O embrião era envasado neste cateter em porções alternadas de meio de manutenção e ar (FIG. 3). A primeira coluna era composta de solução, a segunda de ar, a terceira de solução com o embrião no centro, a quarta de ar e, finalmente, a quinta de solução, completando o volume total de 0,5 mL. O tubo de transferência era acoplado à agulha de 16 gauge com 55 cm de comprimento e esta, ao guia metálico na extensão plástica do transdutor.

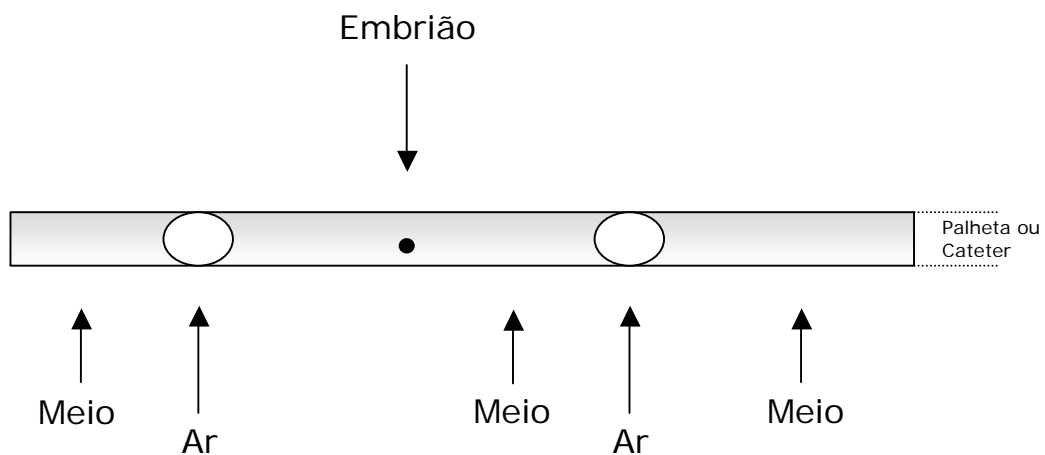


Figura 3. Desenho esquemático da disposição das colunas de ar, meio de manutenção e do embrião no processo de envasamento.

O transdutor convexo, já preparado assepticamente com a extensão para procedimentos transvaginais, era devidamente protegido por camisa sanitária (preservativo humano Blowtex^R, São Paulo, Brasil) e por luva plástica descartável estéril aberta na extremidade, sendo então levado à sala de TE junto à receptora.

O aparato de procedimentos transvaginais (transdutor, extensão, agulha e cateter), devidamente preparado e conectado ao console do aparelho de ultra-som, era introduzido na vagina da receptora. O corno

uterino direito era palpado via transretal e o segmento médio devidamente tracionado frente à parede parietal da vagina e ao transdutor, sendo a imagem deste localizada na tela do ultra-som. O transdutor era girado (90°) para a visualização do corno uterino direito em secção longitudinal. As FIG. 4 e 5 mostram, em forma esquemática, as seqüências dos procedimentos executados durante a técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (GASTAL, 1998; GASTAL et al., 1998b) que foi adaptada para a TE.

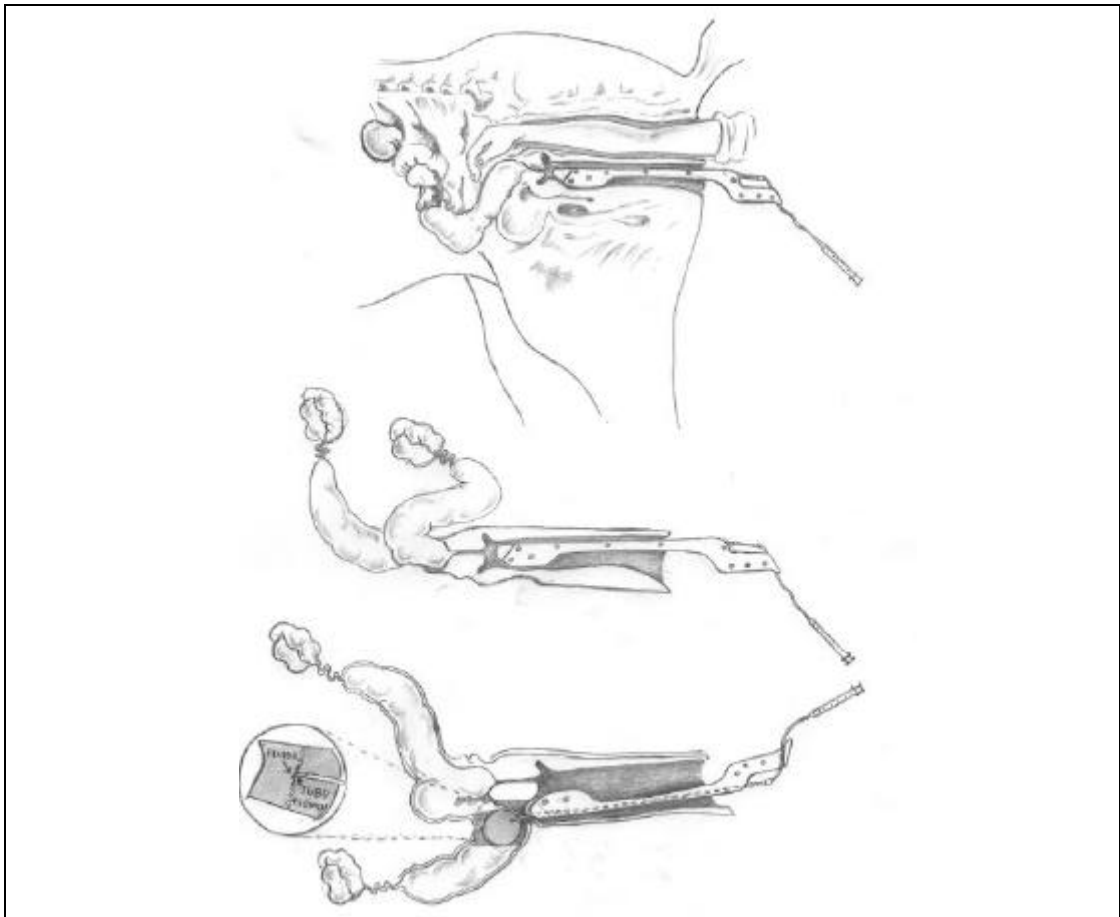
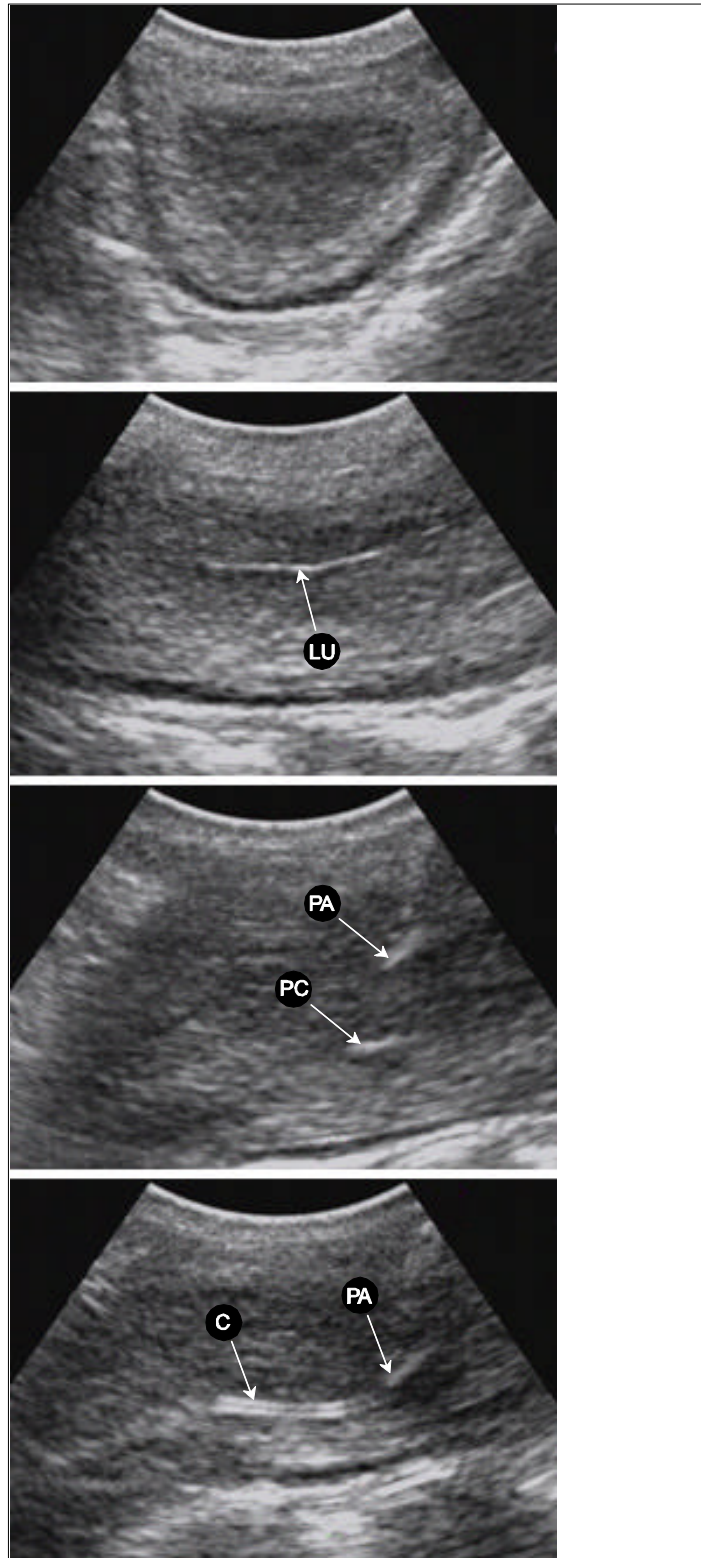


Figura 4. Desenho esquemático da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal. O transdutor acoplado à extensão plástica para procedimentos transvaginais é introduzido na posição vertical até atingir o fórnix vaginal (perfil lateral). O alvo é o segmento médio do corno. O transdutor é girado no fórnix vaginal do lado da cérvix antes da injeção (perfil dorsal). Adaptado de GASTAL et al. (1998b).



LU. Lúmen uterino
PA. Ponta da agulha
PC. Ponta do cateter
C. Cateter

Figura 5. Ultra-sonogramas da seqüência da injeção intra-uterina. Corte transversal (primeiro ultra-sonograma) e cortes longitudinais do corno uterino.

4.4.3. TE pela Técnica Transcervical Convencional (TE via TC)

Para as TE transcervicais as receptoras foram preparadas da mesma forma descrita para a técnica de TE por IIU.

O embrião foi envasado em palheta plástica de 0,25 mL de volume em porções alternadas de solução de manutenção e ar (FIG. 3). A primeira coluna era composta de solução, a segunda de ar, a terceira de solução com o embrião no centro, a quarta de ar e, finalmente, a quinta de solução, completando o volume total da palheta. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero.

A palheta foi acoplada a uma bainha francesa de TE (Bainha Azul, IMV, Brasil) juntamente com o aplicador metálico para TE. Todo esse aparato era protegido por uma camisa sanitária (IMV, Brasil) estéril para bainhas de TE.

O aparato montado, com o auxílio da mão protegida por luva descartável estéril, era introduzido na vagina da receptora. Localizada a cérvix, a ponta do aparato era introduzida nesta e a camisa sanitária retirada por tração. Após máxima introdução pela cérvix, o embrião era depositado no corpo uterino.

4.5. Experimentos

4.5.1. Experimento 1

Avaliação *In Vivo* da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina Via Transvaginal.

4.5.1.1. Objetivo

Determinar a eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (IIU) via transvaginal guiada por ultra-sonografia para deposição de fluidos no lúmen uterino.

4.5.1.2. Metodologia

Quinze éguas cíclicas foram utilizadas e 33 injeções foram realizadas, em 3 sessões a cada 48h. Utilizou-se o mesmo aparato descrito para TE pela técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina.

O posicionamento da ponta do tubo de transferência dentro do lúmen uterino foi feito pela imagem ultra-sonográfica e a confirmação de sua localização por meio de movimentos de vai-e-vem deste contra a parede oposta do endométrio (GASTAL et al., 1998b). Imediatamente foram injetados 20 mL de solução estéril de NaCl a 0,9%.

A eficiência da técnica foi verificada logo após a injeção por exame ultra-sonográfico via transretal com transdutor linear de 5 MHz para identificação de uma coleção intra-uterina da solução injetada (imagem anecóica, no lúmen uterino).

O grau de certeza da inserção da agulha no lúmen uterino, no momento da injeção, foi estimado com base em escores variando de 1 a 4 (1=25%, 2=50%, 3=75% e 4=100%) e representou a nota do procedimento. A estimativa do escore foi mediante visualização da ponta da agulha e do tubo de transferência de embriões no monitor do ultra-

som, os quais foram caracterizados pela identificação dos pontos ecogênicos no lúmen uterino (FIG. 5), pelos movimentos de vai-e-vem do tubo contra o endométrio e pela ejeção (fluxo) da solução injetada. Quando esses parâmetros foram claramente identificados pelo operador, a estimativa do grau de certeza recebeu escore máximo.

Também foram registrados o número de perfurações por procedimento, o tempo gasto para cada injeção, bem como os resultados positivos e negativos.

4.5.1.3. Análises Estatísticas

Dados qualitativos foram analisados utilizando-se SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), por meio de:

- 1) Teste de Qui-quadrado para avaliação da frequência das taxas de prenhez em relação ao número de tentativas de IIU;
- 2) Teste de Wilcoxon para comparação pareada, das notas atribuídas pelo operador nas IIU, com os pontos calculados com base somente nos parâmetros de observação ultra-sonográfica;
- 3) Teste de Mann & Whitney para comparação das médias de tônus, ecotextura, pontos e notas entre dois grupos experimentais com dados não pareados, podendo o número amostral ser variado entre os grupos;
- 4) Teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias de tônus, ecotextura, pontos e notas entre mais de dois grupos experimentais com dados não pareados, podendo o número amostral ser variado entre os grupos.

Dados quantitativos foram analisados utilizando-se SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), por meio de:

- 1) ANOVA para detecção de diferenças entre médias do tempo gasto nas IIU realizadas em uma ou duas tentativas.

Probabilidades de $P < 0,05$ indicaram diferença significativa.

4.5.2. Experimento 2

Comparação da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina com a Técnica Transcervical Convencional para a Transferência de Embriões.

4.5.2.1. Objetivo

Comparar a eficiência das duas técnicas não-cirúrgicas para transferência de embriões em eqüinos.

4.5.2.2. Metodologia

Quarenta e cinco éguas cíclicas, doadoras e receptoras, foram utilizadas nesse experimento na estação reprodutiva de 2001/2002 e trinta e cinco, doadoras e receptoras, na estação reprodutiva de 2002/2003.

As éguas doadoras e receptoras foram preparadas e manejadas conforme metodologia já descrita. No dia 7 o embrião foi recuperado, rastreado, classificado, manipulado em lavados seriados e envasado. Apenas os embriões classificados como excelentes e bons (grau 1 e 2; McKINNON & SQUIRES, 1988a) foram utilizados nas transferências.

Este experimento foi constituído por dois tratamentos: 1) TE pela técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (n=39, sendo 23 na estação 2001/2002 e 16 na estação 2002/2003); 2) TE pela técnica transcervical não-cirúrgica convencional (n=38, sendo 23 na estação 2001/2002 e 15 na estação 2002/2003).

O escore atribuído à injeção foi baseado na observação detalhada de todo o processo de injeção ultra-sonográfica, semelhante ao Experimento 1.

No dia 15 foram realizados os diagnósticos de gestação por meio de exame ultra-sonográfico para observação da presença da vesícula embrionária e de seu diâmetro médio. No caso de diagnóstico negativo foi efetuado exame ginecológico detalhado e o animal recebeu uma dose de droga luteolítica (75 µg de cloprostenol, Prolise^R, Tecnopec, Brasil).

4.5.2.3. Análises Estatísticas

Dados qualitativos foram analisados utilizando-se SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), por meio de:

- 1) Teste de Qui-quadrado para comparação das taxas de prenhez das duas técnicas de TE e das taxas de recuperação embrionária entre estações reprodutivas;
- 2) Teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias de tónus, ecotextura, pontos e notas entre mais de dois grupos experimentais com dados não pareados, podendo o número amostral ser variado entre os grupos.

Dados quantitativos foram analisados utilizando-se SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), por meio de:

- 1) ANOVA para detecção de diferenças entre as médias do tempo gasto na recuperação embrionária entre estações.

Probabilidades de $P < 0,05$ indicaram diferença significativa.

4.5.3. Experimento 3

Comparação dos Métodos de TE pelas Técnicas Ultra-sonográfica de IIU e Transcervical: Estudo da Contratilidade, Tônus e Ecotextura Uterina, do Corpo Lúteo e da Dinâmica da Vesícula Embrionária.

4.5.3.1. Objetivo

Determinar os efeitos do procedimento da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina e da técnica de transferência de embriões via transcervical na dinâmica uterina, com especial atenção à contratilidade, tonicidade e ecotextura, desenvolvimento do corpo lúteo e dinâmica da vesícula embrionária.

4.5.3.2. Metodologia

Trinta e cinco éguas cíclicas foram utilizadas nesse experimento na estação reprodutiva de 2002/2003.

Este experimento foi constituído de três grupos: 1) TE pela técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (n = 16); 2) TE não-cirúrgica transcervical (n = 15); e 3) Controle – éguas previamente inseminadas e avaliadas 7 dias após a ovulação (n = 16).

Os grupos de TE (grupos 1 e 2) foram os mesmos do Experimento 2 (estação 2002/2003). Neste experimento um grupo controle foi incluído e comparações de taxa de prenhez, da dinâmica uterina, do corpo lúteo e da vesícula embrionária foram efetuadas entre os três grupos.

O grupo 3 (Controle) foi constituído por éguas doadoras inseminadas. No Dia 7 não foi efetuado o lavado para recuperação embrionária e, essas éguas, entraram no experimento seguindo o mesmo protocolo de coleta de dados realizados nas receptoras de embriões dos grupos 1 e 2. O objetivo foi ter um padrão fisiológico de todos os parâmetros analisados sem as manipulações efetuadas nas técnicas de TE.

O preparo dos animais, o manejo, as inseminações, a coleta, a avaliação dos embriões e as transferências pela técnica ultra-sonográfica ou pela técnica transcervical foram realizados como já descrito anteriormente no Experimento 2. Escores de eficiência (1-4) foram atribuídos as TE realizadas nos grupos 2 e 3.

Todos os três grupos tiveram o mesmo protocolo de coleta de dados conforme desenho experimental, apresentado na FIG. 7.

No Dia 6, e do Dia 8 (Dia 0 = ovulação e Dia 7 = dia da TE) até o dia da fixação embrionária, toda receptora passou pelo seguinte protocolo de coleta de dados:

1) amostra de sangue para análises hormonais: 10 mL de sangue coletado por punção da veia jugular, em tubo de vidro tipo vacuntainer com EDTA a 10% (0,3 mL) e centrifugado por 10 minutos a 500g. O plasma foi imediatamente transferido para tubos de polietileno e congelado em freezer a -20°C. Como mencionado anteriormente, as análises hormonais não serão apresentadas nesta dissertação de mestrado, sendo elas incluídas posteriormente em futuras publicações originadas deste trabalho;

2) avaliação da contratilidade: estimada com base em sistema de escore (1 = mínimo e 4 = máximo) por meio de exame ultra-sonográfico durante 1 minuto em secção longitudinal do corpo uterino (CROSS & GINTHER, 1987; GRIFFIN & GINTHER, 1990);

3) avaliação do tônus: estimado por meio de compressão digital transretal de cada corno uterino e classificados com base em sistema de escore variando de 1 a 4 (mínimo a máximo; HAYES et al., 1985);

4) avaliação da ecotextura uterina: feita por ultra-sonografia (GINTHER, 1995b) e classificada em escores variando de 1 (sem edema) a 4 (muito edemaciada);

5) mensuração do diâmetro médio e área do corpo lúteo. O diâmetro médio foi calculado pela média das duas maiores medidas perpendiculares na mesma imagem congelada e a área pelo contorno desta, sendo calculada pelo aparelho de ultra-som.

No Dia 7 (dia da TE; Tempo 0 = momento da TE) a coleta de dados obedeceu ao seguinte protocolo (FIG. 7) com as mesmas metodologias já descritas anteriormente:

1) amostras de sangue para análises hormonais: colhidas nos tempos -1 h, -30 min., -10 min., 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min.;

2) avaliação da contratilidade: -10, 5, 20, 60, 120 e 240 min.;

3) avaliação do tônus: -1 h, -10, 20 e 240 min.;

4) avaliação da ecotextura uterina: -10, 20 e 240 min.;

5) mensuração do diâmetro médio, perímetro e área do corpo lúteo e diâmetro médio dos três maiores folículos por ovário: -1 h;

A pesquisa de detecção da vesícula embrionária (VE) foi realizada a partir do Dia 9, sendo o dia da primeira visualização registrado.

Para determinar o dia exato da fixação, a mobilidade das VE foram acompanhadas diariamente a partir do Dia 12. Quando a vesícula

embrionária era encontrada imóvel na base de um dos cornos uterinos, procedia-se o estudo da fixação. Este estudo consistia de exames ultrasonográficos a cada 5 min. por 2 h. Caso a VE não se movimentasse nesse período de exame e se no dia seguinte estivesse no mesmo segmento uterino, confirmava-se o dia anterior (dia da pesquisa) como o dia da fixação embrionária.

Também foi realizado, no 13º dia de prenhez, o teste de mobilidade da VE. Para melhor caracterização da mobilidade da VE o útero era dividido em segmentos (FIG. 6) segundo GINTHER (1995b). A pesquisa consistia de exames ultra-sonográficos a cada 5 min. durante 2 h. onde, a cada exame, a localização da VE era anotada.

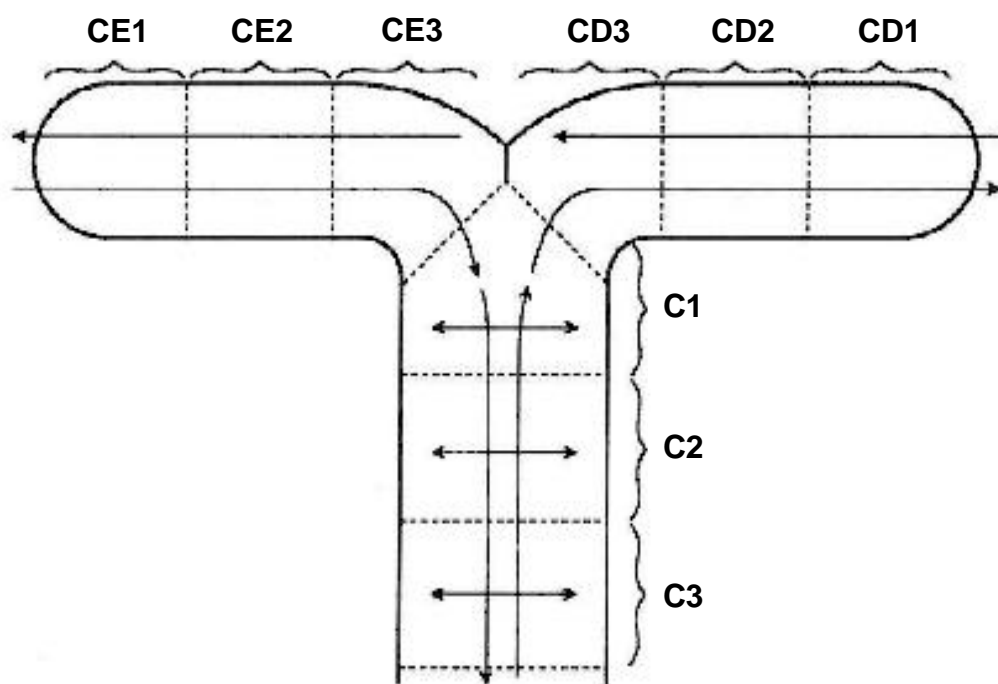


Figura 6. Divisão esquemática do útero em segmentos para mapeamento. C = corpo; CD = corno direito; CE = corno esquerdo (Adaptado de GINTHER, 1995b).

4.5.3.3. Análises Estatísticas

Dados qualitativos foram analisados utilizando-se SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), por meio de:

- 1) Teste de Qui-quadrado para avaliação das taxas de prenhez;
- 2) Teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias de tónus e ecotextura entre mais de dois grupos experimentais com dados não pareados, podendo o número amostral ser variado entre os grupos;
- 3) Para determinação de efeitos de grupo, de dia ou tempo, e de interação em dados qualitativos seqüenciais (contratilidade, tónus e ecotextura), foi realizada ordenação dos dados (ranqueamento), sendo estes analisados com um modelo linear considerando efeitos fixos e ocasionais (efeitos mesclados) e com expressão repetitiva para confirmação da auto-correlação entre os dados seqüenciais (Proc Rank e Proc Mixed). Teste de Tukey foi aplicado nos casos em que efeitos de grupo, de dia ou de tempo e/ou de interação foram encontrados. Para a localização de diferenças nas médias entre tempos ou entre dias dentro do mesmo tratamento, foi realizada ordenação dos dados e o mesmo modelo linear aplicado anteriormente foi utilizado juntamente com o teste de Tukey (Proc Rank, Proc Mixed e Teste de Tukey). Adicionalmente, para localização de diferenças das médias entre tratamentos no mesmo tempo ou dia, teste de Tukey foi aplicado após ordenação dos dados (Proc Rank e Teste de Tukey).

Dados quantitativos foram analisados utilizando-se SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), por meio de:

- 1) ANOVA para detecção de diferenças entre médias de diâmetro e de deslocamento da VE;
- 2) O mesmo modelo linear descrito para dados qualitativos seqüenciais (Proc Rank, Proc Mixed e Teste de Tukey) foi utilizado para avaliação de dados seqüenciais do diâmetro e área do corpo lúteo.

Probabilidades $P < 0,05$ indicaram diferença significativa.

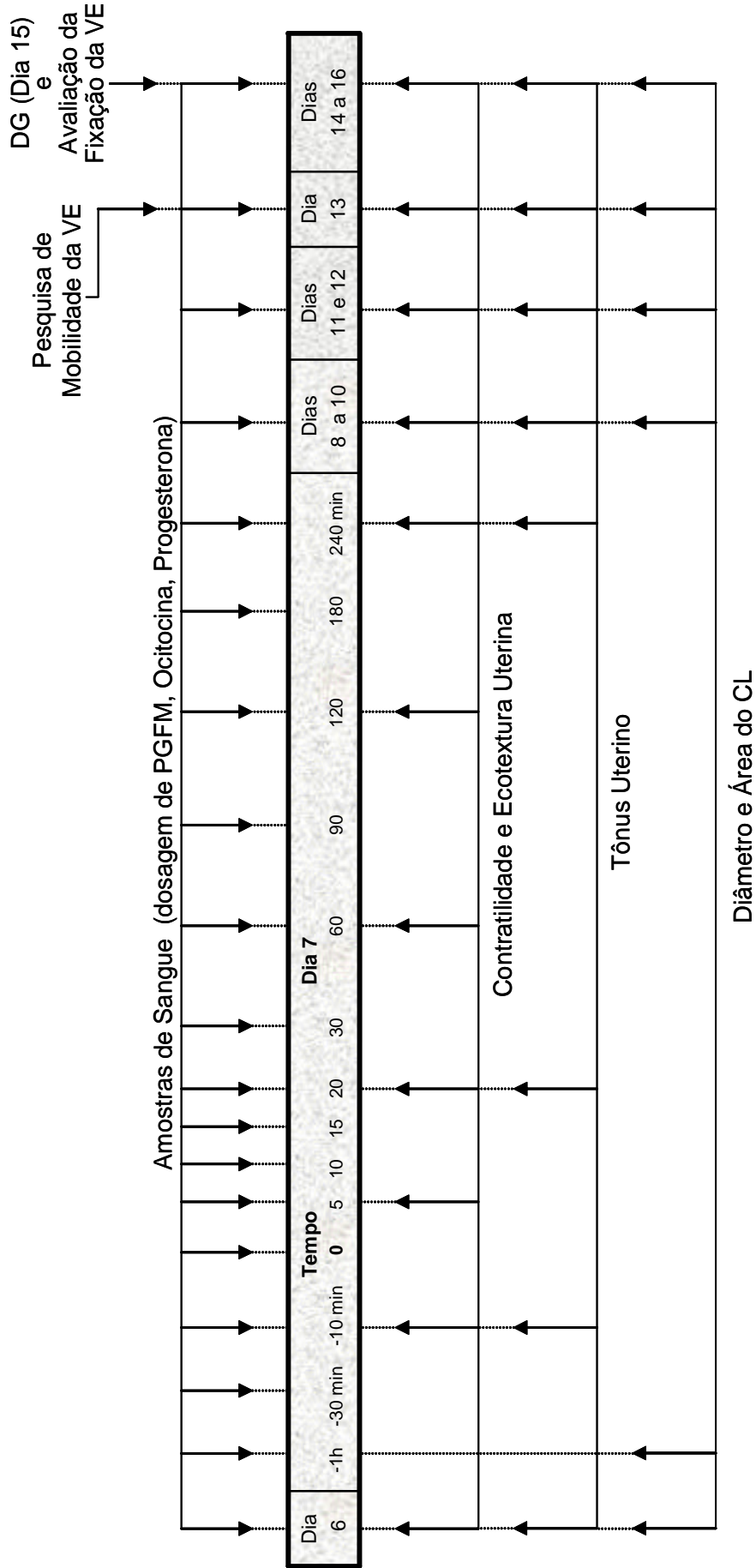


Figura 7. Desenho experimental do Experimento 3. As setas indicam os tempos e os dias para coletas de amostras de sangue e de dados referentes às dinâmicas uterina, do corpo lúteo e da vesícula embrionária, nos grupos de TE por IUU, TE via TC e Controle.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1

Avaliação da Eficiência da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina (IIU) Via Transvaginal em Eqüinos

5.1.1. Pré-experimento

Este pré-experimento foi realizado com a finalidade de definir o volume ideal de fluido injetado no útero para se obter total certeza da visualização do mesmo, pós-injeção, por ultra-sonografia transretal com transdutor linear de 5 MHz. A coleção de fluido, quando visualizada, forma uma saculação em determinada porção do útero, ou filetes espalhados pelo lúmen uterino, caracterizando o resultado positivo da injeção (GASTAL et al., 1998). Realizou-se um total de 20 injeções intra-uterinas (IIU) com volumes de 1, 5, 10 e 20 mL (5 injeções/volume) de solução salina a 0,9% (TAB. 4).

Com injeções de 1 mL, não foi possível observar a presença de fluido intra-luminal com o transdutor transretal de 5 MHz após retirada do transdutor transvaginal. No entanto, GASTAL (1998) e MILLAN (2001), respectivamente *in vivo* e *in vitro*, conseguiram observar a presença de pequena saculação de fluido no lúmen uterino após injeções com volume de 1 mL, utilizando avaliação ultra-sonográfica com o

próprio transdutor transvaginal imediatamente após as injeções. Sendo assim, acredita-se que, no caso deste pré-experimento, embora as injeções com 1 mL possam ter sido eficientes, o volume muito pequeno de fluido injetado difundiu-se pelo lúmen uterino dificultando a posterior avaliação e obtenção da imagem ultra-sonográfica com o transdutor linear de 5 MHz via transretal.

Tabela 4. Resultados obtidos após injeções intra-uterinas de diferentes volumes de solução salina a 0,9% (pré-experimento).

mL	Resultado
1	Não visualização de líquido no lúmen uterino
5	Difícil visualização
10	Visualização deficiente
20	Volume ideal para boa visualização

As injeções de 5 e 10 mL permitiram certo grau de visualização do fluido intra-luminal, embora deficiente. Melhor imagem foi observada esporadicamente com injeções de 10 mL. O fluido injetado, semelhante ao que aconteceu com as injeções de 1 mL, provavelmente espalhou-se pelo lúmen uterino dificultando a observação ultra-sonográfica. A possibilidade de boa imagem do fluido intra-uterino ser observada aumentou gradativamente com o aumento do volume injetado. A eficiência do escaneamento e as características individuais de cada animal estudado, principalmente tamanho e conformação do útero, também colaboraram para visualização ou não do fluido uterino.

Nas injeções com volumes de 20 mL, observou-se com facilidade a coleção de fluido intra-uterino, formando saculações, concentradas em determinada porção uterina, ou filetes intra-luminais. Mesmo com variações individuais, o volume de 20 mL permitiu boa observação do fluido garantindo os diagnósticos de eficiência, ou seja, identificação dos

resultados positivos e negativos do procedimento. Sendo assim, optou-se pelo volume de 20 mL de solução salina a 0,9% para realização do Experimento 1.

5.1.2. Eficiência da técnica ultra-sonográfica de IIU (Experimento 1)

O resultado de eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (IIU) para deposição de fluidos é mostrado abaixo (TAB. 5).

Tabela 5. Eficiência da técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina via transvaginal (injeções de 20 mL de solução NaCL 0,9%).

Resultados	Sucessos	Insucessos	Total
Número de Injeções	32	1	33
%	97	3	100

O tempo médio de cada injeção – intervalo entre inserção do aparato de IIU na vagina e finalização da mesma – foi de 48 segundos. Esses dados confirmam os achados em trabalhos realizados *in vitro* para a deposição intra-uterina de substâncias e de oócitos (MILLAN, 2001; GASTAL et al., 2002) e *in vivo* para deposição de substâncias útero-cinéticas (GASTAL, 1998). Demonstra-se, assim, que a técnica é eficiente, rápida e tem alta repetibilidade.

Os experimentos de transferência de embriões eqüinos pela técnica ultra-sonográfica de IIU, que serão comentados detalhadamente adiante, também comprovam a eficiência desta técnica. A eficiência da técnica ultra-sonográfica de IIU, obtidos neste experimento de injeção de solução

salina (97%, 32/33) sugerem ser superiores às taxas de prenhez no dia 15 das TE realizadas por esta técnica (77%, 30/39). Vale ressaltar que vários fatores podem colaborar para resultados negativos de prenhez, mesmo sendo a injeção e a deposição do embrião no lúmen uterino eficientes, justificando assim o resultado inferior das TE realizadas por IIU quando comparado à simples deposição de fluido no lúmen uterino como no Experimento 1. Além disso, a avaliação da eficiência da técnica para injeção de fluidos (Experimento 1) foi realizada, via transretal, imediatamente após o procedimento de injeção e fatores que podem interferir nos resultados de prenhez estão ausentes neste caso.

5.1.3. Parâmetros ultra-sonográficos

Durante as IIU, parâmetros de observações ultra-sonográficas como: visualização da ponta da agulha, da ponta do cateter, dos movimentos de vai-e-vem do cateter e da ejeção do fluido foram avaliados (TAB. 15, Apêndice p.120).

No final de cada injeção uma nota foi atribuída pelo operador à qualidade do procedimento. Essa nota, embora subjetiva, foi baseada em todos os parâmetros ultra-sonográficos observados, dificuldades impostas pelo animal e possíveis problemas com o equipamento durante a IIU, ou seja, foi uma avaliação completa de todas as dificuldades e facilidades observadas e sentidas pelo operador (TAB. 15, Apêndice p. 120).

Posteriormente, na análise dos dados, baseando-se somente nas anotações das observações dos parâmetros – visualização da agulha e do cateter no momento da IIU, do movimento de vai-e-vem do cateter no lúmen uterino e da ejeção do fluido - foram atribuídos pontos a cada IIU (TAB. 15, Apêndice p. 120). Foram dados os escores 0 (observação negativa), 0,5 (difícil observação) e 1 (observação positiva) para a qualidade das observações dos parâmetros ultra-sonográficos, sendo estes usados para o cálculo das pontuações individuais da IIU.

As notas e os pontos, baseados em observações qualitativas já descritas, foram comparados e analisados (TAB. 6). Foi encontrada correspondência entre as notas atribuídas pelo operador imediatamente após as injeções com os pontos calculados com base somente nas observações dos parâmetros citados anteriormente ($P > 0,05$). Comprova-se assim, conforme sugerido *in vitro* por MILLAN (2001), que a observação de boas imagens dos parâmetros ultra-sonográficos é o fator determinante do sucesso do procedimento de IIU.

Tabela 6. Comparação entre a avaliação global das IIU (notas atribuídas pelo operador no momento da IIU), com os pontos calculados posteriormente com base nas anotações das observações ultra-sonográficas.

Variável	n	Média ± EPM
Pontos	33	3,72 ± 0,07
Nota	33	3,81 ± 0,05

$P > 0,05$ (Teste de Wilcoxon)

Os parâmetros ultra-sonográficos tiveram a frequência de ocorrência mostrada na TAB. 7. Observa-se uma maior variação para o parâmetro ejeção de fluido. Na prática, esse parâmetro é decisivo para a avaliação final global do procedimento. Este parâmetro é o que mais confiabilidade transmite ao operador sobre a eficiência da IIU, embora possam existir resultados positivos de IIU com observações negativas da ejeção, sendo o contrário também verdadeiro (TAB. 15, Apêndice p. 120). Adicionalmente, é importante considerar que a observação do parâmetro ultra-sonográfico de movimento de vai-e-vem do cateter contra a parede oposta do endométrio é um pré-requisito para a efetivação da injeção. Esta observação fornece confiabilidade ao operador de que o cateter se encontra no lúmen uterino. As IIU não foram realizadas na ausência desta observação ultra-sonográfica.

Tabela 7. Frequência de ocorrência do grau de qualidade de cada observação ultra-sonográfica do procedimento de IIU.

	Observação		
	+	+-	-
<i>Ponta da agulha</i>	33	0	0
Ponta do Cateter	29	3	1
Mov. Cateter	31	2	0
Ejeção	23	9	1

O número de tentativas (perfurações) para a realização da IIU foi avaliado (TAB. 8). Não houve diferença ($P > 0,05$) nos resultados de eficiência entre as injeções que necessitaram de uma ou duas perfurações. Nova tentativa de injeção foi realizada sempre que os parâmetros ultra-sonográficos não foram totalmente observados na primeira tentativa. Essa análise demonstra que mesmo nos casos onde a IIU foi de difícil realização, necessitando de nova tentativa (perfuração), a boa observação dos parâmetros, na segunda tentativa, assegurou a eficiência da IIU.

Adicionalmente, comparando-se os valores médios do tônus e da ecotextura uterina, do tempo médio de execução da IIU e, dos pontos e notas entre os procedimentos com uma ou duas tentativas de injeção (TAB. 9), não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre as médias destes parâmetros.

Tabela 8. Comparação entre resultados de eficiência em IIU realizadas com uma ou duas tentativas (perfurações).

Tentativas	Resultado	
	+	-
1	28	1
2	4	0

P>0,05 (Qui-quadrado)

Tabela 9. Análise dos valores médios (\pm EPM) do tônus uterino, da ecotextura uterina, tempo (segundos), notas e escores entre os grupos com uma ou duas tentativas (perfurações) na IIU.

Tentativas	n	Tônus ¹	Ecotextura ¹	Tempo ²	Pontos ¹	Notas ¹
1	29	1,9 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	48,2 \pm 1,5	3,7 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1
2	4	1,9 \pm 0,2	2,8 \pm 0,4	46,3 \pm 1,3	3,8 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1

¹Não houve diferença entre os grupos de tentativas (P>0,05; Teste de Mann & Whitney)

²Médias não diferiram entre si (P>0,05; ANOVA)

As médias dos parâmetros ecotextura uterina, tônus uterino e nota, nas diferentes qualidades do parâmetro ejeção do fluido são mostradas (FIG. 8). Escolheu-se o parâmetro ejeção do fluido como base para as comparações devido a este ter sido o parâmetro ultra-sonográfico que mais variou dentre os estudados (TAB. 7). O número experimental obtido no grupo com resultado negativo não permitiu análise estatística.

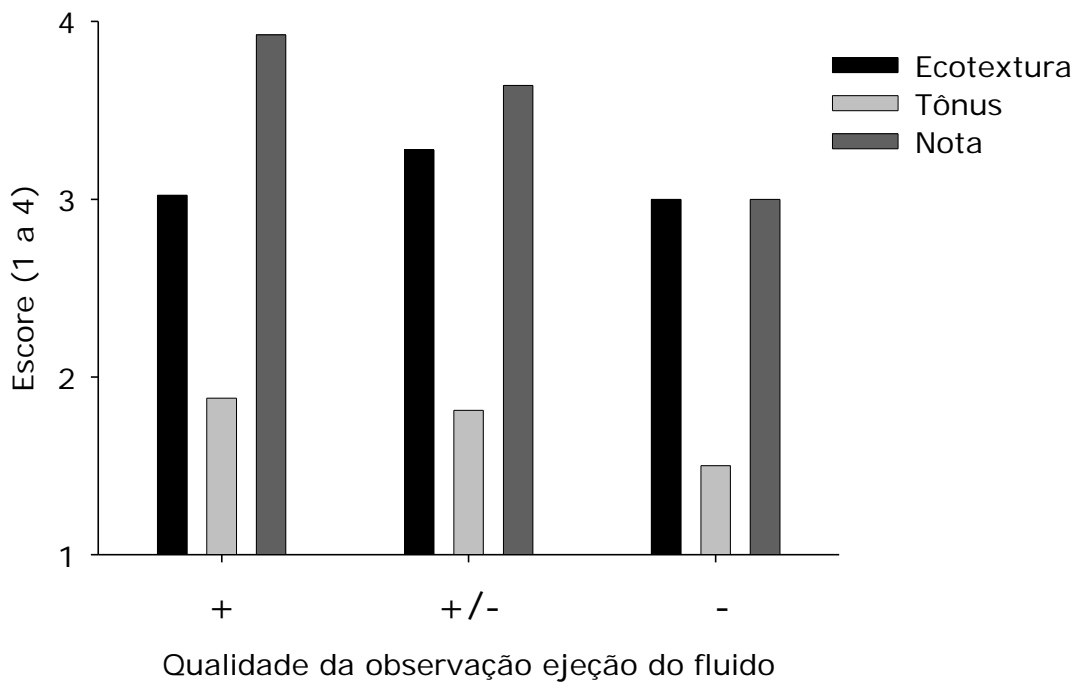


Figura 8. Comparação da ecotextura uterina, do tônus uterino e da nota atribuída pelo operador a IIU entre as diferentes qualidades do parâmetro ejeção de fluido.

Pode-se observar que as médias da ecotextura e do tônus possuem padrão semelhante entre as diferentes qualidades de injeção, enquanto a média da nota atribuída pelo operador no final do procedimento parece sofrer maior variação. Demonstra-se assim, novamente, que o parâmetro de observação ultra-sonográfica, ejeção do fluido, transmite maior segurança ao operador para a qualificação geral em pontos da IIU.

Semelhante à FIG. 8, a ecotextura uterina foi utilizada como base para observação das médias dos parâmetros pontos, notas e tônus na IIU. Na prática, aparentemente, a ecotextura elevada (escores entre 3 e 4) parece ser responsável por dificultar o procedimento de IIU devido ao maior número de pregas endometriais e à presença de edema dentro das mesmas. As médias dos parâmetros pontos, notas e tônus, não variaram ($P > 0,05$) entre as diferentes classes de escore de ecotextura uterina (FIG. 9). Pode-se concluir, pela análise das médias das notas, que os diferentes escores de ecotextura uterina não interferiram no resultado final do procedimento.

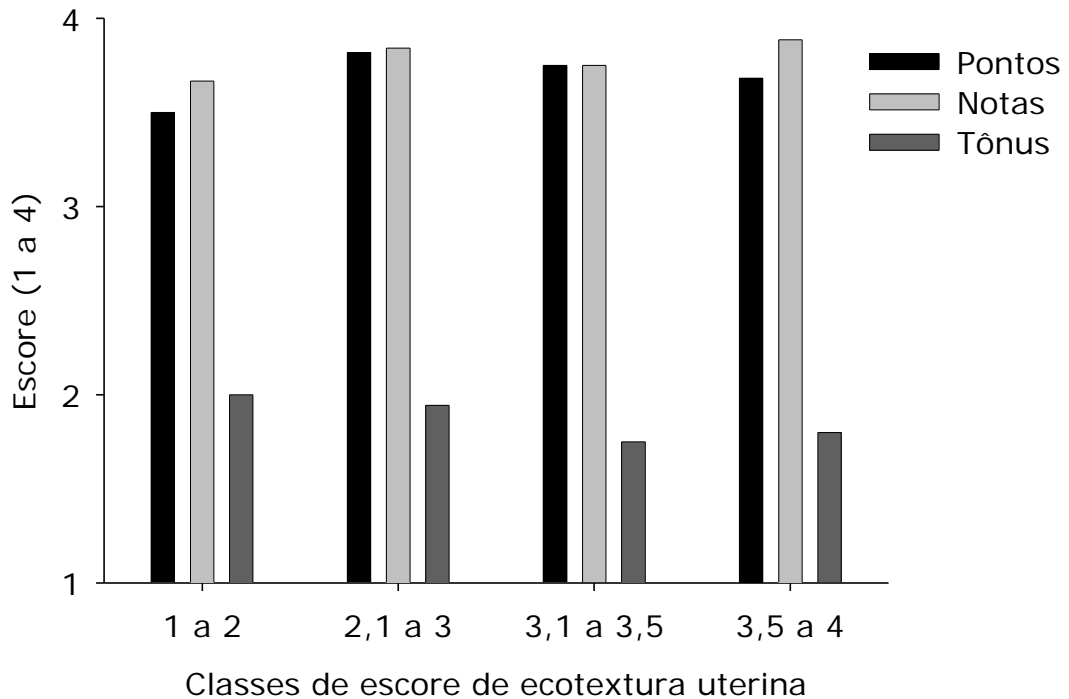


Figura 9. Comparação da influência da ecotextura uterina nas médias dos parâmetros pontos, notas e tônus. As médias de todos os parâmetros não diferiram entre si entre as diferentes classes de ecotextura uterina ($P > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

Semelhante à ecotextura, o tônus uterino baixo (escore abaixo de 1,5) parece ser um dificultador do procedimento de IIU pelo operador. Na FIG. 10 são apresentadas as médias dos pontos, das notas e dos escores de ecotextura em classes de escores de tônus uterino.

Não foram evidenciadas ($P > 0,05$) diferenças entre os mesmos nas diferentes classes de tônus. As notas, constantes nas diferentes classes de tônus uterino como ocorrido na análise da ecotextura, demonstram que, apesar da maior dificuldade percebida pelo operador na prática, o tônus uterino não influencia no resultado final do procedimento de IIU.

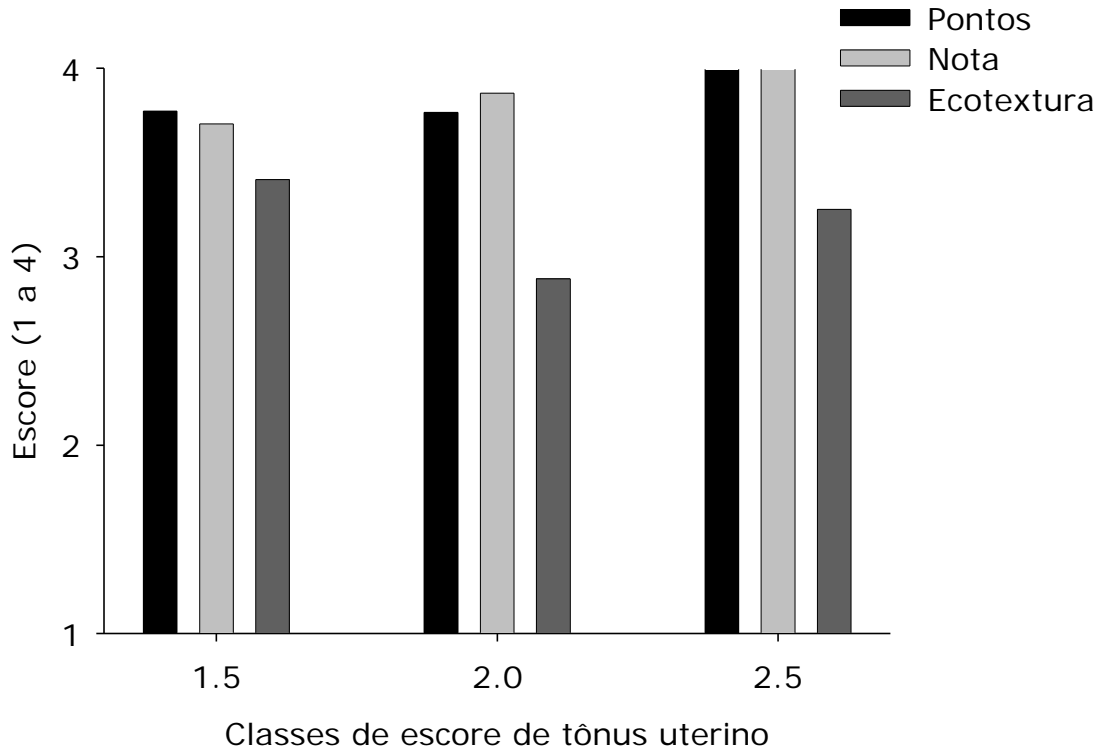


Figura 10. Comparação da influência do tônus uterino nas médias dos parâmetros pontos, nota e ecotextura uterina. As médias de todos os parâmetros não diferiram entre si entre as diferentes classes de tônus uterino ($P > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

As FIG. 9 e 10 confirmam que a avaliação global do procedimento de IIU, feita pelo operador imediatamente após a efetivação da mesma, é mais dependente da boa visualização dos parâmetros ultra-sonográficos. Os valores das notas e dos pontos sempre foram elevados, apesar dos variados escores de tônus e ecotextura uterina encontrados. O movimento de vai-e-vem do cateter antes da IIU e a visualização da ejeção do fluido durante a injeção são os parâmetros determinantes para o bom resultado da IIU.

O diâmetro médio da saculação de fluido foi anotado nos escaneamentos com a probe linear de 5 MHz após as IIU. Embora não seja formada uma saculação perfeita, procurou-se congelar a imagem ultra-sonográfica da porção uterina onde maior volume de fluido pudesse

ser visualizado. O diâmetro médio \pm EPM da saculação de fluido foi de $22,4 \pm 1,2$ mm.

Vale ressaltar também que neste estudo somente foram utilizadas éguas com ausência total de fluido uterino. Algumas éguas participaram nesse experimento somente uma vez (3 éguas), duas vezes a cada 48 h (9 éguas) ou três vezes a cada 48 h (4 éguas). Dessas éguas, uma teve persistência de fluido uterino 48 h após a primeira IIU e duas tiveram persistência de fluido uterino 48h após a segunda IIU. A possibilidade de contaminação uterina nestes casos não pode ser descartada. Nesse experimento, o aparato de injeção ainda não era protegido com as camisas sanitárias, procedimento este descrito na metodologia da IIU e que foi implantado para as transferências de embriões nos Experimentos 2 e 3.

5.2. Experimento 2

Comparação da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina com a Técnica Transcervical Convencional para Transferência de Embriões em Equinos

5.2.1. Estudo da eficiência das técnicas

Trinta e nove TE foram realizadas pela técnica ultra-sonográfica de IIU e trinta e oito TE pela técnica transcervical convencional em duas estações reprodutivas (2001/2002 e 2002/2003).

As taxas de prenhez da estação 2001/2002, da estação 2002/2003 e o resultado geral das duas estações são apresentados na TAB. 10. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) nas taxas de prenhez entre as técnicas nas duas estações reprodutivas estudadas e também quando os resultados destas foram analisados conjuntamente.

Tabela 10. Taxas de prenhez obtidas pelas técnicas de TE por IIU e via TC nas estações reprodutivas 2001/2002 e 2002/2003.

Estação	Técnica	+		-		Total
		%	n	%	n	
2001/2002 ¹	IIU	78,3	18/23	21,7	5/23	46
	TC	82,6	19/23	17,4	4/23	
2002/2003 ²	IIU	75,0	12/16	25,0	4/16	31
	TC	73,3	11/15	26,7	4/15	
Geral ³	IIU	76,9	30/39	23,1	9/39	77
	TC	78,9	30/38	21,1	8/38	

^{1,2,3}($P > 0,05$; Qui-quadrado)

Esses resultados, independentemente da técnica utilizada, são similares aos maiores valores de taxas de prenhez aos 15 dias citados para a técnica transcervical (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b,c; IULIANO et al., 1985; MULLER & CUNAT, 1993; RIERA & McDOUGH, 1993; FLEURY, 1998; SQUIRES et al., 2003).

A hipótese de que a técnica ultra-sonográfica de IIU para TE originaria maiores taxas de prenhez que a técnica transcervical não foi sustentada. Acredita-se que o treinamento e a habilidade do técnico, desde o processo de manipulação do embrião, seleção da receptora e principalmente na execução do procedimento da TE transcervical, tenham sido os fatores responsáveis pelas elevadas taxas de prenhez obtidas nas estações estudadas. Demonstra-se, portanto, que como técnica alternativa de TE, a IIU guiada por ultra-sonografia pode ser uma possibilidade viável para algumas éguas onde a técnica transcervical é de difícil aplicação, assim como em algumas espécies de eqüídeos (ex. asininos) ou em outras espécies (ex. espécie bovina - novilhas ou vacas com dificuldade de inovulação transcervical). Além disso, adaptações

específicas dessa técnica poderão colaborar para estudos futuros de utilização de TE em outras espécies de animais domésticos e silvestres.

As médias do tônus uterino, ecotextura uterina, pontos e notas, no dia das TE (Dia 7), foram comparadas (TAB. 11). Não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os grupos estudados para esses parâmetros. Esta análise demonstra que, tanto para os resultados positivos de prenhez como para os resultados negativos, em média, as éguas tiveram semelhantes características uterinas (tônus e ecotextura) no dia da TE, independentemente da técnica utilizada e do posterior resultado de prenhez. O grau de dificuldade do operador também foi similar em todas as TE realizadas pela técnica de IIU, pois não houve variação ($P>0,05$) dos parâmetros notas e pontos entre os grupos positivo e negativo.

Tabela 11. Comparação dos valores médios (Dia 7) do tônus e ecotextura uterina, pontos e notas versus técnicas de TE subdivididas em resultados de prenhez (estações 2001/2002 e 2002/2003).

Técnicas	Tônus ¹	Ecotextura ²	Pontos ³	Nota ⁴	
IIU	+	1,99	2,23	3,90	3,90
	-	1,98	2,26	3,83	3,83
TC	+	1,89	2,29	-	-
	-	1,99	2,23	-	-

^{1,2} $P>0,05$ (Teste de Kruskal & Wallis)

^{3,4} $P>0,05$ (Teste de Mann & Whitney)

5.2.2. Recuperação embrionária

As taxas de recuperação embrionária foram diferentes ($P<0,05$) entre as estações reprodutivas estudadas. Na estação 2001/2002, obteve-se 78,4% (76/97) de recuperação embrionária enquanto na

estação 2002/2003, obteve-se 63,0% (46/73). A taxa geral de recuperação embrionária nas duas estações estudadas foi de 71,8% (122/170; TAB.16; Apêndice p.121). Esses resultados, independentemente se considerados nas respectivas estações ou em conjunto, são semelhantes aos encontrados nos relatos da literatura (IULIANO, 1985; SQUIRES, et al., 1982a; MEIRA, 1990).

O tempo médio gasto para recuperação embrionária (tempo = intervalo entre posicionamento correto, lavado e retirada da sonda Bivona) foi de 20,7 minutos na estação 2001/2002 e de 14,9 minutos na estação 2002/2003, diferindo ($P < 0,001$) entre as estações. O tempo médio total foi de 18,4 minutos (TAB. 17; Apêndice p.122). O menor tempo médio na segunda estação reprodutiva (2002/2003), provavelmente tenha sido devido ao maior treinamento adquirido pelo operador.

O percentual de fluido recuperado neste experimento foi de 98,0% (Tabela 18; Apêndice p.122). Esse valor é semelhante aos citados por outros pesquisadores (97,3% e 92,0%, OGURI & TSUTSUMI, 1972 e IMEL, 1981, respectivamente). O volume médio de déficit (83,7 mL) da estação 2001/2002 foi maior ($P < 0,001$) que o da estação 2002/2003 (31,3 mL). A maior experiência do operador pode ter contribuído, também, para essa diferença entre estações. No entanto, o volume recuperado variou muito pouco em termos percentuais ao volume infundido entre as estações, ou seja, a diferença encontrada entre as médias de déficit representaram muito pouco em relação ao volume total infundido. Vale ressaltar que, apesar de pequenos volumes de déficit representarem muito pouco em termos percentuais, o máximo de recuperação do meio infundido é muito importante para a manutenção da integridade uterina e, por conseqüência, para um programa de TE eficiente. Os mecanismos uterinos de limpeza podem não ser capazes de eliminar o pequeno déficit da recuperação em tempo hábil para impedir um ambiente propício à multiplicação bacteriana.

5.2.3. Qualidade embrionária

Cento e vinte e dois (122) embriões foram coletados nas duas estações reprodutivas estudadas. Apenas embriões classificados em qualidade Grau 1 ou 2 foram transferidos (McKINNON & SQUIRES, 1988a). Cento e um embriões (82,79%) atenderam essa exigência. Não foi encontrada diferença ($P>0,05$) na qualidade dos embriões recuperados entre as estações estudadas (Tabela 19; Apêndice p.123).

5.3. Experimento 3

Comparação dos Métodos de Transferência de Embriões pelas Técnicas Ultra-sonográfica de IIU e Transcervical: Estudo da Contratilidade, Tonus e Ecotextura Uterina, do Corpo Lúteo e da Dinâmica da Vesícula Embrionária.

5.3.1. Estudo da Eficiência das Técnicas

Como descrito, os resultados de prenhez das técnicas de TE aqui apresentados correspondem aos resultados da estação reprodutiva 2002/2003, utilizados no Experimento 2. No entanto, no presente experimento, foram efetuadas comparações das taxas de prenhez entre os grupos de TE com o grupo Controle. Adicionalmente, comparações das dinâmicas uterina, do corpo lúteo e da vesícula embrionária foram realizadas entre os três grupos. As taxas de prenhez, no Dia 15, entre os grupos TE por IIU (75,0%; 12/16), TE via TC (73,3%; 11/15) e Controle (68,8%; 11/16) não diferiram ($P>0,05$) e foram similares às taxas de prenhez mais elevadas citadas na literatura (IMEL, 1981; IMEL et al., 1981; SQUIRES et al., 1982a,b; IULIANO et al., 1985; MULLER & CUNAT, 1993; RIERA & McDOUGH, 1993; FLEURY, 1998; SQUIRES et al., 2003).

Visto que não se observou diferença significativa entre a eficiência das duas técnicas de TE testadas, e destas com o grupo controle, as avaliações da dinâmica uterina, do corpo lúteo e da vesícula embrionária poderão fornecer subsídios fisiológicos para o uso da técnica de TE por IIU como uma alternativa à técnica de TE via TC em casos específicos de TE. Adicionalmente, as dosagens hormonais (PGFM e ocitocina) previstas, mas não abordadas nesta dissertação, poderão colaborar substancialmente para o entendimento dos efeitos do estímulo da cérvix e do útero após a utilização das técnicas de TE por IIU e TE via TC.

5.3.2. Dinâmica Uterina

5.3.2.1. Contratilidade Uterina

Na FIG. 11 observa-se a distribuição média dos escores de contratilidade nos devidos intervalos de tempo em minutos por grupo, evidenciando-se efeito de tempo.

Nenhuma diferença ($P > 0,05$) entre as médias de contratilidade nos tempos estudados foi encontrada no grupo TE por IIU. No grupo TE via TC foi localizada diferença ($P < 0,0001$) entre as médias de todos os Tempos quando comparados ao Tempo 5. No grupo Controle diferenças ($P < 0,0009$) entre as médias dos Tempos -10 e 5 e dos Tempos 5 e 60 foram localizadas. Apesar de diferenças terem sido localizadas neste grupo, diferentemente ao que ocorreu no grupo TE via TC, não se verificou diferença entre o pico de contratilidade (20 minutos) com outros tempos de avaliação (ex. 5, 120 e 240 minutos), ou seja, esse grupo apresentou um comportamento homogêneo e constante da contratilidade nos tempos estudados. Quando as médias de contratilidade uterina foram comparadas entre grupos de TE dentro dos mesmos tempos, diferença ($P < 0,03$) foi encontrada entre os dois grupos nos Tempos 5 e 20. Esses achados sugerem maior efeito estimulatório da técnica de TE via TC sobre a contratilidade uterina.

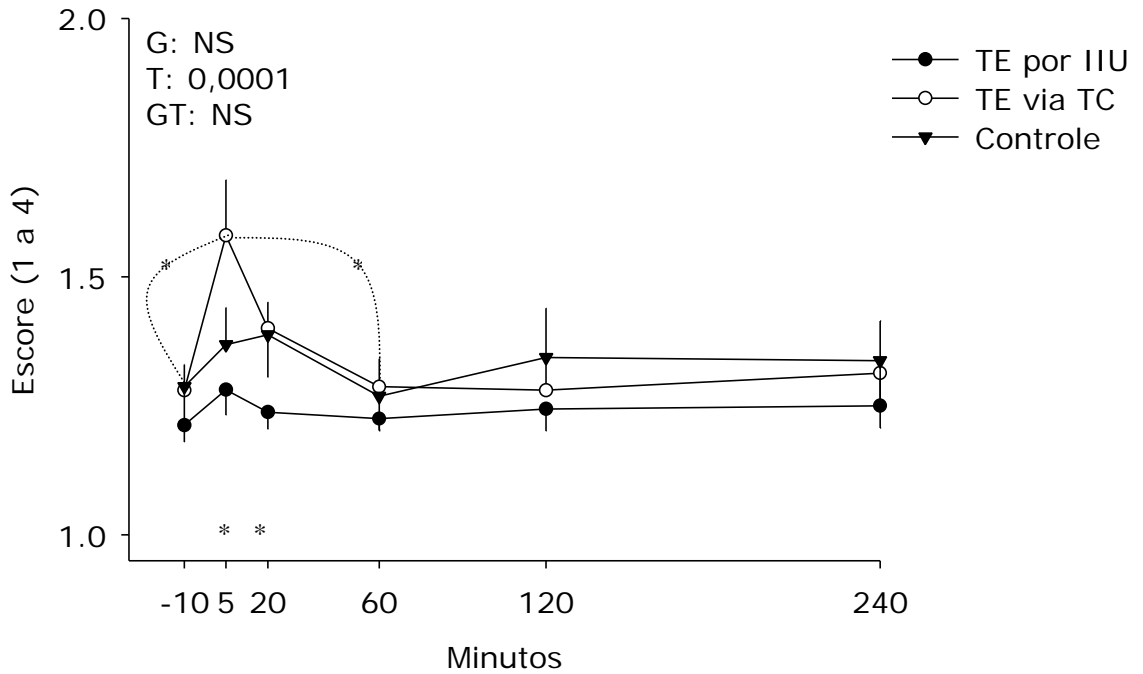


Figura 11. Contratilidade uterina (médias \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7 nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Na FIG. 12 apresenta-se a contratilidade uterina comparada entre todos os animais com DG (diagnóstico de gestação) positivo e negativo independente do grupo. Efeito de tempo foi encontrado sobre a média da contratilidade uterina.

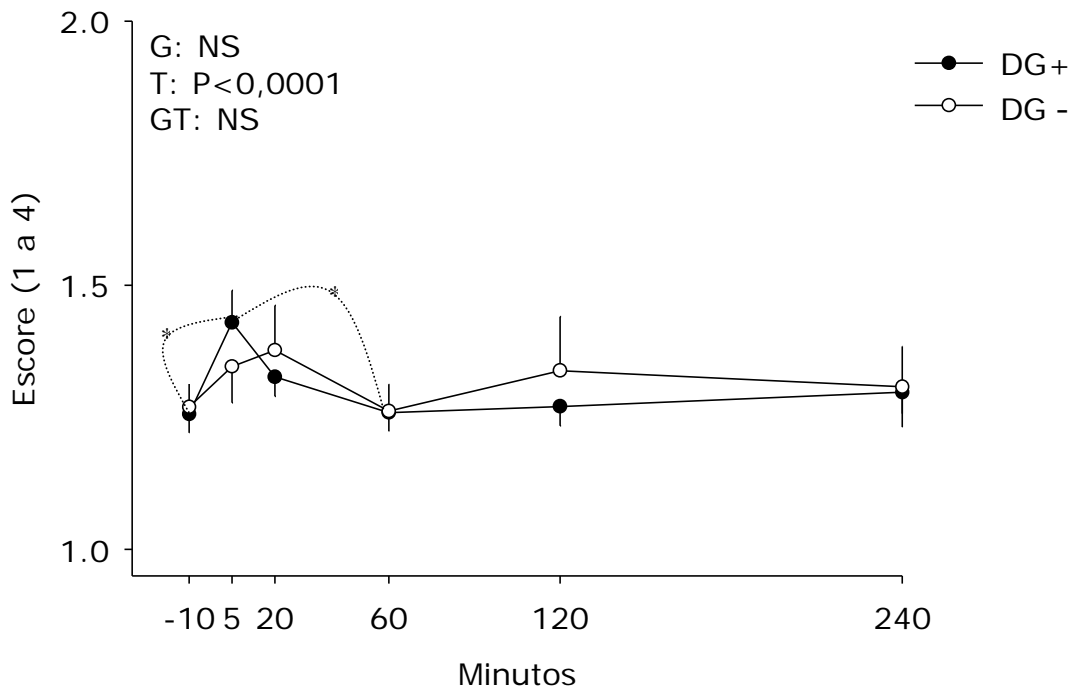


Figura 12. Contratilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7, nos subgrupos com DG positivo e DG negativo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

A contratilidade uterina média não diferiu ($P < 0,05$) entre os subgrupos com DG positivo ou DG negativo dentro de cada tempo. Quando os animais com DG positivo e DG negativo foram analisados separadamente entre os tempos, foram encontradas diferenças entre médias de contratilidade no Tempo 5 comparado com todos os outros tempos do grupo de DG positivo ($P < 0,0001$). Mesmo com os desvios das médias sendo balanceados pela união dos três grupos experimentais, diferenças temporais foram encontradas no grupo com DG positivo. Faz-se importante salientar que as mesmas diferenças eram esperadas no grupo com DG negativo. Provavelmente o pequeno número de animais

adicionado à grande variabilidade dos dados deste subgrupo, contribuíram para obscurecer qualquer diferença.

Análise por grupos foi realizada dentro dos subgrupos de éguas com DG positivo (FIG. 13) e DG negativo (FIG. 14). Na FIG. 13 verifica-se a distribuição média da contratilidade uterina nas éguas com DG positivo nos respectivos tempos de avaliação por grupo.

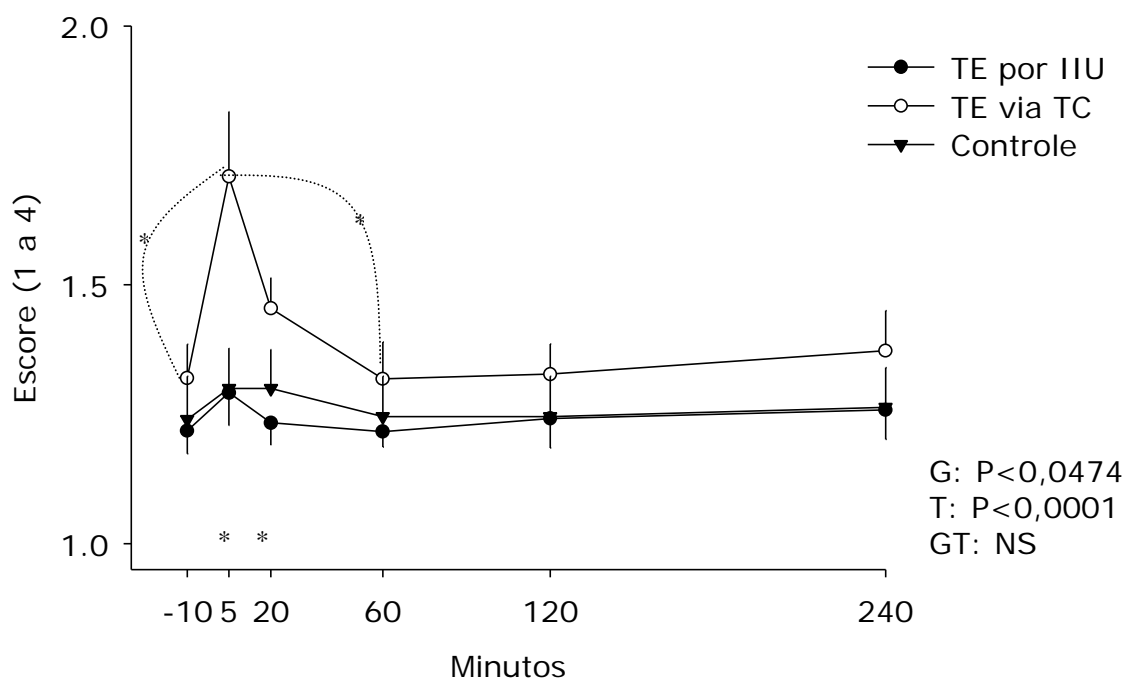


Figura 13. Contratilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7, em éguas com DG positivo nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

A contratilidade uterina média do Tempo 5 no grupo de TE via TC diferiu ($P < 0,0001$) das médias dos outros tempos estudados. Quando os grupos foram comparados entre si nos mesmos tempos, diferenças entre as médias do grupo TE via TC com o grupo TE por IIU e entre o grupo TE

via TC com o grupo Controle no Tempo 5 ($P < 0,0106$) foram localizadas. Adicionalmente, o grupo TE via TC diferiu ($P < 0,0146$) do grupo TE por IIU no Tempo 20.

Essa análise evidencia o poder estimulatório rápido e transitório da técnica de TE via TC sobre a contratilidade uterina. Entre os tempos estudados, no grupo TE via TC, o pico de contratilidade ocorreu 5 minutos após a manipulação cervical e esta retornou a valores normais 60 minutos depois. Os grupos TE por IIU e Controle assumiram um padrão constante de contratilidade até 240 minutos e se diferenciaram da técnica de TE via TC quando esta apresentou seus maiores valores de escore de contratilidade uterina (entre 5 e 20 minutos pós-tratamento).

Acredita-se assim que, em TE via TC, a possível dificuldade em transpor a cérvix promova a liberação de substâncias útero-cinéticas, ocorrendo conseqüentemente aumento da contratilidade uterina pós-transferência (KASK et al., 1995; 1997). Associado a outros fatores, como excessivo relaxamento cervical e/ou deposição do embrião próximo ao óstio cervical, pode ocorrer também expulsão do embrião do útero para a cérvix ou vagina, reduzindo as taxas de prenhez. Adicionalmente, essa análise demonstrou que o efeito máximo de alteração da contratilidade ocorreu 5 minutos após a manipulação cervical e que o retorno aos valores médios basais ocorreu aproximadamente após 60 minutos. Esse achado assemelha-se ao padrão de detecção das concentrações de PGFM encontrado por KASK et al. (1995; 1997) após TE via TC.

Na FIG. 14 verifica-se a distribuição média da contratilidade uterina nas éguas com DG negativo nos respectivos tempos de avaliação por grupo. Em contradição ao achado nos animais com DG positivo e ao que seria esperado, o grupo de TE via TC com DG negativo não apresentou diferenças significativas entre as médias da contratilidade uterina nos tempos estudados.

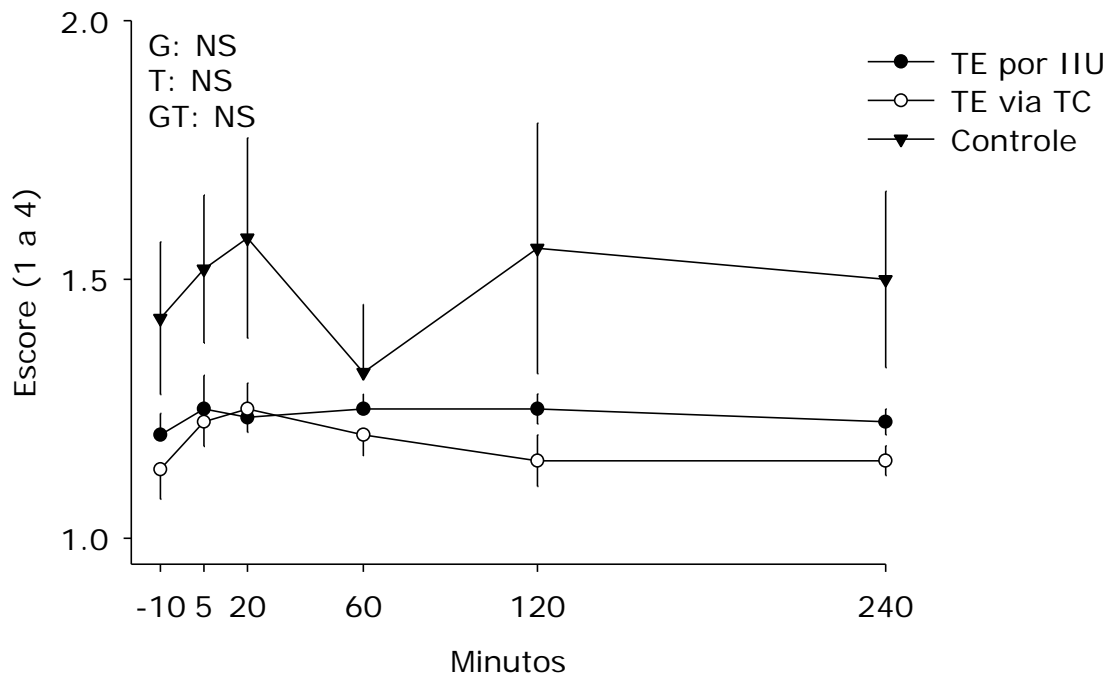


Figura 14. Contratilidade uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos em minutos (Tempo 0 = tratamento) no Dia 7 em éguas com DG negativo nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; T = efeito do tempo; GT = interação; NS = não significativo.

As éguas com DG negativo passaram pelos mesmos procedimentos do subgrupo com DG positivo. Esperava-se que o subgrupo DG negativo apresentasse um padrão de distribuição das médias da contratilidade superior ao subgrupo DG positivo para confirmação da hipótese de que a maior contratilidade uterina colaboraria para a expulsão do embrião do útero momentos após as TE. Vale ressaltar que a contratilidade uterina elevada momentos após as TE é apenas um entre outros possíveis fatores que afetam as taxas de prenhez. Acredita-se que o reduzido número de animais estudados juntamente com a variabilidade individual da contratilidade não permitiu a localização de diferenças significativas entre as médias de contratilidade nos animais com DG negativo. Além disso, as éguas receptoras de embrião no Dia 7 (grupos TE por IIU e TE via TC) foram pré-selecionadas para boa condição uterina (tônus e ecotextura) antes dos tratamentos, enquanto as éguas do grupo controle

(éguas inseminadas e ovuladas) foram analisadas no Dia 7 sem prévia seleção. Este fato por si só poderia explicar as médias e variabilidades elevadas deste grupo quando comparado aos grupos de TE.

Adicionalmente, cada grupo experimental foi analisado separadamente e as médias de contratilidade uterina dos animais com DG positivo foram comparadas com as médias dos animais com DG negativo nos mesmos tempos (gráficos não apresentados). Somente no grupo TE TC foi encontrada diferença entre médias no Tempo 5 entre os diferentes tipos de DG ($P < 0,04$).

As análises da contratilidade uterina em momentos próximos as TE (Dia 7), confirmam a hipótese de que a manipulação cervical, na TE via TC, provoca maior interferência nos mecanismos de estimulação da contratilidade uterina, sendo esse efeito rápido e passageiro. Provavelmente esse efeito esteja relacionado à maior liberação de agentes útero-cinéticos como a ocitocina e a PGF_{2a} (KASK et al., 1995; 1997), fato que poderá ser confirmado posteriormente neste experimento, com as análises hormonais. Os achados da literatura sobre quais hormônios são liberados e suas ações pós-manipulação cervical são controversos. Além dos dois trabalhos citados acima, HANDLER et al. (2003) demonstraram que a inserção de um cateter na cérvix provoca elevação da concentração plasmática de ocitocina, não provocando grandes alterações nas concentrações de PGFM. GASTAL et al. (1998), utilizando substâncias útero-cinéticas, por meio de injeções intra-uterinas, demonstraram que a ocitocina aumentou o tônus uterino, mas não afetou a contratilidade e que a PGF_{2a} aumentou a contratilidade uterina.

Com base nos resultados das avaliações no Dia 7 (Dia da TE) pode-se inferir que:

1. A TE via transcervical, comparada com a TE por IIU, provoca maiores alterações na contratilidade uterina. Sendo assim, provavelmente a manipulação exclusivamente cervical tenha maior efeito sobre as modificações nos padrões normais de contratilidade uterina;
2. A contratilidade uterina média da técnica de TE por IIU foi semelhante ao grupo Controle, ou seja, aproximou-se do padrão fisiológico com praticamente nenhum aumento da contratilidade uterina, apesar do trato genital ter sido manipulado via retal e via vaginal durante esta última.

Na FIG. 15 observa-se a distribuição diária média dos escores de contratilidade uterina dos grupos TE por IIU, TE via TC e Controle entre os Dias 6 e 16. Efeito de dia foi encontrado na média da contratilidade uterina no decorrer do período. Quando cada grupo foi avaliado separadamente, detectou-se diferença entre as médias diárias de contratilidade nos grupos TE via TC e Controle ($P < 0,006$ e $P < 0,002$, respectivamente). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre as médias dos grupos dentro de cada dia. Apesar de diferenças diárias terem sido localizadas nos dois grupos citados, estas provavelmente não representam variações fisiológicas significativas.

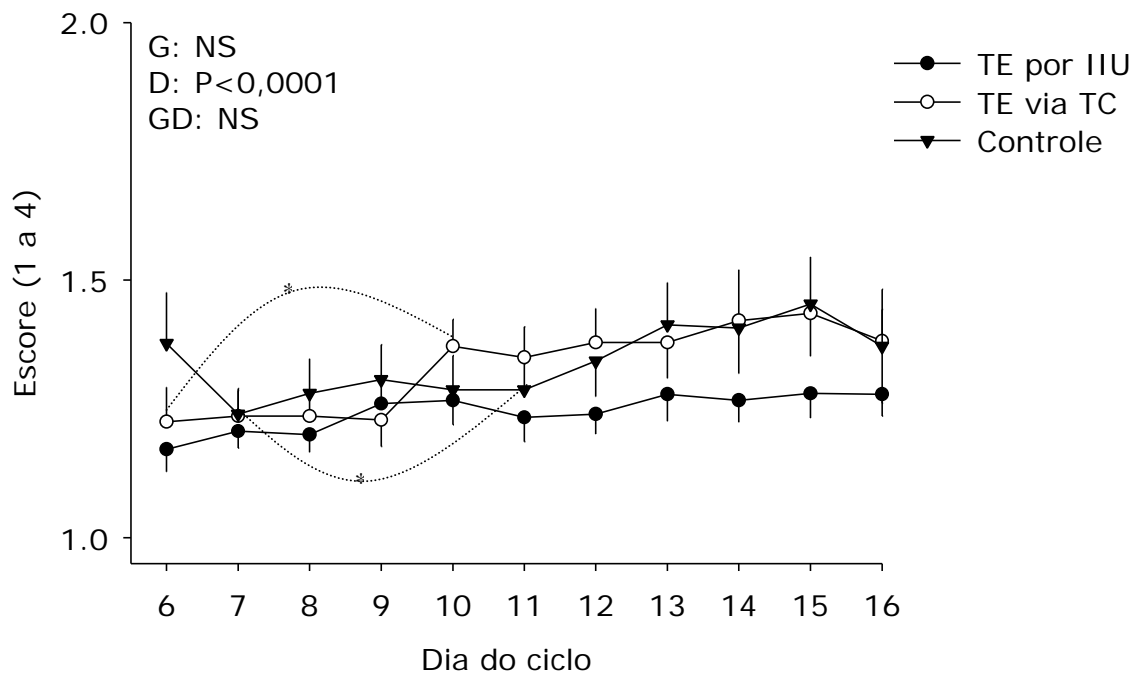


Figura 15. Contratilidade uterina diária (média \pm EPM) nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Na FIG. 16 verifica-se a distribuição diária da contratilidade uterina média entre os animais com DG positivo e DG negativo, independentemente do grupo a que pertenceram. Efeitos de dia e de interação grupo e dia foram encontrados. Quando os animais foram analisados dentro de cada grupo de DG, foram encontradas diferenças somente entre as médias diárias no grupo com DG positivo ($P < 0,0001$). O aumento da contratilidade uterina no grupo de animais com DG positivo já era esperado devido à presença da vesícula embrionária (GRIFFIN & GINTHER, 1990). Adicionalmente, esses autores encontraram diferença significativa entre a média da contratilidade uterina de éguas prenhes e não prenhes nos Dias 11, 12 e 13, fato que difere dos achados deste experimento. O pequeno número de animais com DG negativo e a grande variabilidade individual da contratilidade

nestes, podem ter sido os fatores que não permitiram a detecção desta diferença entre os grupos de DG neste experimento.

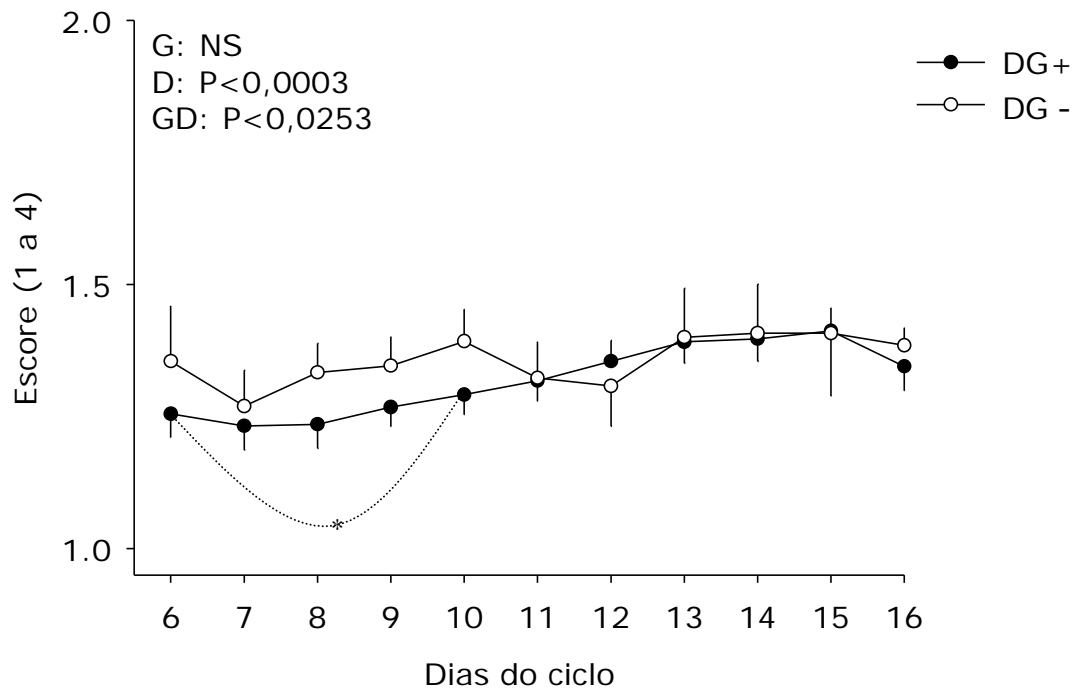


Figura 16. Contratilidade uterina diária (média \pm EPM) nos subgrupos com DG positivo e DG negativo. A linha pontilhada com estrela liga médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GT = interação; NS = não significativo.

Nos animais com DG positivo, dos respectivos grupos, evidenciou-se efeito de dia (FIG. 17) para a contratilidade uterina. Nos três grupos estudados foram encontradas diferenças entre as médias diárias da contratilidade uterina (TE por IIU, $P < 0,013$; TE via TC, $P < 0,0001$; Controle, $P < 0,0017$). Aumento da contratilidade uterina foi observado entre os Dias 6 e 9 no grupo TE por IIU ($P < 0,013$), entre os Dias 7 e 12 no grupo TE via TC ($P < 0,0001$) e entre os Dias 7 e 11 no grupo Controle ($P < 0,0017$). Não observou-se diferença significativa ($P > 0,05$) quando as médias dos grupos foram comparadas entre si no mesmo dia. Essa análise confirma o efeito da presença da vesícula embrionária sobre a

contratilidade uterina diária (Griffin & Ginther, 1990) e demonstra não haver diferenças entre as técnicas de TE utilizadas quando comparadas ao grupo Controle.

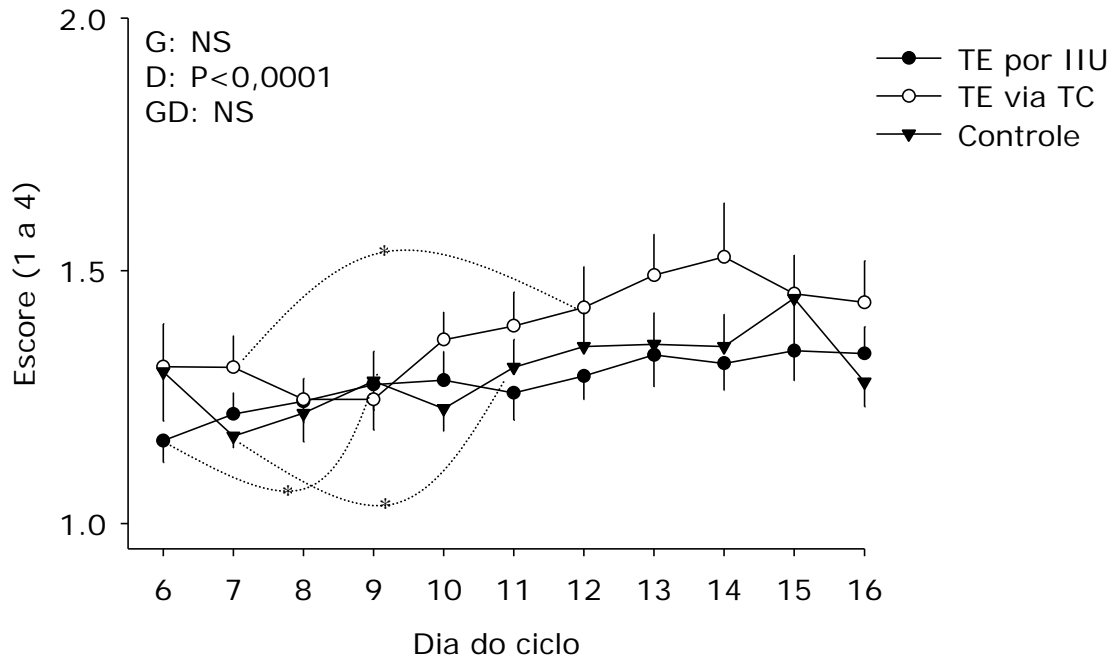


Figura 17. Contratilidade uterina diária (média \pm EPM) nas éguas com DG positivo, nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GT = interação; NS = não significativo.

Na FIG. 18 as médias diárias dos animais com DG negativo dentro de cada grupo são apresentadas. Nenhum efeito (grupo, dia e interação) foi encontrado. Podem ser visualizadas médias e variabilidades maiores no grupo Controle quando comparado aos grupos de TE. Semelhante ao ocorrido na contratilidade no Dia 7 (FIG. 14) a pré-seleção de receptoras realizada nos grupos de TE pode ter sido a causa desse achado.

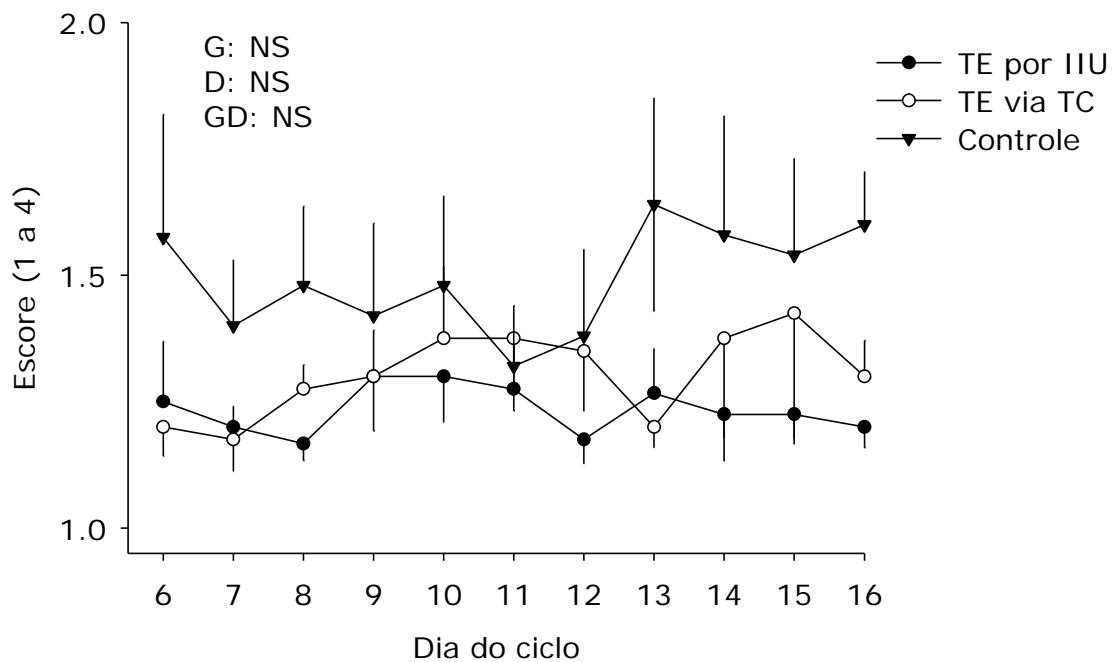


Figura 18. Contratilidade uterina diária (Média \pm EPM) nas éguas com DG negativo, nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

GRIFFIN & GINTHER (1990) encontraram efeito de dia sobre a contratilidade média em éguas prenhes e também em éguas não prenhes. No presente experimento, efeito de dia foi encontrado somente nas éguas com DG positivo. Vale ressaltar novamente que há grande variabilidade dos valores individuais nas médias dos animais com DG negativo em cada grupo (FIG. 18) e reduzido número de animais por grupo. Além disso, os autores citados acima estudaram éguas vazias que não passaram por nenhum procedimento uterino e as compararam com éguas prenhes. Neste estudo as éguas vazias foram éguas submetidas ao procedimento de TE ou previamente inseminadas (grupo Controle) e que não ficaram prenhes. Fatores relacionados ao embrião, às técnicas e à receptora podem também ter influenciando o resultado negativo de prenhez, assim como a contratilidade uterina nesses animais.

5.3.2.2. Tônus Uterino

A distribuição média dos escores do tônus uterino nos devidos intervalos de tempo em minutos para cada grupo pode ser observada na FIG. 19. No estudo do tônus no Dia 7, somente foi encontrado efeito de interação entre grupo e tempo. As médias do tônus uterino não diferiram ($P>0,05$) entre tempos no mesmo grupo ou entre grupos nos mesmos tempos.

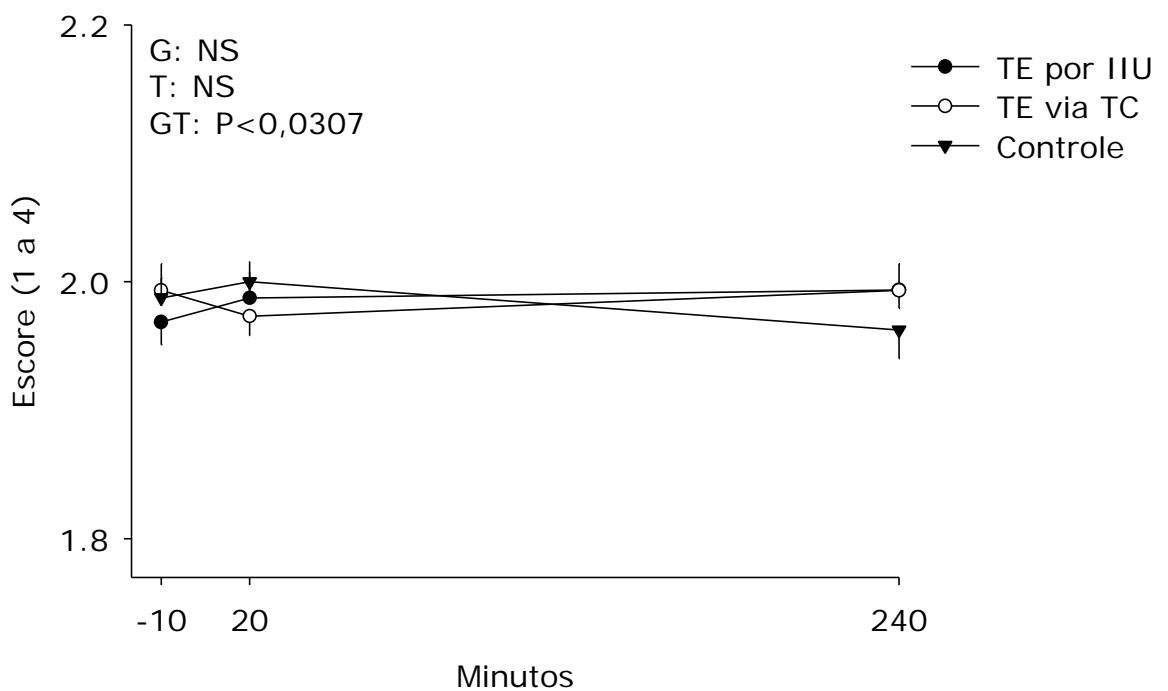


Figura 19. Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Quando as éguas foram reagrupadas em subgrupos de DG positivo e DG negativo (FIG. 20), nenhum efeito ($P>0,05$; grupo, tempo ou interação) foi detectado sobre as médias dos escores de tônus uterino.

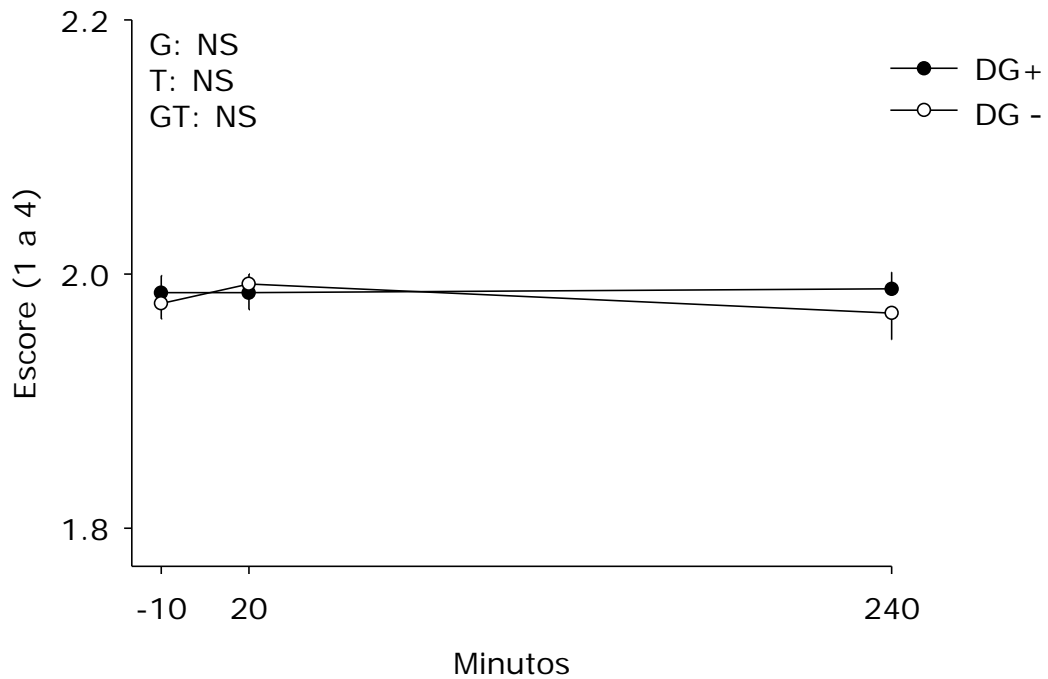


Figura 20. Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos subgrupos com DG positivo e DG negativo. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Na tentativa de se detectar diferenças entre as médias de tônus, os grupos foram também analisados, subdivididos em DG positivo e DG negativo (FIG. 21 e 22). Efeitos de grupo, de tempo e de interação não foram encontrados nos grupos com DG positivo (FIG. 21).

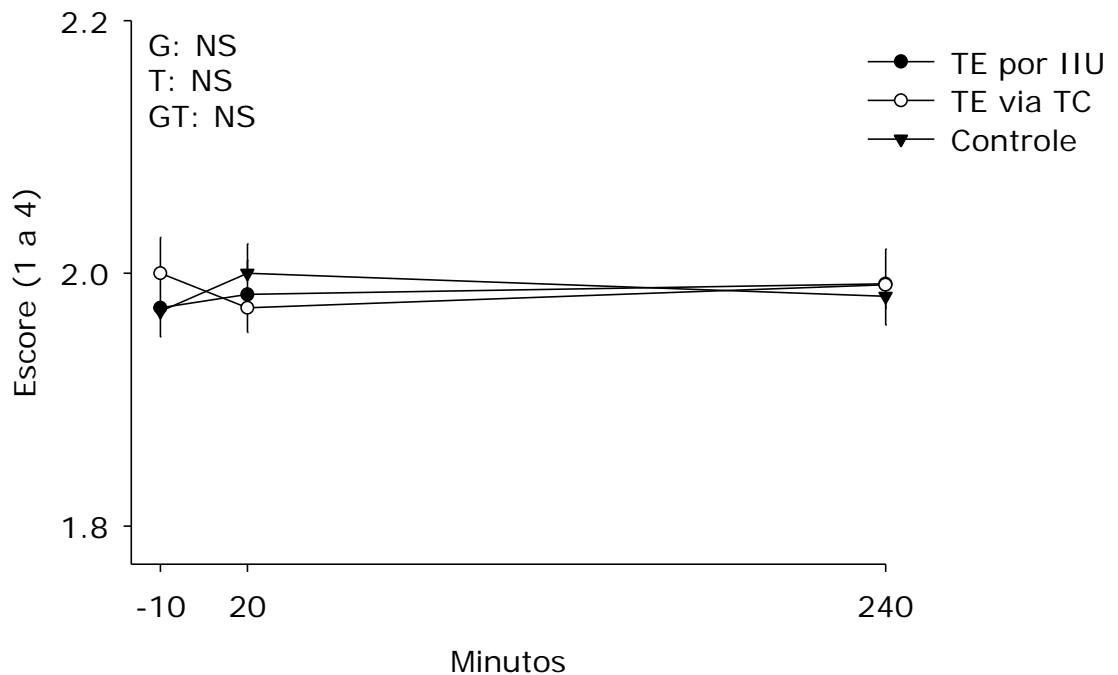


Figura 21. Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG positivo nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Somente efeito de interação de grupo e tempo foi encontrado nas médias do tônus uterino dos animais com DG negativo separados por grupos (FIG. 22). Quando as médias do tônus uterino foram analisadas entre tempos no mesmo grupo ou entre grupos nos mesmos tempos, nenhuma diferença foi encontrada ($P > 0,05$).

Os resultados relativos ao tônus uterino no Dia 7, sugerem que mesmo havendo manipulação dos órgãos reprodutivos da receptora de embrião, este estímulo não foi capaz de provocar alterações significativas no tônus uterino. Os valores obtidos foram semelhantes às éguas do grupo Controle, ou seja, se aproximaram do padrão fisiológico, considerando 10 minutos antes do procedimento até 240 minutos após, independentemente da técnica utilizada para TE.

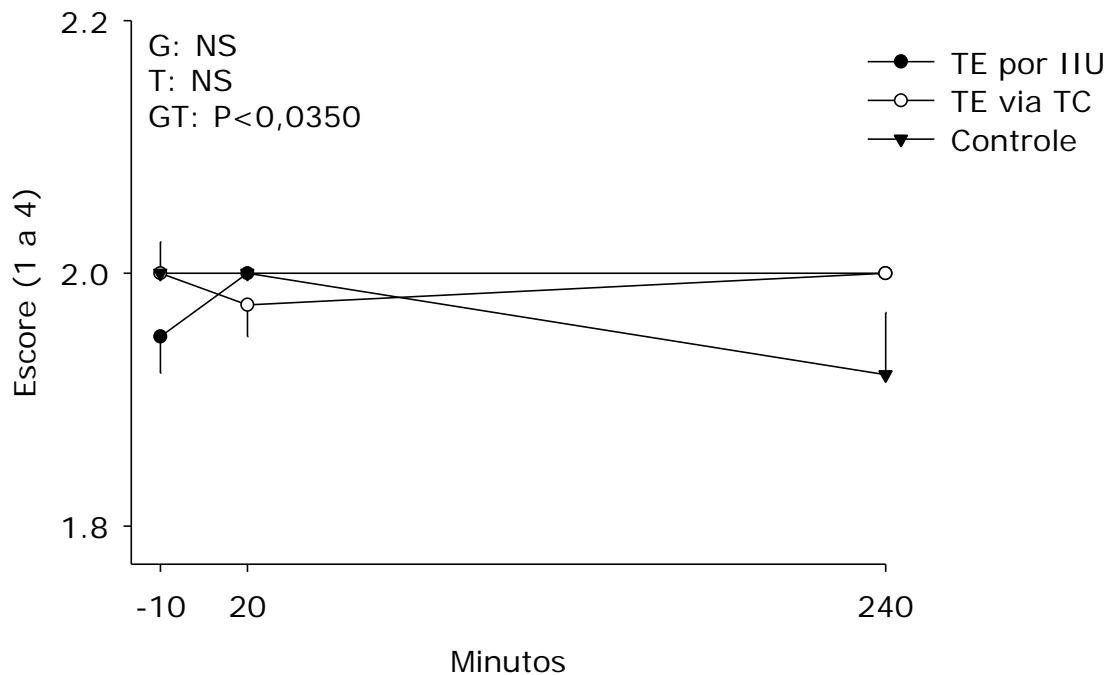


Figura 22. Tônus uterino (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG negativo, nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Somente efeito de dia foi encontrado sobre a média dos escores do tônus uterino durante os Dias 6 e 16 (FIG. 23) e entre os grupos de TE por IIU, TE via TC e Controle. Quando as médias do tônus uterino foram analisadas entre dias dentro do mesmo grupo, somente no grupo de TE via TC foi encontrada diferença ($P < 0,0068$) entre os Dias 6 e 15. Nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi encontrada entre grupos dentro de cada dia.

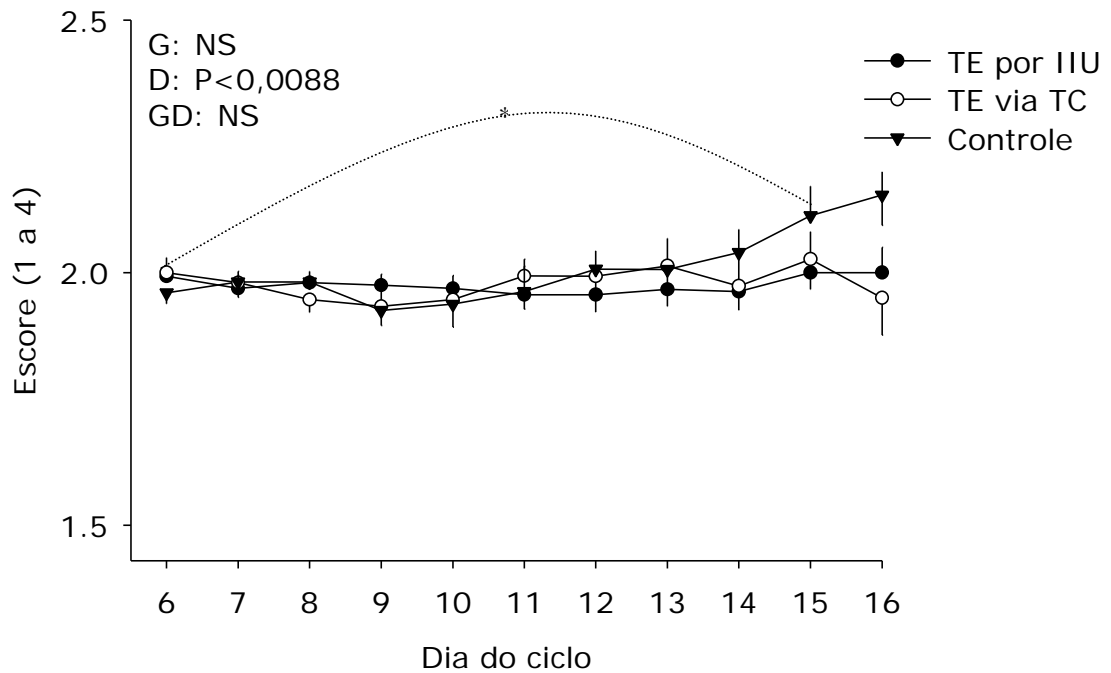


Figura 23. Tônus uterino diário (média \pm EPM) nos diferentes grupos. A linha pontilhada com estrela liga médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Na FIG. 24 verifica-se a distribuição diária da média do tônus uterino entre os animais com DG positivo e DG negativo. Efeitos de grupo e de interação foram encontrados. Foram localizadas diferenças ($P < 0,0001$) entre as médias diárias de tônus no grupo com DG positivo, sendo a primeira diferença detectada entre os Dias 7 e 12. Quando as médias de cada dia foram comparadas entre os animais de DG positivo e DG negativo, nenhuma diferença significativa foi encontrada até o Dia 12. Todas as médias diárias de tônus uterino diferiram estatisticamente entre os dois grupos ($P < 0,05$) dos Dias 13 ao 16.

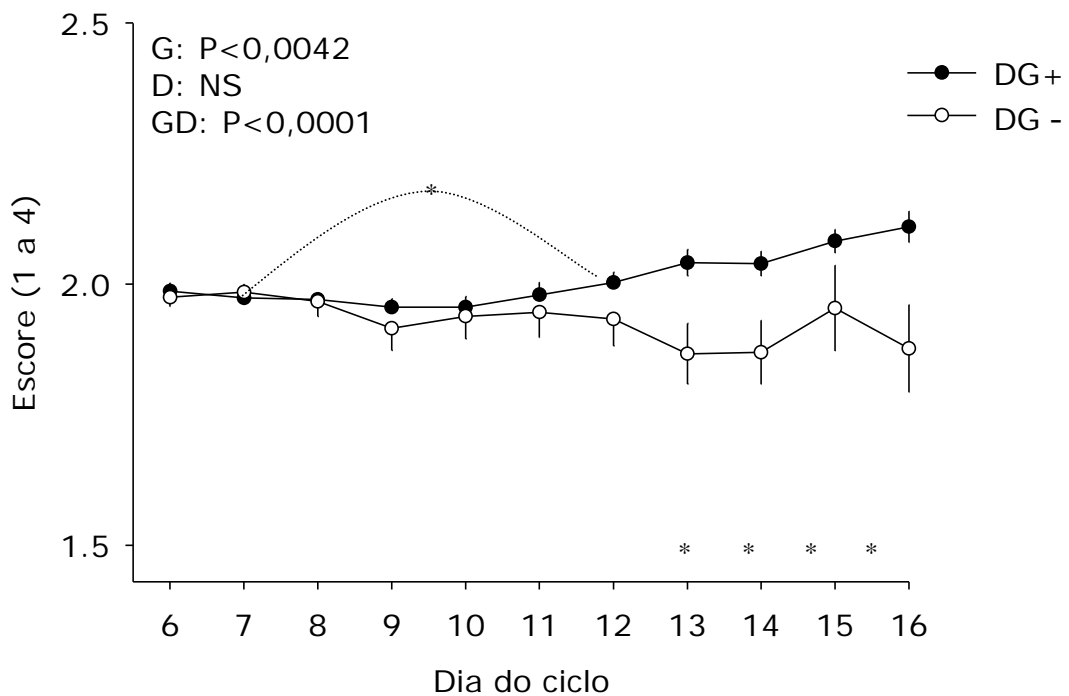


Figura 24. Tônus uterino diário (média \pm EPM) nos subgrupos com DG positivo e DG negativo. A linha pontilhada com estrela liga médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GT = interação; NS = não significativo.

Observa-se ainda na FIG. 24 que ocorreu elevação do escore do tônus uterino a partir do Dia 11 nos animais com DG positivo. Estudos anteriores demonstraram progressiva elevação do tônus uterino a partir desse dia, e associaram esse resultado à futura fixação da vesícula embrionária (GINTHER, 1985; 1995b). Adicionalmente, observa-se nos animais com DG negativo decréscimo na média diária do tônus uterino, a partir do Dia 12, provavelmente devido à ausência da vesícula embrionária.

Efeito de dia e interações para escores de tônus uterino em animais com DG positivo são apresentados (FIG. 25). Nos grupos TE via

TC e Controle foram encontradas diferenças entre o Dia 7 e Dia 12 ($P < 0,0001$) e Dia 7 e Dia 14 ($P < 0,0002$), respectivamente. Embora não detectado no grupo de TE por IIU, o aumento significativo diário do tônus uterino nos animais com DG positivo era esperado devido à presença da vesícula embrionária (GINTHER, 1985; 1995b). Quando as médias do tônus uterino foram comparadas entre grupos no mesmo dia não observou-se diferença significativa.

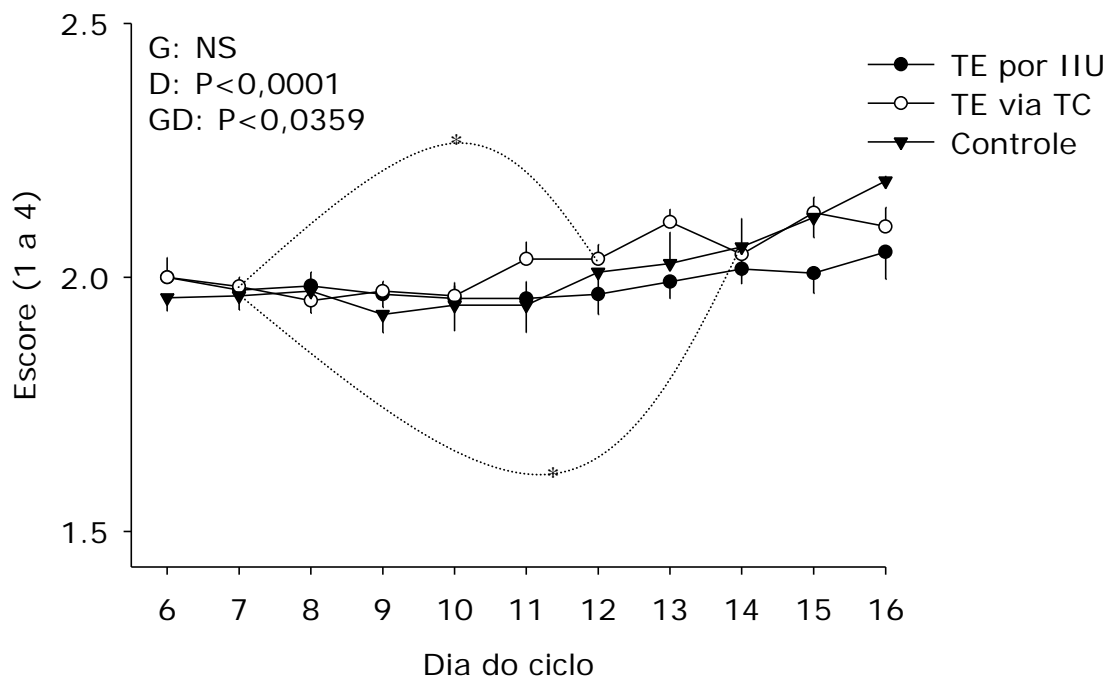


Figura 25. Tônus uterino diário (média \pm EPM) em éguas com DG positivo nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Nas éguas com DG negativo não foram encontrados efeitos significativos ($P > 0,05$) de grupo, dia ou interação (FIG. 26). Queda do

tônus uterino após o Dia 12-13 era esperada em animais com DG negativo que estão iniciando a fase estrogênica do ciclo estral. No entanto, o pequeno número de animais com DG negativo por grupo e a elevada variabilidade dos resultados desses podem ter contribuído pela não detecção de diferenças entre as médias diárias. Adicionalmente, vale ressaltar novamente que as éguas do grupo Controle não foram selecionadas no Dia 7, o que justificaria escores de tônus uterino mais elevados após luteólise funcional, em casos de possíveis infecções subclínicas.

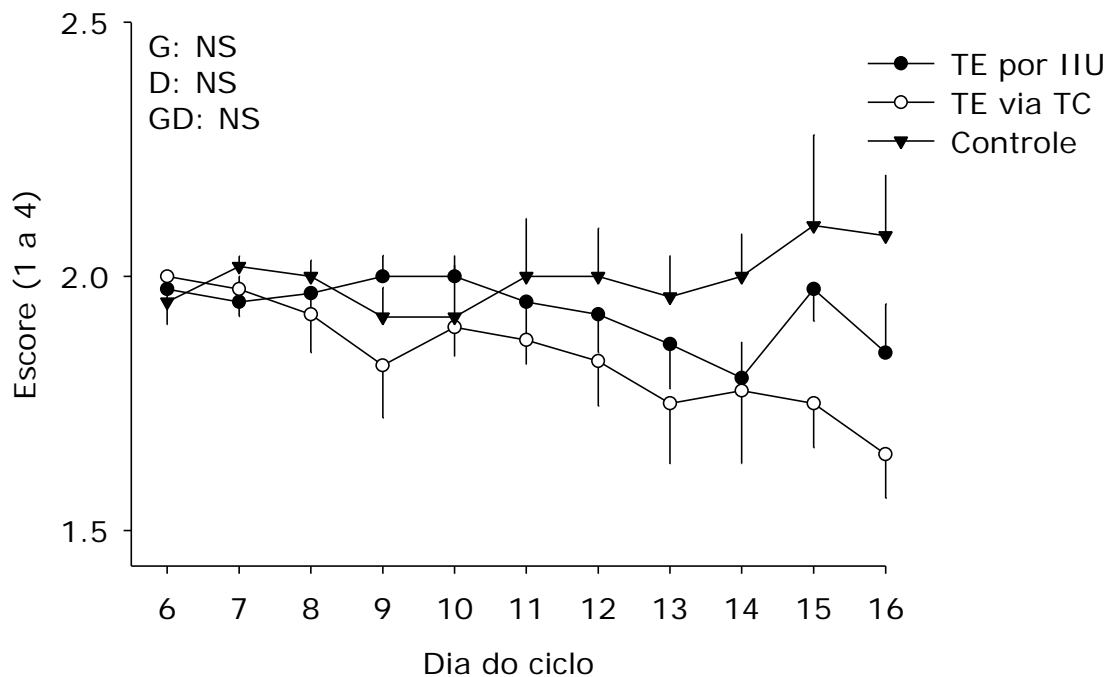


Figura 26. Tônus uterino diário (média \pm EPM) em éguas com DG negativo nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Os resultados do estudo do tônus uterino entre os Dias 6 e 16, demonstraram que, independente da técnica de TE utilizada, não houve diferença diária do tônus uterino quando comparado ao grupo Controle. O início da elevação do tônus uterino ocorreu a partir do Dia 11 nas

éguas com DG positivo. Provavelmente esse efeito esteja relacionado à presença da vesícula embrionária conforme sugerido anteriormente.

5.3.2.3. Ecotextura Uterina

Na FIG. 27 observa-se a distribuição média dos escores da ecotextura uterina nos devidos intervalos de tempo em minutos em cada grupo no Dia 7. Não foram encontrados efeitos de grupo, tempo ou interação entre grupos e tempos.

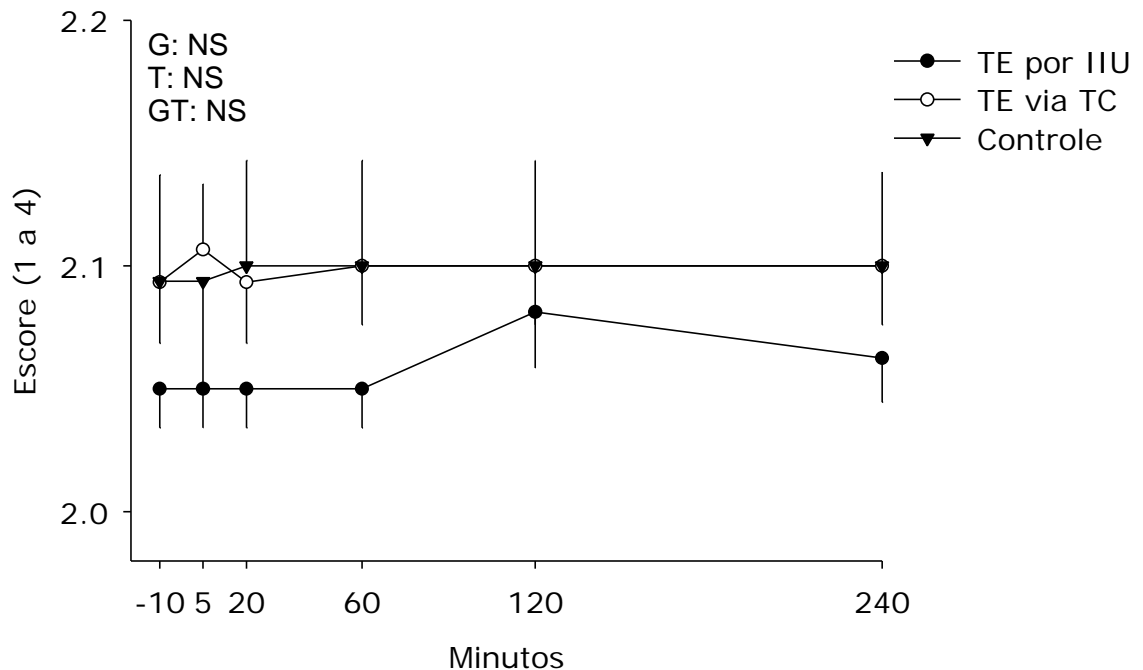


Figura 27. Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Quando as éguas de cada grupo foram subdivididas em dois subgrupos de DG positivo e DG negativo (FIG. 28), efeito de grupo, de

tempo ou de interação não foram encontrados. Semelhantemente, em éguas com DG positivo (FIG. 29) e DG negativo (FIG. 30), efeitos de grupo, tempo ou interação não foram encontrados. Nenhuma relação entre a ecotextura uterina no Dia 7 em momentos próximos à realização dos procedimentos de TE com os futuros resultados de prenhez foi encontrada, possivelmente devido às avaliações terem sido realizadas no Dia 7 em intervalos de minutos ou horas.

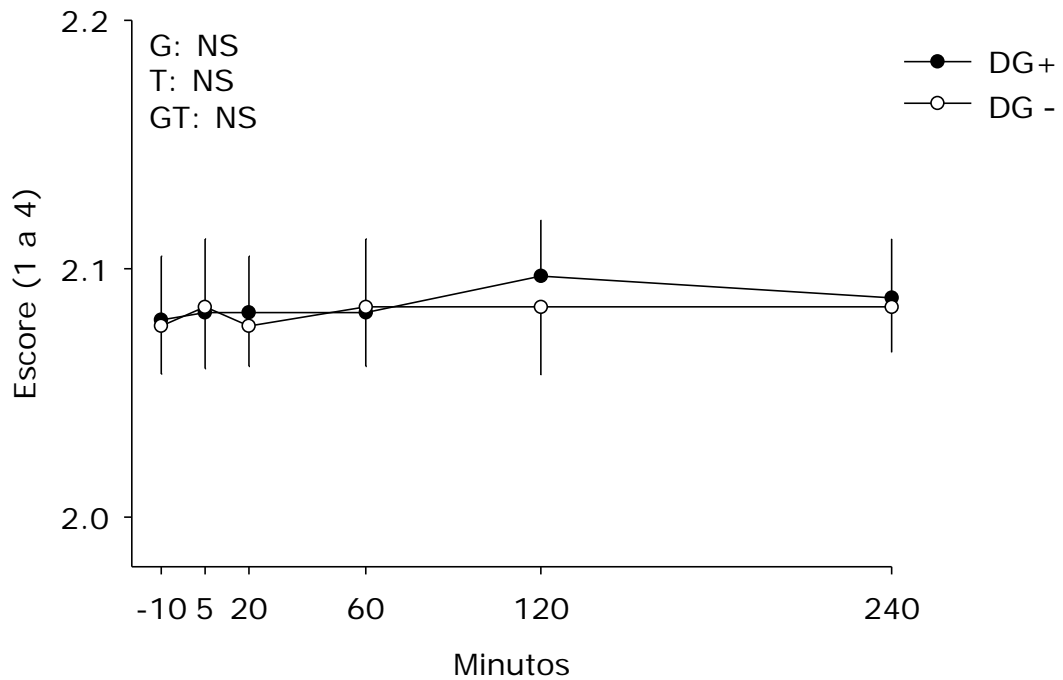


Figura 28. Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 nos subgrupos com DG positivo e DG negativo. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

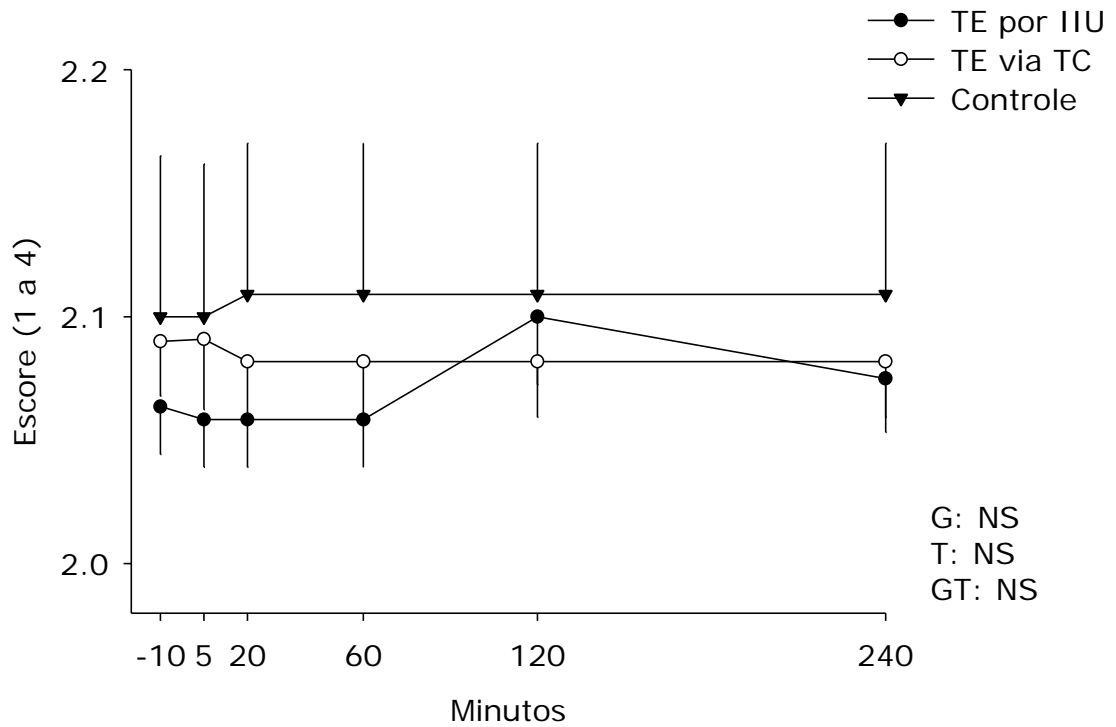


Figura 29. Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG positivo nos diferentes subgrupos. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

Diferentemente da contratilidade uterina que sofre a ação imediata de possíveis substâncias útero-cinéticas liberadas refratariamente à manipulação cervical, como citado anteriormente, a ecotextura uterina depende da ação dinâmica das variações das concentrações sanguíneas dos esteróides ovarianos, sendo sua alteração percebida em intervalos de tempo maiores (FIG. 32, 34 e 35).

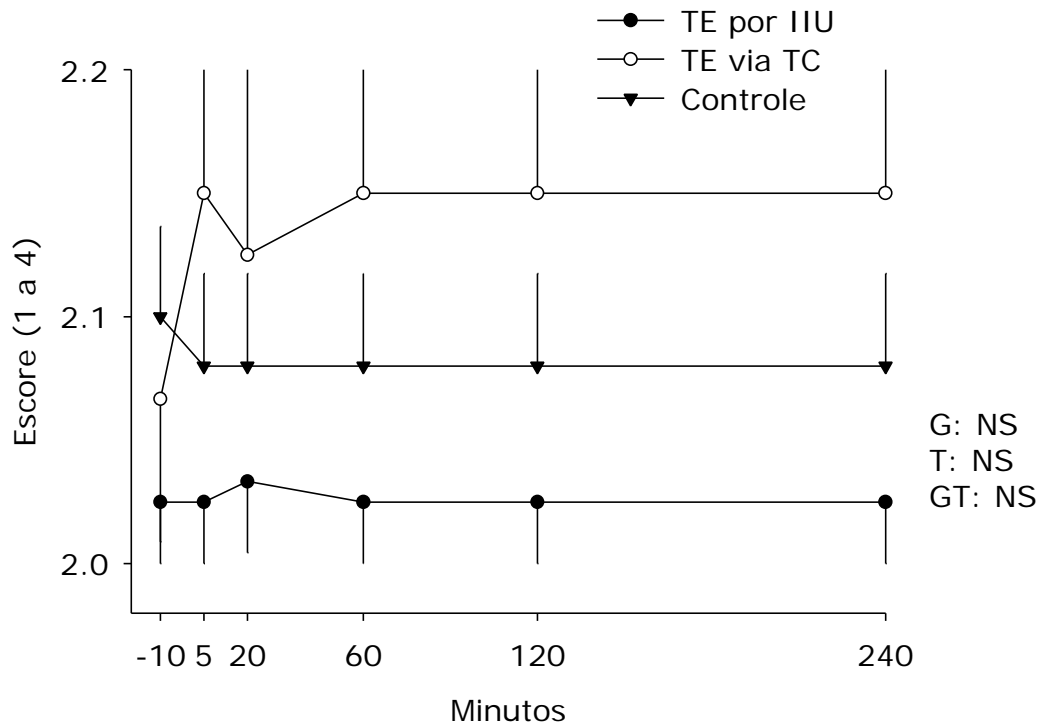


Figura 30. Ecotextura uterina (média \pm EPM) em diferentes tempos (minutos) no Dia 7 em éguas com DG negativo nos diferentes grupos. G = efeito de grupo; T = efeito de tempo; GT = interação; NS = não significativo.

A distribuição diária média dos escores da ecotextura uterina nos grupos TE por IIU, TE via TC e Controle entre os Dias 6 e 16 pode ser vista na FIG. 31. Efeito de dia foi encontrado sobre as médias diárias da ecotextura uterina.

Quando as médias de ecotextura uterina foram comparadas entre dias dentro do mesmo grupo, observou-se diferenças entre os Dias 7 e 10 (grupo TE por IIU, $P < 0,005$; grupo TE via TC, $P < 0,0001$) e entre os Dias 6 e 10 (grupo Controle, $P < 0,0004$). Na comparação das médias entre as técnicas no mesmo dia, diferença foi encontrada no Dia 13 entre as técnicas de TE via TC e TE por IIU ($P < 0,04$). Vale ressaltar que essa análise foi feita independentemente do DG dos animais.

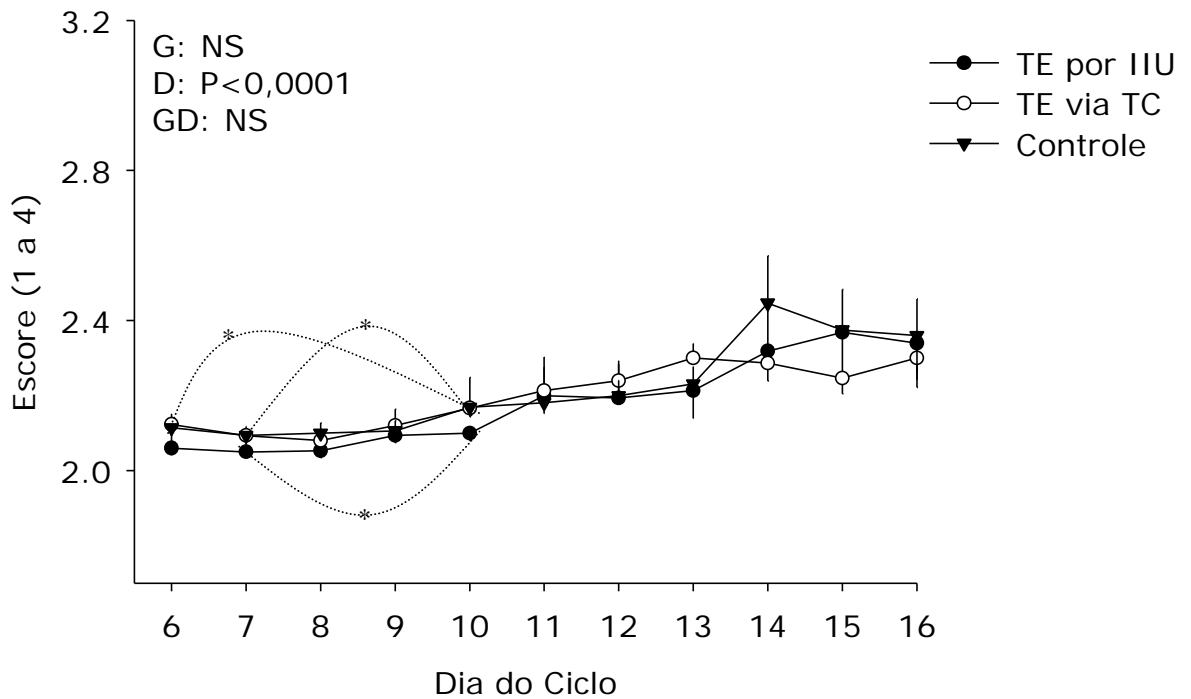


Figura 31. Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Na FIG. 32 observa-se a distribuição diária média da ecotextura uterina em animais com DG positivo e DG negativo, independente do grupo a que pertencem. Efeitos significativos de grupo, dia e interação grupo e dia foram encontrados. Nos subgrupos de animais com DG positivo e DG negativo, a primeira diferença ($P < 0,0001$) nas médias de ecotextura foi encontrada entre os Dias 7 e 11 e Dias 7 e 9, respectivamente. Apesar de elevação da ecotextura uterina ter sido localizada no grupo com DG positivo, fisiologicamente essa alteração não tem magnitude considerável, fato observado pelas pequenas variações diárias. Quando as médias de cada dia foram comparadas entre animais com DG positivo e DG negativo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os Dias 6 e 9. Todas as médias diárias de ecotextura uterina diferiram ($P < 0,05$) entre os grupos de DG positivo e DG negativo nos Dias 10 a 16.

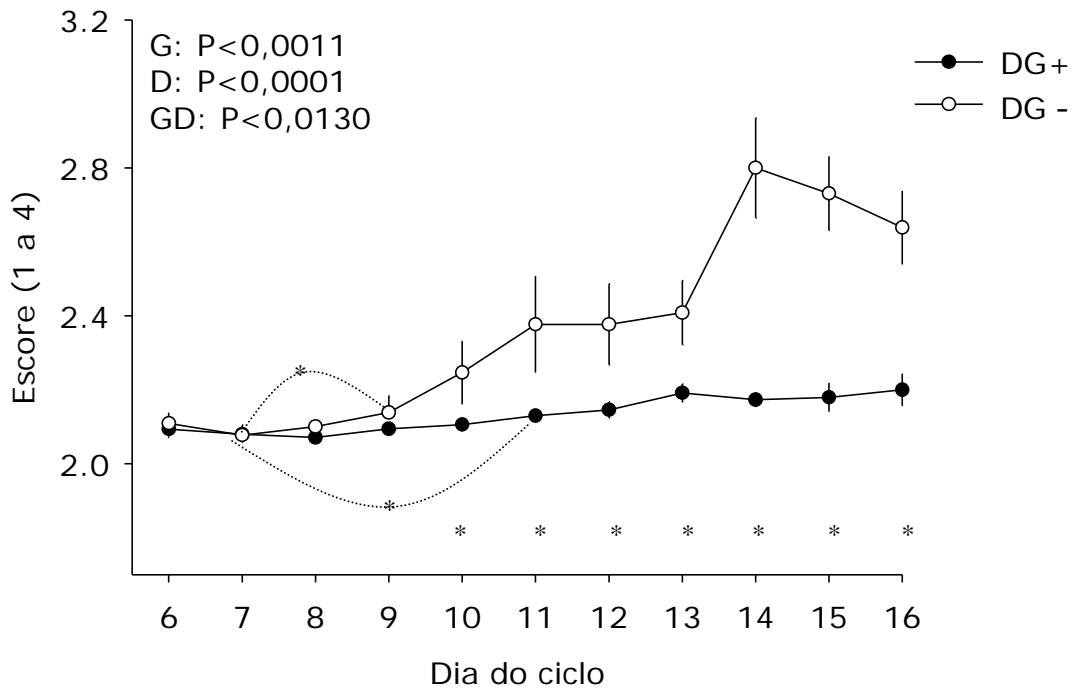


Figura 32. Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) nos grupos com DG positivo e DG negativo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Pode-se verificar ainda na FIG. 32 a grande elevação ocorrida no escore da ecotextura uterina no grupo de animais com DG negativo a partir do Dia 9. Mecanismos anti-luteolíticos, provavelmente, não estão presentes em éguas com DG negativo. Sabe-se que a vesícula embrionária é responsável pelo desencadeamento do processo de reconhecimento materno e, conseqüentemente, dos mecanismos anti-luteolíticos. A elevação do escore de ecotextura uterina provavelmente ocorreu devido à redução da concentração circulante de progesterona juntamente ao efeito do estrógeno produzido por folículos ovarianos do animal não gestante (SHARP, 2000; ALLEN, 2001).

Em éguas com DG positivo (FIG. 33), somente efeito de dia foi encontrado para a ecotextura uterina. Quando a ecotextura média diária foi analisada entre dias dentro do subgrupo de animais com DG positivo,

diferenças significativas iniciais foram encontradas nos grupos de TE por IIU (Dias 6 e 13; $P < 0,0490$) e TE via TC (Dias 7 e 13; $P < 0,0041$). Embora diferenças diárias tenham sido encontradas nos grupos com DG positivo, estas, provavelmente, não representam alterações significativas do ponto de vista fisiológico, devido às elevações diárias terem sido muito pequenas, apesar de detectadas estatisticamente.

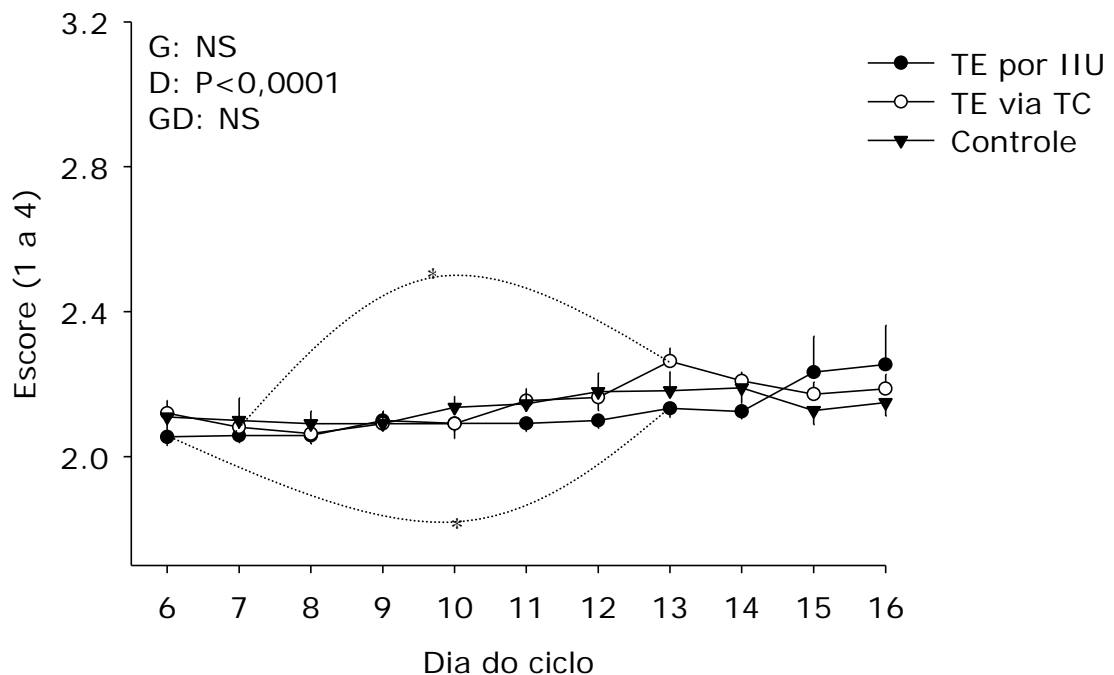


Figura 33. Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) em éguas com DG positivo nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

No subgrupo com DG negativo (FIG. 34), somente efeito de dia foi encontrado para a ecotextura uterina. Independentemente do tratamento, pode-se perceber a elevação da ecotextura uterina a partir do Dia 9 nos animais com DG negativo. Quando as médias de ecotextura uterina foram comparadas entre dias dentro do mesmo grupo, diferenças iniciais foram encontradas no grupo TE por IIU entre os Dias 7 e 11 ($P < 0,0103$) e no grupo Controle entre os Dias 7 e 10 ($P < 0,0001$). Na

comparação das médias entre os grupos dentro do mesmo dia, nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi localizada.

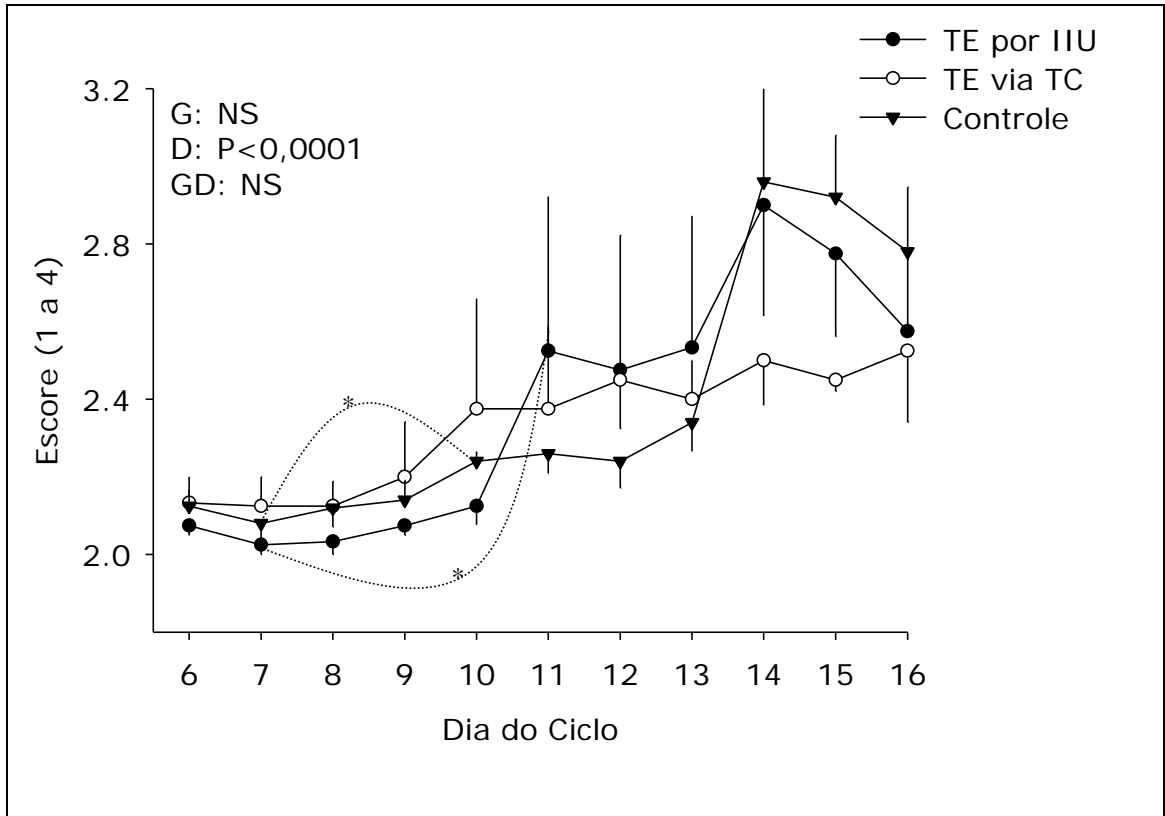


Figura 34. Ecotextura uterina diária (média \pm EPM) em éguas com DG negativo nos diferentes grupos. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Quando as médias diárias da ecotextura uterina foram comparadas entre os animais com DG positivo e negativo (FIG. 35), diferenças significativas foram encontradas em todos os grupos ($P < 0,05$). Esses resultados evidenciam o papel exercido pela presença da vesícula embrionária sobre os escores diários da ecotextura uterina.

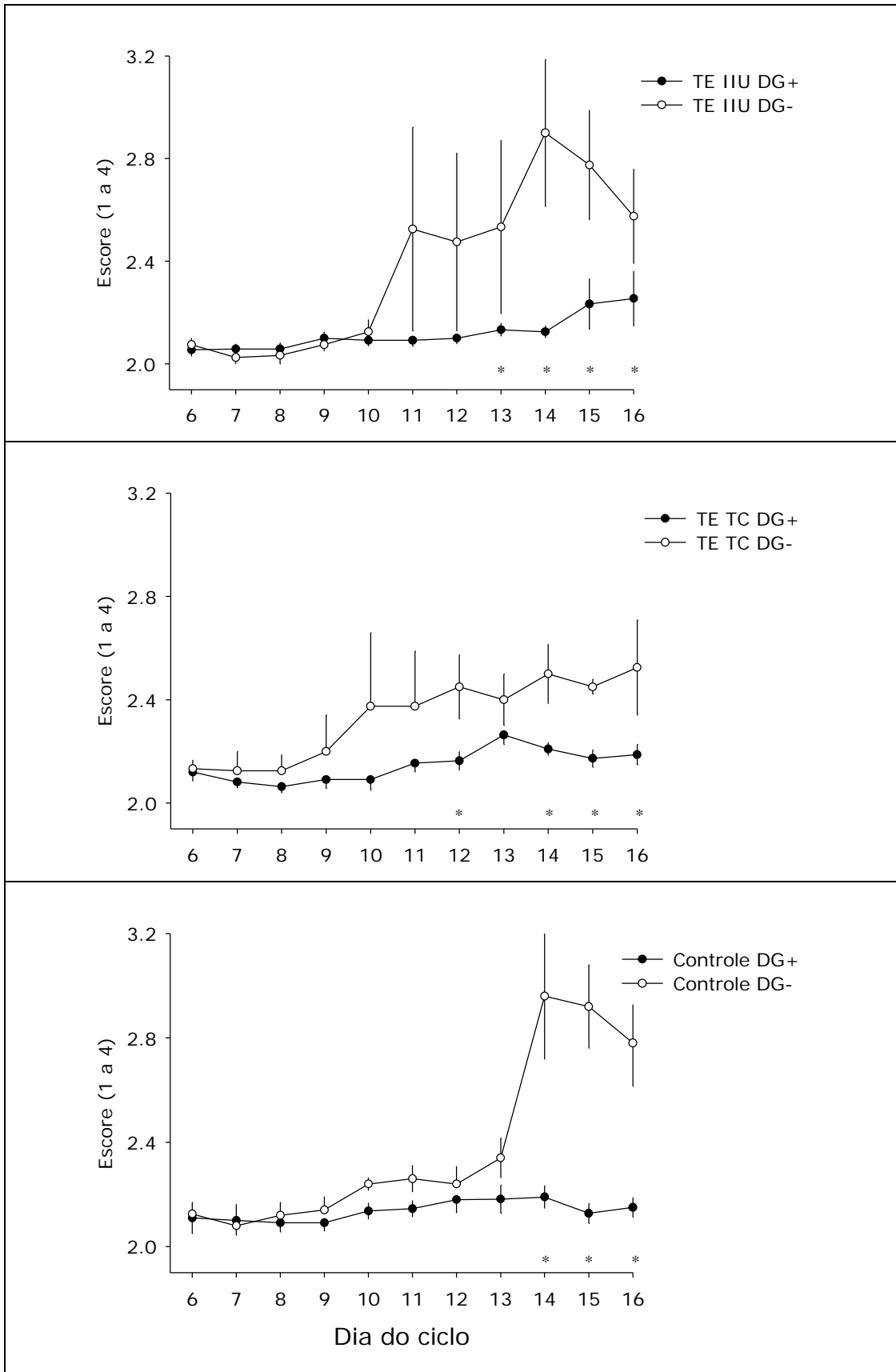


Figura 35. Ecotextura uterina diária (média ± EPM) nos diferentes grupos, subdivididos em DG positivo e DG negativo. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo.

5.3.3. Corpo Lúteo

No final da década de 60, o papel da PGF_{2a} como agente luteolítico foi demonstrado em ratos (PHARRISS & WYNGARDEN, 1969). DOUGLAS & GINTHER (1972) reportaram o efeito desse hormônio na redução da duração do ciclo estral de éguas. Posteriormente, outros estudos demonstraram que a liberação de PGF_{2a} está associada com condições uterinas patológicas (HUGHES et al., 1979) e com manipulações uterinas (BETTERIDGE et al., 1985).

Vários estudos avaliaram e demonstraram que o útero está diretamente envolvido no processo de luteólise em éguas (GINTHER, 1967, 1974, 1976). Outros estudos correlacionaram a indução de luteólise precoce com agentes irritantes ao útero, como por exemplo, a infusão uterina de solução salina no meio do diestro (GINTHER & MECKLEY, 1972; NEELY et al., 1975). Posteriormente, foi demonstrado que a dilatação cervical, efetuada com manipulação digital, diminuía o período de diestro, antecipando o início da fase estral (HURTGEN & WHITMORE, 1978). Sendo assim, alterações de contratilidade uterina, demonstradas no presente experimento após TE via TC, podem estar relacionadas à liberação de agentes útero-cinéticos pós-manipulação cervical, dentre eles a PGF_{2a} que sabidamente é um agente luteolítico. Recentemente, WÜSTENHAGEN et al. (2002) demonstraram que baixas doses de PGF_{2a} , consideradas inicialmente sem efeito luteolítico, são capazes de reduzir a duração do ciclo estral em éguas.

Na tentativa de descrever o comportamento do CL das receptoras de embrião frente às manipulações do trato reprodutivo efetuadas durante a realização das duas técnicas de TE deste estudo, comparando-as ao grupo Controle, o diâmetro e a área média do CL foram mensurados por ultra-sonografia.

Na FIG. 36 observa-se o diâmetro médio diário do corpo lúteo (CL) dos animais estudados em subgrupos de DG positivo e DG negativo, independente do grupo experimental a que pertenceram. Efeito de dia e de interação grupo e dia foram encontrados. A primeira diferença significativa de decréscimo do diâmetro do CL foi detectada entre os Dias 6 e 8 ($P < 0,0001$) e entre os Dias 8 e 11 ($P < 0,0001$), em éguas com DG positivo e DG negativo, respectivamente. Na comparação dos subgrupos de DG, dentro de cada dia, não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) no diâmetro médio do CL nos Dias 6 a 13. No entanto, diferenças ($P < 0,05$) entre os subgrupos foram encontradas após o Dia 13.

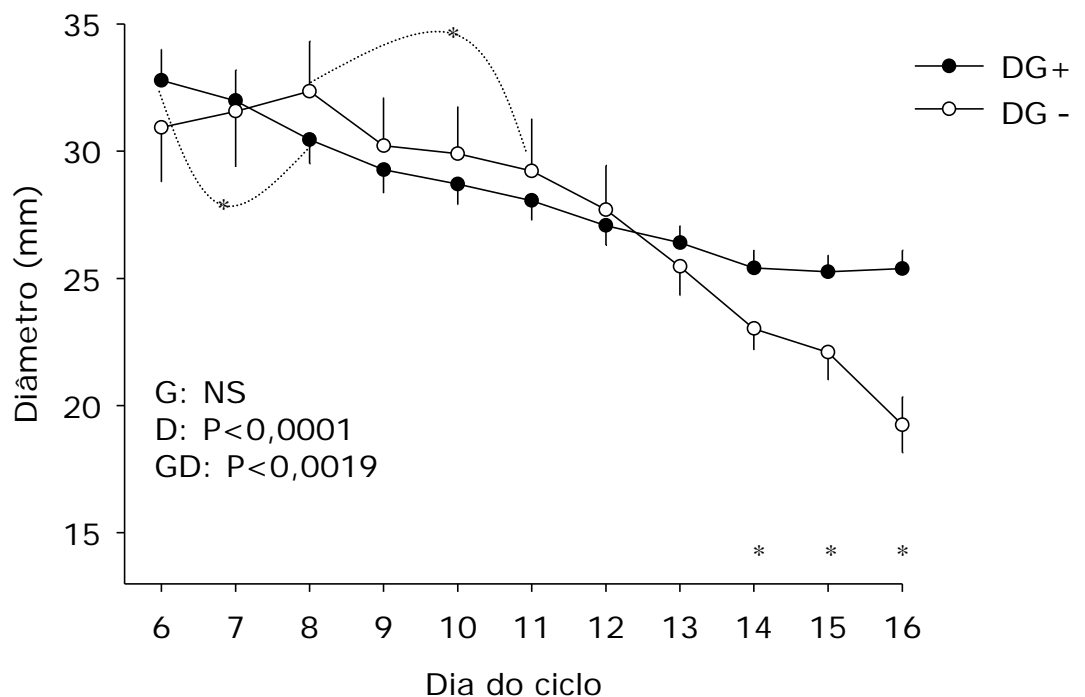


Figura 36. Diâmetro do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes subgrupos com DG positivo e DG negativo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Apesar do diâmetro do CL ter decrescido nos dois subgrupos de DG, esta queda foi menos pronunciada nos animais com DG positivo quando comparado aos animais com DG negativo em processo de luteólise funcional. A média geral (\pm EPM) do diâmetro do CL, entre os Dias 6 e 16, foi $28,2 \pm 0,29$ mm para o subgrupo com DG positivo e $27,4 \pm 0,61$ mm para o subgrupo com DG negativo.

O diâmetro médio do CL, nos Dias 6 e 16, dos animais com DG positivo e DG negativo foi 32,6 e 25,2 mm, e 31,3 e 19,2 mm, respectivamente. Este resultado sugere maior grau de luteólise no segundo grupo a partir do Dia 13. Análise da concentração plasmática de progesterona será fundamental para conclusões sobre a funcionalidade do corpo lúteo, mas não serão apresentadas nesta dissertação.

Na análise do diâmetro médio diário do corpo lúteo, considerando os animais com DG positivo (FIG. 37), somente efeito de dia foi encontrado. Diferenças iniciais entre médias diárias do diâmetro do CL foram encontradas em todos os grupos: Dias 6 e 9 (grupo TE por IIU; $P < 0,002$ e grupo TE via TC; $P < 0,0006$) e Dias 7 e 9 (grupo Controle; $P < 0,0094$). Quando as médias do diâmetro do CL foram avaliadas entre os grupos dentro de cada dia, não foi detectada diferença ($P > 0,05$) entre os três grupos.

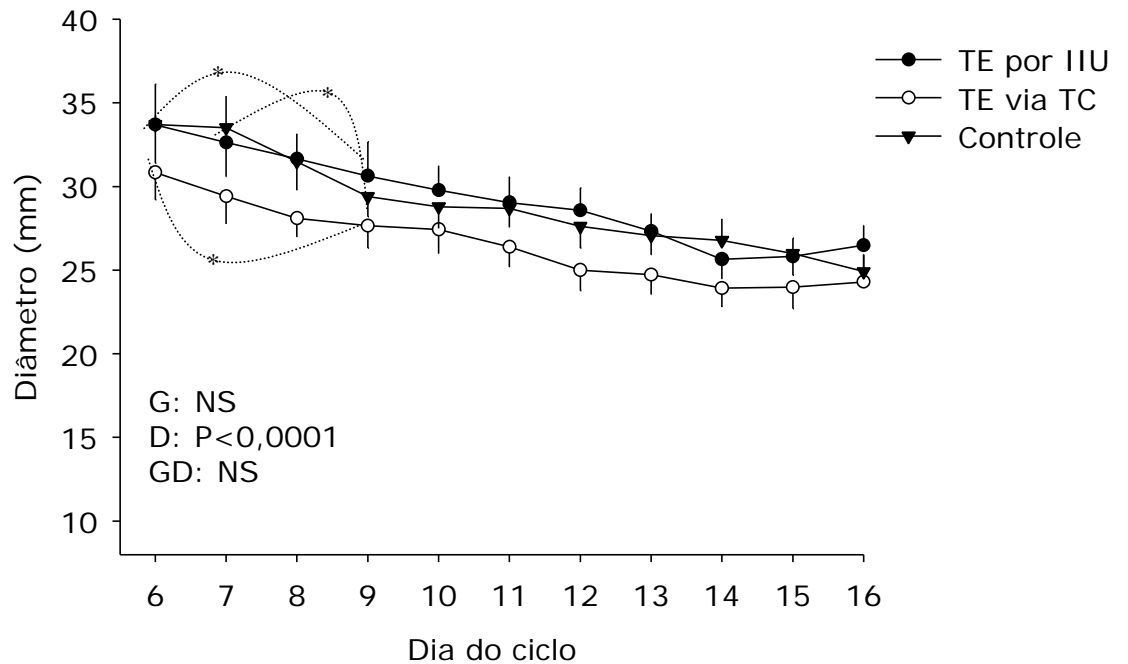


Figura 37. Diâmetro do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG positivo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Semelhantemente aos animais com DG positivo, quando da análise do diâmetro médio diário do corpo lúteo, nos animais com DG negativo (FIG. 38), somente efeito de dia foi encontrado. Diferenças iniciais entre médias diárias do diâmetro do CL foram encontradas em todos os grupos: Dias 8 e 12 (grupo TE por IIU; $P < 0,002$), Dias 6 e 11 (grupo TE via TC; $P < 0,0006$) e Dias 7 e 13 (grupo Controle; $P < 0,0094$).

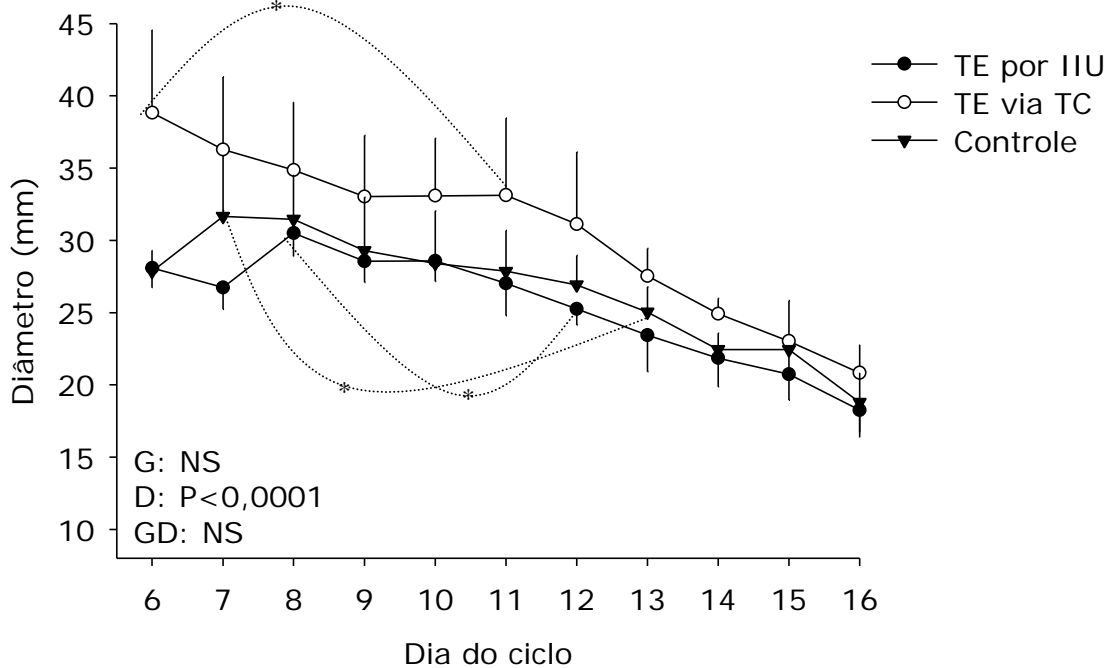


Figura 38. Diâmetro do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG negativo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Adicionalmente, quando a área média do CL foi estudada, nos dois subgrupos de DG (FIG. 39), observou-se efeito de dia e efeito de interação. Nos subgrupos com DG positivo e DG negativo foram encontradas as primeiras diferenças diárias entre as médias dos Dias 6 e Dia 8 ($P < 0,0001$) e dos Dias 8 e 10 ($P < 0,0001$), respectivamente. Na análise da área média do CL entre os subgrupos de DG dentro de cada dia, diferenças ($P < 0,05$) foram encontradas após o Dia 13. A área média geral (\pm EPM) do CL, entre os Dias 6 e 16 foi $6,4 \pm 0,14 \text{ cm}^2$ e $6,3 \pm 0,28 \text{ cm}^2$ para os subgrupos com DG positivo e DG negativo, respectivamente. A área média do CL, nos Dias 6 e 16, dos animais com DG positivo e DG negativo foi $8,6$ e $5,0 \text{ cm}^2$ e, $8,1$ e $2,9 \text{ cm}^2$, respectivamente, sugerindo novamente maior grau de luteólise no segundo grupo.

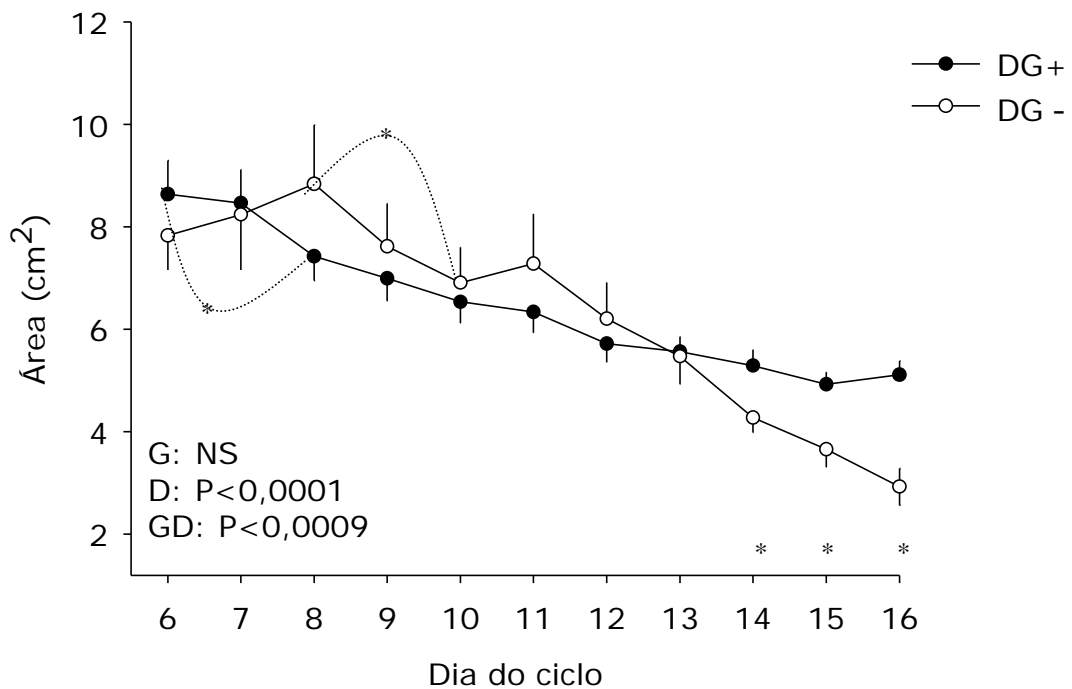


Figura 39. Área do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes subgrupos com DG positivo e DG negativo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. Estrelas isoladas na base do gráfico representam a presença de diferenças entre grupos dentro de cada tempo. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

No subgrupo com DG positivo foi encontrado somente efeito de dia ($P < 0,0001$) sobre a área média do corpo lúteo (FIG. 40). Quando as médias diárias foram analisadas entre dias dentro de cada grupo experimental com DG positivo, as primeiras diferenças foram encontradas entre: os Dias 6 e 9 (grupo TE por IIU; $P < 0,0001$), Dias 6 e 8 (grupo TE via TC; $P < 0,0003$) e Dias 6 e 10 (grupo Controle; $P < 0,0001$). Na comparação dos grupos experimentais dentro dos mesmos dias, não foi detectada diferença ($P > 0,05$) entre os mesmos.

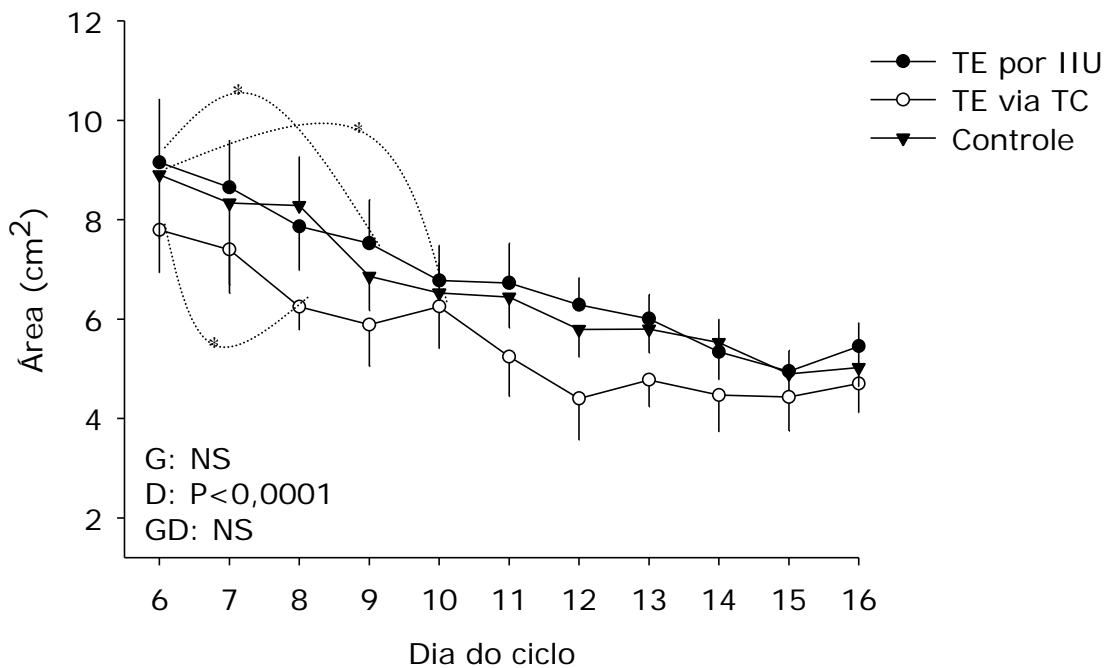


Figura 40. Área do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG positivo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

No subgrupo com DG negativo foi encontrado somente efeito de dia sobre a área média diária do corpo lúteo (FIG. 41). Quando as médias diárias foram analisadas entre dias dentro de cada grupo experimental com DG negativo, diferenças iniciais foram observadas entre: Dias 8 e 12 (grupo TE por IIU; $P < 0,0080$), Dias 6 e 12 (grupo TE via TC; $P < 0,0001$) e Dias 7 e 13 (grupo Controle; $P < 0,0005$).

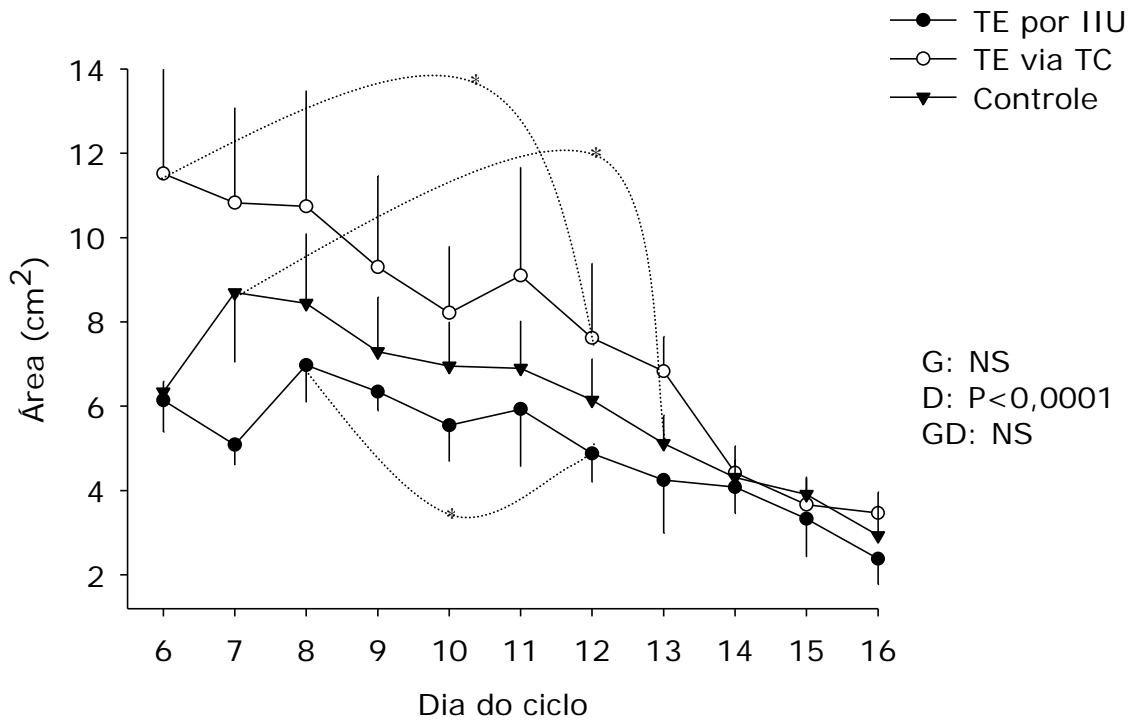


Figura 41. Área do corpo lúteo (média \pm EPM) nos diferentes grupos com DG negativo. As linhas pontilhadas com estrela ligam médias diferentes, demonstrando a primeira diferença significativa evidenciada. G = efeito de grupo; D = efeito de dia; GD = interação; NS = não significativo.

Analisando os resultados obtidos nas análises do diâmetro e da área do CL, pode-se verificar que:

1. Os animais com DG negativo tiveram maior redução desses parâmetros entre os Dias 6 e 16;
2. Não houve diferença entre as técnicas de TE utilizadas e grupo Controle, demonstrando ausência de efeito da técnica de TE, uma vez que todas as médias se aproximaram do padrão fisiológico;

3. Em todos os grupos, independentemente do DG, as médias desses parâmetros reduziram entre os Dias 6 e 16. A organização morfo-estrutural do CL provavelmente seja responsável por isso. No entanto, nos animais com DG positivo, foram encontradas maiores médias para os CL após o Dia 13, sugerindo maior resistência desses ao processo luteolítico.

5.3.4. Dinâmica da Vesícula Embrionária

Os parâmetros avaliados relacionados à vesícula embrionária (VE) foram: dia da primeira detecção ultra-sonográfica, mobilidade e fixação. Os achados médios referentes à primeira detecção da vesícula embrionária podem ser observados na TAB. 12.

Tabela 12. Distribuição do número de vesículas embrionárias e seus percentuais nos dias da primeira detecção.

	Dias						Total
	9	10	11	12	13	14	
N	4	20	7	1	0	1	33
%	12,2	60,6	21,2	3,0	-	3,0	100
% Acumulado	12,2	72,8	94,0	97,0	-	100	100

Maior número de VE (20/33; 60,6%), foi detectado pela primeira vez no Dia 10, seguido pelo Dia 11 (7/33; 21,2%). Poucas vesículas (4/33; 12,1%) foram detectadas no Dia 9 (TAB. 12 e FIG.43). Esses achados são similares a prévios relatados da literatura (GINTHER, 1983a). Os dias médios da primeira detecção das VE foram $9,9 \pm 0,3$, $10,1 \pm 0,2$ e $10,7 \pm 0,3$ ($P > 0,05$), respectivamente para os grupos TE por IIU, TE via TC e Controle.

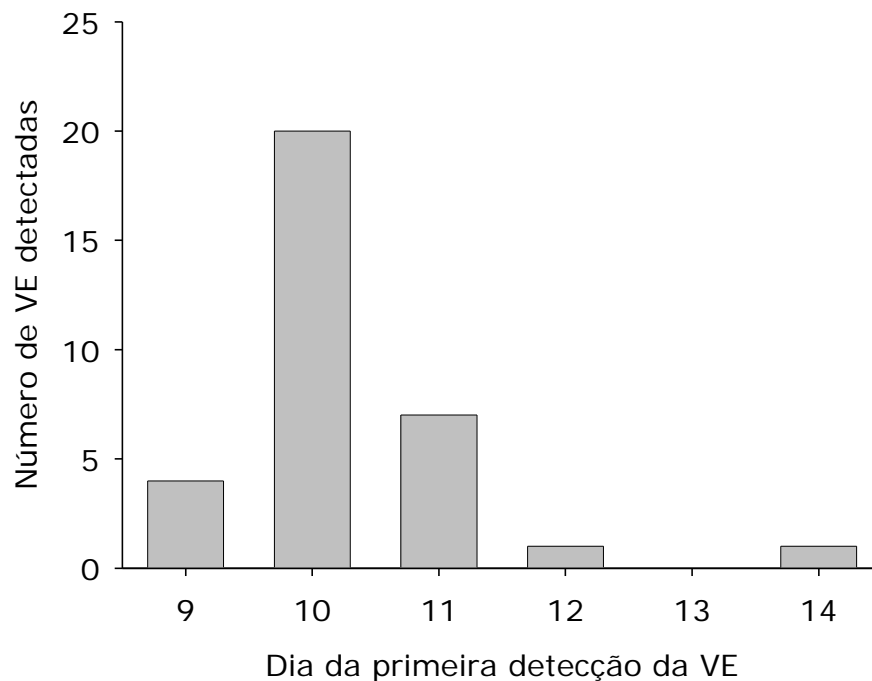


Figura 42. Distribuição diária do número de vesículas embrionárias no dia da primeira detecção.

Quando o diâmetro médio de todas as VE estudadas, independentemente do grupo, foi comparado entre os dias da primeira detecção, diferença ($P < 0,05$) foi encontrada entre o Dia 9 com os Dias 10, 11 e 14 (FIG. 43). Os diâmetros médios das VE no primeiro dia de

deteccção, entre os grupos, foram $3,3 \pm 0,25$ mm (TE por IIU), $4,3 \pm 0,37$ mm (TE via TC) e $5,3 \pm 0,31$ mm (Controle), sendo que, o diâmetro médio das VE no dia da primeira deteccção foi inferior ($P < 0,0002$) no grupo TE por IIU comparado ao grupo Controle.

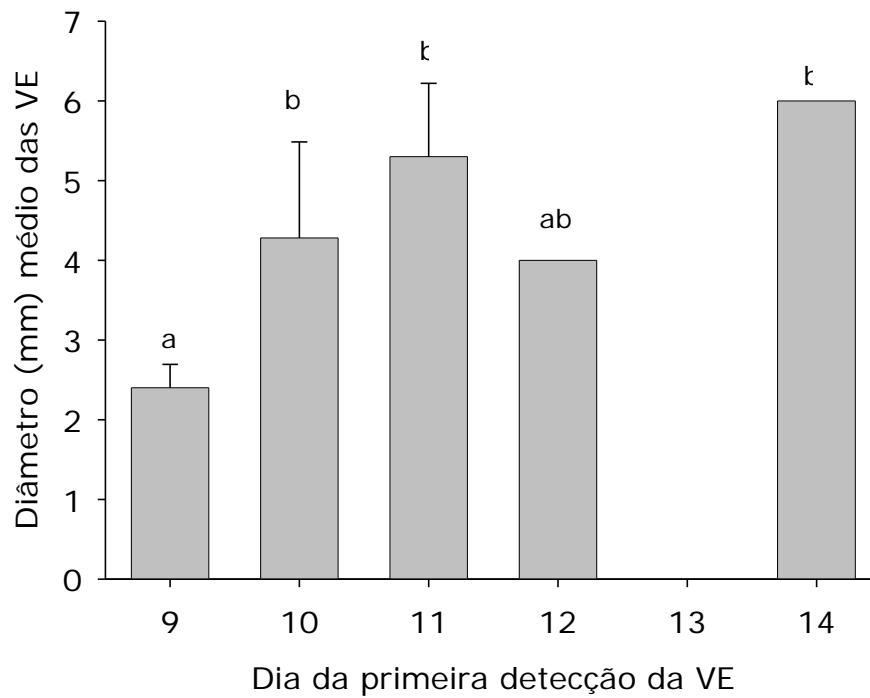


Figura 43. Distribuição diária do diâmetro médio das vesículas embrionárias no dia da primeira deteccção.

Apesar do limitado número de vesículas embrionárias analisadas, pode-se concluir que:

1. A VE eqüina do Dia 9, embora muito pequena e normalmente no limite mínimo de diâmetro do poder de resolução do transdutor de 5 MHz, pode ser detectada com um

escaneamento minucioso do útero. Vale ressaltar que somente em éguas jovens foi possível a detecção da VE no Dia 9. Nestes animais o útero geralmente foi de tamanho reduzido quando comparado ao restante dos animais trabalhados e sempre possuiu ecotextura e tónus uterinos com escores próximos de 2, o que facilitou este diagnóstico precoce;

2. A maior parte das VE eqüinas podem ser diagnosticadas pela primeira vez até o Dia 11 com o uso da ultra-sonografia. O dia médio da primeira detecção não foi diferente entre os grupos de TE com o Controle. Adicionalmente, faz-se necessário salientar que os embriões utilizados nas duas técnicas de TE foram manipulados *in vitro* (Dia 7), ao contrário do grupo Controle;
3. Diagnósticos iniciais realizados somente após o Dia 12 podem ter sido oriundos de VE com desenvolvimento retardado. Associado a esse fator, em alguns casos, pode-se encontrar escores de ecotextura e de tónus uterinos um pouco elevados, o que dificultam o DG precoce.

A mobilidade da VE foi avaliada no Dia 13 de gestação por ser este o dia de maior atividade dinâmica da mesma (GRIFFIN & GINTHER, 1993b; GINTHER, 1995b). Neste estudo, objetivou-se avaliar possíveis diferenças de intensidade de deslocamento da VE entre as duas técnicas de TE e o grupo Controle, considerado como padrão fisiológico. Seguindo a metodologia previamente descrita de exames ultra-sonográficos a cada 5 minutos durante duas horas, computou-se toda mudança de local da VE nos nove segmentos uterinos durante esse período. O número médio

de deslocamentos da VE entre os diferentes segmentos uterinos (TAB. 13) não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 13. Número médio de deslocamentos das vesículas embrionárias, entre os diferentes segmentos uterinos, em cada grupo.

	Grupos			Total
	TE por IIU	TE via TC	Controle	
N	9	10	9	28
Média	13,1 ± 1,2	12,1 ± 1,2	12,1 ± 1,5	12,4 ± 0,7

$P > 0,05$ (ANOVA)

O dia de fixação da VE foi definido como o dia onde, realizados exames periódicos com intervalos de 5 minutos durante 2 horas, esta não se movimentou dentro do útero, conforme metodologia já descrita (GINTHER, 1995b). Para confirmação e maior segurança, no dia posterior ao dia de fixação, confirmou-se que a VE ainda estava no mesmo segmento uterino, fato que ocorreu em todas as observações.

Na TAB. 14 e na FIG. 44 observa-se a distribuição das VE nos respectivos dias de fixação em cada grupo. Verifica-se que o maior percentual de fixação ocorreu no Dias 16 (37%; 10/27). O dia médio de fixação da VE, independentemente de grupo, foi $16,6 \pm 0,22$, o que se assemelha aos achados da literatura (GINTHER, 1983; 1995b).

Tabela 14. Distribuição do número de vesículas embrionárias fixadas por dia de detecção.

	Dias					Total
	15	16	17	18	19	
N	4	10	7	4	2	27
%	14,8	37,0	25,9	14,9	7,4	100
% Acumulado	14,8	51,8	77,7	92,6	100	

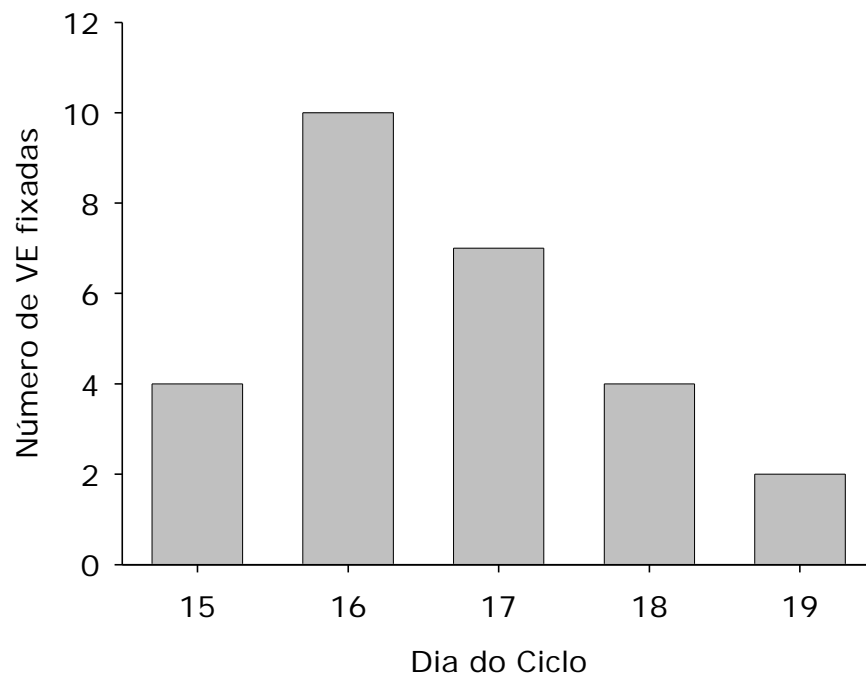


Figura 44. Distribuição do número de vesículas embrionárias fixadas por dia.

6. Conclusões

1. A técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina (IIU) é eficiente e possui alta repetibilidade para a injeção de substâncias no lúmen uterino;
 2. Para a completa avaliação da eficiência da técnica ultra-sonográfica de IIU quatro parâmetros ultra-sonográficos (ponta da agulha, ponta do cateter, movimentos de vai-e-vem e ejeção de fluido) são fundamentais no momento do procedimento. A visualização da ejeção de fluido é o parâmetro de maior grau de confiabilidade;
 3. A técnica ultra-sonográfica de IIU utilizada para transferência de embriões (TE) em eqüinos é um método alternativo viável;
 4. A hipótese de que a técnica ultra-sonográfica de IIU resultaria em taxas de prenhez superiores à TE transcervical convencional não foi sustentada, pois as taxas de prenhez obtidas com as duas técnicas foram similares e elevadas.
 5. A TE realizada por meio da técnica ultra-sonográfica de IIU não altera a contratilidade, o tônus e a ecotextura uterina. Por outro lado, a contratilidade uterina aumenta transitoriamente após a TE transcervical, sugerindo a liberação de substâncias útero-cinéticas pelo método não-cirúrgico convencional de TE;
-

6. As duas técnicas de TE (IIU e transcervical convencional) não interferem com a vida média do corpo lúteo entre os Dias 6 e 16 pós-ovulação.
 7. Independente da técnica de TE utilizada, o padrão de mobilidade da VE, bem como o dia de fixação da mesma, são similares ao de éguas inseminadas/cobertas.
 8. Finalmente, pode-se concluir que a técnica ultra-sonográfica de IIU é mais um método alternativo de TE, com taxas de prenhez similares aos métodos atuais e que pode ser uma opção valiosa para éguas com histórico de dificuldade de transposição da cérvix durante o procedimento de inováção. Além disso, esta técnica pode representar um grande potencial para maximizar a utilização da TE em outras espécies (exemplo: asinina, animais exóticos e bovina – em casos específicos), necessitando-se estudos futuros para sua aplicação.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR J, WOODS GL. Embryo transfer in horses: indications, technique, and expected outcomes. In: Youngquist, R.S. (Ed.) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. p. 208-213, 1997.
- ALLEN WR, ROWSON IE. Transfer of ova between horses and donkeys. Proc. **7th Int. Cong. Anim. Reprod. and A. I.**, Munich: 484-487, 1972.
- ALLEN WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, 121:513-527, 2001.
- ALVARENGA MA, McCUE PM, SQUIRES EL, NEVES NETO JR. Improvement of ovarian superovulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **5th International Symposium on Equine Embryo Transfer**. Saari, Finland. 39, 2000.
- ALVARENGA MA, ALVARENGA FCL, MEIRA C. Some modifications in the technique used to recover equine embryos. **The Third International Symposium on Equine Embryo Transfer**. Buenos Aires, Argentina. 13, 1992.
- BALL BA, HILLMAN RB, WOODS GL. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. **Theriogenology**, 28:167-174, 1987.
- BALL BA, LITTLE TV, HILLMAN RB, WOODS GL. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology**, 1986.
- BALL BA, LITTLE TV, WEBER JA, WOOD GL. Survival of Day-4 embryos from young, normal and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J. Reprod. Fertil.**, 85: 187-209, 1989.
-

- BARROS CWC, BÉNYEI B. Comparison between Zwitterion and phosphate buffer-based bovine embryo handling solutions for embryo storage and transfer in a tropical environment. **Theriogenology**, 53:308, 2000.
- BATTUT I, COLCHEN S, FIÉNI F, TAINTURIER D, BRUYAS J-F. Success rates attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 25): 60-62, 1997.
- BERGFELT DR, BROGLIATTI GM, ADAMS GP. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, 50:15-25, 1998.
- BERGFELT DR. Estrous Synchronization. In: Samper, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Pennsylvania: Saunders Company, p. 229-246, 2000.
- BETTERIDGE KJ, EAGLESOME MD, MITCHEL D, FLOOD PF, BÉRIAULT R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **J. Anat.**, 135:191-209, 1982.
- BETTERIDGE KJ, MITCHEL D. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. **J. Reprod. Fertil.**, 39:145-148, 1974.
- BETTERIDGE KJ, RENARD A, GOFF AK. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 3):25-33, 1985.
- BETTERIDGE KJ. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 8):92-100, 1989.
- BRISTOL F. Synchronization of ovulation. In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Ed.) **Equine Reproduction**. 1993. p. 348-352.
- BRUCK I, RAUN K, SYNNESTVEDT B, GREVE T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Vet. J.**, 24:58-59, 1992.
- BUTLER JE, BIGGERS JD. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. **Theriogenology**, 31:115-126, 1989.
- CADARIO ME, THATCHER WW, Klapstein E, MERRIT AM, ARCHBALD LF, THATCHER MJ, LeBLANC MM. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductively normal mares and mares with delayed uterine clearance. **Theriogenology**, 52:1181-1192, 1999.
-

- CARNEVALE EM, GINTHER OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biol. Reprod.**, (Mono. 1):209-214, 1995.
- CARNEVALE EM, GINTHER OJ. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **J. Equine Vet. Sci.**, 13(6):331-333, 1993.
- CARNEVALE EM, RAMIREZ RJ, SQUIRES EL, ALVARENGA MA, VANDERWALL DK, McCUE PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, 54:965-979, 2000.
- CARNEVALE EM. Gamete Intrafallopian Transfer. In: Squires E.L. (ed) **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology, 12(1):47-60, 1996.
- CARNEY NJ, SQUIRES EL, COOK VM, SEIDEL GR Jr, JASKO DJ. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, 36:23-32, 1991.
- CARVALHO GR. **Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões em eqüinos**. DS. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG, Brasil, 102 pp, 2000.
- CHU, J.W.K., SHAROM, F.J., ORIOL, J.G.; BETTERIDGE, K.J.; CLEAVER, B.D., SHARP, D.C. Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin-induced pregnancy failure. **Mol. Reprod. Dev.**, 46:286-295, 1997.
- COOK NL, SQUIRES EL, RAY BS, JASKO DJ. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. **Equine Vet. Sci.**, (Suppl. 15): 71-74, 1993.
- CROSS DT, GINTHER OJ. The effect of estrogen, progesterone and prostaglandin F₂ α on uterine contractions in seasonally anovulatory mares. **Dom. Anim. Endocr.**, 4:271-278, 1987.
- CURRAN S, GINTHER OJ. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Equine Vet. Sci.**, 9:77-83, 1989.
- CURRAN S, GINTHER OJ. Ultrasonic fetal gender diagnoses during months 5 to 11 in mares. **Theriogenology**, 40:1127-1135, 1993.
- DOUGLAS RH, GINTHER OJ. Effect of prostaglandin F₂ α on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, 2:265-268, 1972.
- DOUGLAS RH. Some aspects of equine embryo transfer. **J. Reprod. Fertil.**, (Suppl. 32):405-408, 1982.
- EAST LM, VAN SAUN RJ, VANDERWALL DK. Equine Embryo Transfer. Part 1: Donor and Recipient Selection and Preparation. **Equine Pract.**, 20 (8): 16-20, 1998.
-

- FLEURY JJ. Transferência não cirúrgica de embriões eqüinos colhidos no oitavo dia pós-ovulação. **Arq. Fac. Vet.**, UFRGS, 26 (Suppl. 1): 266, 1998.
- FLOOD PF, JONG A, BETTERIDGE KJ. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **J. Reprod. Fertil.**, 57:291-294, 1979.
- FREEMAN DA, WEBER JA, GEARY RT, WOODS GL. Time of embryo transport through the mare oviduct. **Theriogenology**, 36:823-830, 1991.
- GASTAL EL, GASTAL MO, GINTHER OJ. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, 50:1025-1038, 1998a.
- GASTAL MO, GASTAL EL, RIVERA AP, SILVA LA. Evaluation of the transvaginal ultrasound-guided intrauterine injection technique for embryo transfer in mares. **Theriogenology**, 58:725-728, 2002.
- GASTAL MO, GASTAL EL, TORRES CAA, GINTHER OJ. Effect of PGE₂ on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, 50:989-999, 1998b.
- GASTAL MO. **Estudo da Função Uterina no Fenômeno de Fixação da Vesícula Embrionária em Éguas: Contribuição da Contratilidade e do Tônus Uterino.** DS. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG, Brasil, 90 pp, 1998.
- GINTHER OJ, MECKLEY PE. Effect of intrauterine infusion on length of diestrus in cows and mares. **Vet. Med. /Sm. Anim. Clin.**, 67:751-754, 1972.
- GINTHER OJ, PIERSON RA. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, 21:505-515, 1984.
- GINTHER OJ. Comparative anatomy of uteroovarian vasculature. **Vet. Scope**, 20:3-17, 1976.
- GINTHER OJ. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. In: Equine Embryo Transfer. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 3:41-47), 1985.
- GINTHER OJ. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, 19:613-623, 1983b.
- GINTHER OJ. Internal regulation of physiological processes through venoarterial pathways: A review. **J. Anim. Sci.**, 39:550-564, 1974.
- GINTHER OJ. Local utero-ovarian relationships. **J. Anim. Sci.**, 26:578-585, 1967.
-

- GINTHER OJ. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, 19:602-611, 1983a.
- GINTHER OJ. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. Equiservices, Cross Plains, WI, 2^a ed, 642 pp, 1993.
- GINTHER OJ. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamentals**. Book 1. Cross Plains, WI: Equiservices, 225 pp, 1995a.
- GINTHER OJ. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses**. Book 2. Cross Plains, WI: Equiservices, 394 pp, 1995b.
- GINTHER OJ. **Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare**. Cross Plains, WI: Equiservices, 1986.
- GRIFFIN PG, GINTHER OJ. Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. **Theriogenology**, 39:997-1008, 1993a.
- GRIFFIN PG, GINTHER OJ. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Anim. Reprod. Sci.**, 31:311-329, 1993b.
- GRIFFIN PG, GINTHER OJ. Research Applications of Ultrasonic Imaging in Reproductive Biology. **J. Anim. Sci.**, 70:953-872, 1992.
- GRIFFIN PG, GINTHER OJ. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, 34:47-56, 1990.
- GRONDAHL C, GRONDAHL NC, ERIKSEN T, GREVE T, HYTTEL P. In-vivo fertilization and initial embryogenesis in the mare. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15): 79-83, 1993.
- HANDLER J, KÖNIGSHOFER M, KINDADL H, AURICH JE, AURICH C. Prostaglandin release and cycle length in mares after cervical manipulation. **14 Inter. Congr. Anim. Reprod.**, 1:30 (Abstr.), 2000.
- HANDLER J, KÖNIGSHOFER M, KINDADL H, SCHAMS D, AURICH C. Secretion patterns of oxytocin and PGF-2a-metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. **Theriogenology**, 59:1381-1391, 2003.
- HARPER MJK. Gamete and zygote transport. In:Knobil, E., Neill, J.D. (Eds). **The Physiology of Reproduction**. New York, Raven Press, 1:103-134, 1988.
- HAYES KEN, PIERSON RA, SCRABA ST, GINTHER OJ. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, 24:465-477, 1985.
-

- HIGGINS AJ, LEES P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Equine Vet. J.**, 16:163-175, 1984.
- HINRICHS K, SERITCH PL, PALMER E. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. **J. Reprod. Fertil.**, 3:451-453, 1987.
- HINRICHS K. Production of embryos by assisted reproduction in the horse. **Theriogenology**, 49:13-21, 1998.
- HUGHES JP, STABENFELDT GH, KINDAHL H, KENNEDY PC, EDQVIST LE, NEELY DP, SCHALM OW. Pyometra in the mare. **J. Reprod. Fert.**, (Suppl. 27):321-329, 1979.
- HURTGEN JP, WHITMORE HL. Effects of endometrial biopsy, uterine culture, and cervical dilatation on the equine estrous cycle. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, 173:97-100, 1978.
- HURTGEN JP, GANJAM VK. The effect of intrauterine and cervical manipulation on the equine oestrus cycle and hormone profiles. **J. Reprod. Fert.**, (Suppl. 27): 191-197, 1979.
- IMEL KJ, SQUIRES EL, ELSDEN RP, SHIDELER RK. Collection and transfer of equine embryos. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 179: 987-91, 1981.
- IMEL KJ.** Recovery, culture and transfer of equine embryos. **MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, 1981.**
- IULIANO MS, SQUIRES EL, COOK VM. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **J. Anim. Sci.**, 60 (1): 258-263, 1985.
- IULIANO MS. **The effect of age of the equine embryo and method of transfer on pregnancy rate.** MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, 1983.
- JACOB JCF, DOMINGUES IB, GASTAL EL, GASTAL MO, SILVA AG, MELLO CM, GASPARETTO F. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. **Theriogenology**, 57: 545, 2002.
- KANITZ W, BECKER F, SPITSCHAK M, TORNER H. Method and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. In: **9th Scientific Meeting AETE**, Lyon, 10-11, 1993.
- KASK K, MALMGREN L, ODENSVIK K. Prostaglandin F_{2α} metabolite levels following an embryo transfer procedure in the mare. **Acta Vet. Scand.** 36:145-147, 1995.
-

- KASK K, ODENSVIK K, KINDAHL H. Prostaglandin F_{2α} release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Vet. J.**, 29 (4):286-289, 1997.
- LAGNEAUX D, PALMER E. Are pony and larger mares similar as recipients for nonsurgical transfer of day 7 embryos? **Equine Vet. J.**, (Suppl. 32):47-51, 1989.
- LEITH GS, GINTHER OJ. Characterization of intra-uterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, 22:401-408, 1984.
- McCUE PM, SCOGGIN CF, MEIRA C, SQUIRES EL. Pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 versus EmCare™ embryo holding solution. In: **Proc. of the Ann. Conf. of Soc. Theriogenology**, 147, 2000.
- McCUE PM. Superovulation. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, 12:1-11, 1996.
- McKINNON AO, SQUIRES EL, CARNEVALE EM, HARRISON LA, FRANTZ DD, McCHESNEY AE, SHIDELER RK. Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare. **Proc. 33rd Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.**, 605-622, 1987.
- McKINNON AO, SQUIRES EL. Equine embryo transfer. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, 4:305-333, 1988b.
- McKINNON AO, SQUIRES EL. Morphologic assessment of the equine embryo. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 192:401-406, 1988a.
- MEINTJES M, BELLOWS MS, PAUL JB. Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval in cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. **Biol. Reprod.**, (Mono. 1):281, 1995.
- MEIRA C. **Avaliação de duas técnicas de transferência não cirúrgica de embriões em éguas**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 56p., 1990.
- MILLAN APR. **Avaliação "in vitro" da Técnica Ultra-sonográfica de Injeção Intra-uterina via Transvaginal para Transferência de Embriões em Eqüídeos**. Tese de Mestrado. Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 49p., 2001.
- MOUSSA M, DUCHAMP G, MAHLA R, BRUYAS J-F, DAELS PF. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and EmCare holding solutions. **Theriogenology**, 58:755-757, 2002.
- MULLER Z, CUNAT L. Special surgical transfers of horse embryos. Embryo Transfer III. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15): 113-115, 1993.
-

- NEELY DP, HUGHES JP, STABENFELDT GH, EVANS JW. The influence of intrauterine saline infusion on luteal function and cyclical activity in the mare. **J. Reprod. Fertil.**, (Suppl. 23):235-239, 1975.
- NIKOLAKOPOULOS E, KINDAHL H, GILBERT CL, GOODE J, WATSON ED. Release of oxytocin and prostaglandin F_{2α} around teasing, natural service and associated events in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, 63:89-99, 2000.
- OGURI N, TSUTSUMI Y. Non-surgical egg transfer in mares. **J. Reprod. Fertil.**, 41: 313-320, 1974.
- OGURI N, TSUTSUMI Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. **J. Reprod. Fertil.**, 31: 187-195, 1972.
- ORIOLO JG, SHAROM FJ, BETTERIDGE KJ. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **J. Reprod. Fertil.**, 99:653-664, 1993.
- OVERSTRÖM EW. In vitro assessment of embryo viability. **Theriogenology**, 45:3-16, 1996.
- PALMER E, DRIANCOURT MA. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, 13:203-216, 1980.
- PALMER E, DUCHAMP G, LAGNEAUX D. A new technique for equine embryo transfer by colpotomy and blind puncture of the uterine horn. **The Third International Symposium on Equine Embryo Transfer**. Buenos Aires, Argentina. 43, 1992.
- PALMER E, HAJMELI G, DUCHAMP G. Gonadotrophin treatments increase ovulation rate but not embryo production from mares. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15):99-102, 1993.
- PALMER E. Induction of ovulation. In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Ed.) **Equine Reproduction**. 1993. p. 344-347.
- PASCOE DR, LIU IKM, SPENSLEY MS, HUGHES JP. Effect of endometrial pathology on the success of non-surgical embryo transfer. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 3):108-110, 1985.
- PASCOE DR, STABENFELDT GH, HUGHES JP, KINDAHL H. Endogenous prostaglandin F_{2α} release induced by physiologic saline solution infusion in uterus in the mare: effect of temperature, osmolarity, and pH. **Am. J. Vet. Res.**, 50:1080-1083, 1989.
- PEYROT LM, LITTLE TV, LOWE JE, WEBER JA, WOODS GL. Autotransfer of day 4 embryos from oviduct to oviduct versus oviduct to uterus in the mare. **Theriogenology**, 28:699-708, 1987.
-

- PHARRISS BB, WYNGARDEN LJ. The effect of prostaglandin F_{2a} on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.**, 130:92-94, 1969.
- PIETERSE MC, VOS P, KRUIP TAM. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, 35:857-861, 1991.
- PISCOPO SE. Advancements in equine embryo production. **Equine Practice**, 22:6 16-20, 2000.
- RIERA FL, MCDONOUGH J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 15): 116-119, 1993.
- RIERA FL. Equine Embryo Transfer. In: Samper, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Pennsylvania: Saunders Company, p. 229-246, 2000.
- ROBINSON SJ, NEAL H, ALLEN WR. Modulation of oviductal transport in the mare by local application of prostaglandin E₂. **Proc. 7th Int. Symp. Equine Reprod.**, Pretoria, South Africa, 153-154, 1998.
- SEIDEL GE Jr. Cryopreservation of equine embryos. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, 12:85-99, 1996.
- SHARP DC, THATCHER MJ, SALUTE ME, FUCHS AR. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F_{2a} release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **J. Reprod. Fertil.**, 109:137-144, 1997.
- SHARP DC. The early fetal life of the equine conceptus. **Anim. Reprod. Sci.**, 60-61:679-689, 2000.
- SIROIS J, BETTERIDGE KJ, GOFF AK. PGF-2 α release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. **J. Reprod. Fertil.**, (Suppl. 35): 419-427, 1987.
- SKIDMORE J, BOYLE MS, CRAN D, ALLEN WR. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 8): 126-128, 1989.
- SLADE NP, TAKEDA T, SQUIRES EL, ELSDEN RP, SEIDEL GE Jr. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, 24:45-58, 1985.
- SQUIRES EL, CARNEVALE EM, McCUE PM, BRUEMMER JE. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, 59:151-170, 2003.
- SQUIRES EL, COOK VM, VOSS JL. **Collection and Transfer of Equine Embryos**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Colorado State University, Colorado, 37 p, 1985a.
-

- SQUIRES EL, GARCIA RH, GINTHER OJ. Factors affecting success of equine embryo transfer. **Equine Vet. J.**, (Suppl. 3): 92-95, 1985b.
- SQUIRES EL, IMEL KJ, IULIANO MF, SHIDELER RK. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. **J. Reprod. Fertil.**, (Suppl. 32): 409-414, 1982a.
- SQUIRES EL, IULIANO MF, SHIDELER RK. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, 17:35-41, 1982b.
- SQUIRES EL, McCUE PM, VANDERWALL D.K. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, 51 (1): 91-104, 1999.
- SQUIRES EL, McKINNON AO, SHIDELER RK. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, 29: 55-70, 1988.
- SQUIRES EL, SEIDEL GE Jr. **Collection and transfer of equine embryos.** Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin No. 11. Fort Collins, Colorado State University, 32 p, 1995.
- SQUIRES EL, VOSS JL, SHIDELER RK. Equine embryo transfer update. **Proc. 13th Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.**, 357-363, 1984.
- STRINGFELLOW DA. **Recomendações para o Manuseio Sanitário de Embriões Obtidos *In Vivo*.** In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M. (Ed. Português) Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3^a ed., 1998. p.83-88.
- SUGIE T. Successful transfer of a fertilized bovine egg by nonsurgical techniques. **J. Reprod. Fertil.**, 10: 197-201, 1965.
- VANDERWALL DK. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, 12 (1):61-84, 1996.
- VARNER DD. Collection and preservation of stallion spermatozoa. **Proc. Soc. Theriogenology**, 13-33, 1986.
- VENDRAMINI OM. **Contribution a la sauvegarde du baudet du poitou par la mise au point d'une technique de transfert d'embryon.** DS-Thesis. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France, 218 p, 1997.
- VOGELSANG SG, BONDIOLI KR, MASSEY JM. Commercial application of equine embryo transfer. **Equine Vet. J.**, 3: 89-91, 1985.
- VOGELSANG SG, SORENSEN AM, POTTER GD, BURNS SJ, KRAEMER DC. Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos. **J. Reprod. Fertil.**, (Suppl. 27): 383-386, 1979.
-

- WEBER JA, FREEMAN DA, VANDERWALL DK, WOODS GL. Prostaglandin E₂ hastens oviductal transport of equine embryos. **Biol. Reprod.**, 45:544-546, 1991a.
- WEBER JA, FREEMAN DA, VANDERWALL DK, WOODS GL. Prostaglandin E₂ secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biol. Reprod.**, 45:540-543, 1991b.
- WHITTINGHAN DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, 233:125-132, 1971.
- WÜSTENHAGEN A, HANDLER J, KINDAHL H, AURICH C. Luteal function and estrous cycle characteristics in mares treated with subtherapeutic doses of prostaglandin F2a. **Theriogenology**, 58:537-539, 2002.
-

8. Apêndice

8.1. Parâmetros Ultra-sonográficos

Tabela 15. Observações ultra-sonográficas individuais dos parâmetros de eficiência da IIU, pontos calculados, nota atribuída imediatamente pós-IIU e resultado (observação de fluido no lúmen uterino).

n	Égua	Agulha	Tubo	Mov. Tubo	Ejeção	Pontos	Nota	Fluido Lúmen	Resultado
1	64	+	+	+	+/-	3,5	4	+	+
2	58	+	+	+	+/-	3,5	3,5	+	+
3	64	+	+	+	-	3	3	+	+
4	56	+	+	+	+	4	4	+	+
5	46	+	+	+	+	4	3,25	+	+
6	59	+	+	+	+	4	4	+	+
7	43	+	+	+	+	4	4	+	+
8	57	+	+	+	+	4	4	+	+
9	68	+	+	+	+	4	3,5	+	+
10	59	+	+	+	+	4	4	+	+
11	58	+	+	+	+/-	3,5	3,5	+	+
12	39	+	+	+	+	4	4	+	+
13	46	+	+/-	+	+	3,5	3,5	+	+
14	54	+	+	+	+	4	4	+	+
15	61	+	+	+	+	4	4	+	+
16	58	+	+	+	+	4	4	+	+
17	43	+	+	+/-	+/-	3	3,5	+	+
18	51	+	+	+	+/-	3,5	4	+	+
19	68	+	+	+	+	4	4	+	+
20	61	+	+	+	+	4	4	+	+
21	35	+	+/-	+	+/-	3	3	-	-
22	39	+	+	+	+	4	4	+	+
23	35	+	+	+	+/-	3,5	4	+	+
24	57	+	+	+	+/-	3,5	3,75	+	+
25	35	+	+	+	+	4	4	+	+
26	64	+	+	+	+	4	4	+	+
27	51	+	+	+	+	4	4	+	+
28	56	+	+	+	+	4	4	+	+
29	61	+	+	+	+	4	4	+	+
30	39	+	+	+	+	4	4	+	+
31	68	+	+	+	+	4	4	+	+
32	46	+	-	+	+	3	4	+/-	+
33	67	+	+/-	+/-	+/-	2,5	3,5	+/-	+

8.2. Recuperação embrionária

Tabela 16. Taxas de recuperação embrionária nas estações 2001/2002 e 2002/2003.

Estação*	Com recuperação % (n)	Sem recuperação % (n)	Total
2001/2002	78,4 (76)	21,6 (21)	97
2002/2003	63,0 (46)	37,0 (27)	73
Geral	71,8 (122)	28,2 (48)	170

*P<0,05 (Qui-quadrado)

Acredita-se que uma possível causa para as taxas de recuperação terem sido diferentes entre as estações estudadas possa ter sido algumas mudanças no manejo das éguas, como a retirada destas de um regime de pastejo livre para um sistema semi-confinado em piquete com pouco sombreamento e com praticamente toda a alimentação fornecida em cochos (estação 2002/2003). Outro possível fator que afetou as taxas de recuperação entre as estações pode ter sido relacionado ao sêmen do garanhão. Durante o experimento na estação 2002/2003, depois de uma série de lavados uterinos sem recuperação embrionária, realizou-se novamente avaliação andrológica do garanhão e detectou-se baixa resistência do sêmen *in vitro*. O sêmen *in natura* e também diluído em meio Kenney perdiam consideravelmente a qualidade (motilidade e vigor) em reduzidos intervalos de tempo entre coleta, manipulação e inseminação. Sendo assim, tentou-se contornar esse problema minimizando ao máximo esse intervalo de tempo.

Tabela 17. Tempo médio gasto no procedimento de recuperação embrionária nas estações 2001/2002 e 2002/2003.

Estação	Tempo médio ± EPM (min.)	n
2001/2002	20,7 ^a ± 0,7	89
2002/2003	14,9 ^b ± 0,3	63
Total	18,4	151

^{a,b}P<0,001 (ANOVA e Teste t-Student)

Tabela 18. Volume de déficit e percentual de fluido nos lavados de recuperação embrionária.

Estação	n	Média de Déficit	% Recuperação
2001-2002	77	83,7 ^a mL	97,2
2002-2003	67	31,3 ^b mL	98,9
Geral	144	59,3 mL	98,0

Volume infundido por animal = 3.000 mL

^{a,b}P<0,001 (ANOVA e Teste t-Student)

8.3. Qualidade embrionária

Na estação 2001/2003, 82,9% (63/76) dos embriões coletados tiveram Grau 1 ou 2 e na estação 2002/2003, 84,8% (39/46; Tab. 19). Não foi encontrada diferença (P>0,05) na qualidade dos embriões recuperados entre as estações estudadas. Esse resultado demonstra que a proporção de embriões recuperados de qualidade excelente (grau 1) e bom (grau 2) em relação às outras classificações se manteve constante nas duas estações.

Na Tabela 19 verifica-se a distribuição dos embriões transferidos, classificados pelo grau de qualidade nas duas estações estudadas. O grau de desenvolvimento dos embriões variou de blastocisto jovem a blastocisto expandido.

Tabela 19. Número de embriões transferidos no Dia 7, subdivididos por classificação, técnicas de TE e estações reprodutivas.

Estação e Técnica	Classificação	n		Total		
		+	-			
2001 / 2002	IIU	blastocisto jovem	grau 1	8	2	23
		blastocisto jovem	grau 2	3	1	
	blastocisto expandido	grau 1	7	1		
		grau 2	0	1		
	TC	blastocisto jovem	grau 1	6	1	23
			blastocisto jovem	grau 2	6	
		blastocisto expandido	grau 1	6	1	
			blastocisto expandido	grau 2	1	
2002 / 2003	IIU	blastocisto jovem	grau 1	2	1	16
		blastocisto jovem	grau 2	0	0	
	blastocisto expandido	grau 1	10	0		
		blastocisto expandido	grau 2	0	3	
	TC	blastocisto jovem	grau 1	4	2	15
			blastocisto jovem	grau 2	3	
		blastocisto expandido	grau 1	3	2	
			blastocisto expandido	grau 2	1	
Geral	IIU	blastocisto jovem	grau 1	10	3	39
		blastocisto jovem	grau 2	3	1	
	blastocisto expandido	grau 1	17	1		
		blastocisto expandido	grau 2	0	4	
	TC	blastocisto jovem	grau 1	10	3	38
			blastocisto jovem	grau 2	9	
		blastocisto expandido	grau 1	9	3	
			blastocisto expandido	grau 2	2	
				77		