

Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga

Factors affecting the embryo recovery and pregnancy rates after transcervical transfer in equines of the Mangalarga breed

João Junqueira FLEURY¹; Abílio Junqueira PINTO²; Alexandre MARQUES³; César Gonçalves LIMA⁴; Rubens Paes de ARRUDA³

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Rubens Paes de Arruda
Departamento de Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP
Av. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando de
Salles Oliveira
05508-000 – São Paulo – SP
e-mail: arrudarp@usp.br

1- Faculdade de Medicina Veterinária
"Octávio Bastos" – São João da
Boa Vista
2- Secretaria da Agricultura do Estado
de São Paulo – CÂTI
3- Departamento de Reprodução
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da USP – SP
4- Departamento de Ciências Básicas
da FZEA – USP – SP

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar em animais da raça Mangalarga os efeitos das frações da lavagem uterina, do dia da colheita (D7 ou D8), do tamanho do embrião, da idade do corpo lúteo da receptora e da transferência de embriões pela técnica transcervical sobre os índices de recuperação de embriões e de prenhez. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos índices de embriões recuperados sobre os totais de colheitas (154) quanto às frações (F)1 (27,3%), (F)2 (15,6%) e (F)3 (18,2%), mas não quanto às taxas de prenhez ((F)1 76,2%; (F)2 83,3% e (F)3 78,6%). Quanto ao dia da colheita D₇ ou D₈, houve tendência à significância ($p = 0,051$) nos índices de embriões recuperados (37,5 e 62,8%), mas não houve diferença nos índices de prenhez (66,7 e 78,3%); entretanto, a diferença foi significativa ($p < 0,05$) para o tamanho dos embriões coletados no D₇ (0,230 mm \pm 0,035 mm) e D₈ (0,896 mm \pm 0,063 mm). A idade do corpo lúteo das receptoras (dias 5, 6, 7 e 8 após a ovulação) não alterou significativamente os índices de prenhez (71,4%, 88,9%, 65,4% e 88,6%), respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos índices de embriões recuperados (50,9 e 59,5%), bem como nos de prenhez (72,2 and 77,7%), para os anos hípicos 95/96 e 96/97, quando os embriões foram inovulados pela técnica transcervical.

UNITERMOS: Embrião; Eqüinos; Corpo lúteo; Cavalos mangalarga; Prenhez.

INTRODUÇÃO

Fatores ligados à técnica de colheita, idade (dia da colheita) e tamanho do embrião, idade do corpo lúteo da receptora, bem como o método de transferência, interferem nos índices de recuperação embrionária e de prenhez. Imel et al.⁶ encontraram 52% de embriões na primeira fração, 34% na segunda e 14% na terceira. Vogelsang et al.²⁰, após 106 colheitas de embriões realizadas nos dias 5, 6, 7 e 8 após a ovulação (dia 0), obtiveram recuperação embrionária de 55, 51, 33 e 50%, respectivamente, indicando efeito não-significativo do dia da colheita sobre as taxas de recuperação dos embriões. Iuliano; Squires⁷ realizaram experimento para avaliar os efeitos da idade do embrião (D₇ e D₈) e a técnica de transferência (cirúrgica e não-cirúrgica) sobre as taxas de prenhez aos 25 dias após a inovulação. No D₇ obtiveram 73,9% (17/23) de prenhez pela técnica cirúrgica e 52,6% (10/16) pela não-cirúrgica; no D₈ obtiveram 75,0% (15/20) e 45,0% (9/20), respectivamente. A transferência cirúrgica tanto no D₇ como no D₈ resultaram altas taxas de prenhez ($p < 0,05$) em comparação com a não-cirúrgica, mas ambas não apresentaram diferenças entre os embriões colhidos no D₇ e D₈. O diâmetro médio do embrião, registrado por Iuliano et al.⁸ nos dias 7 e 8 após a ovulação da doadora, foi de 0,488 \pm 0,003 e 1,368 \pm 0,015 mm, com variação de 0,136 a 1,284 mm no dia 7 e 0,369 a 3,980 mm no dia 8. Poucas gestações foram obtidas ($p < 0,05$) quando os embriões

apresentaram diâmetros menores que 0,467 e maiores que 1,150 mm, após transferência transcervical. Meira et al.¹² não observaram influência significativa da idade do embrião sobre o índice de gestação ($p > 0,05$), embora o percentual de prenhez para os embriões D₈, 39,9% (9/23) tenha sido bem menor que o dos embriões D₇, 70,8% (7/10). O grau de sincronia entre receptora e doadora, traduzido pela idade do corpo lúteo da receptora, aparentemente não é tão crítico⁶. Embriões transferidos durante os anos de 1982 e 1984 a receptoras que apresentavam corpo lúteo entre 5 e 10 dias demonstraram taxas de gestações similares ($p > 0,05$)¹⁰. Por outro lado, com base nos resultados descritos por Alvarenga¹ relativos aos índices de gestação para receptoras em diferentes dias do ciclo estral (idade do corpo lúteo), observa-se tendência de melhora nos índices de gestação quando o dia do ciclo da receptora decresce [(D₆, 86,2% (25/29) e D₉, 68,8% (16/11)], apesar de as diferenças não serem significativas. A taxa de gestação após a transferência de embriões pela técnica não-cirúrgica (via transcervical) apresenta resultados ruins (0%), como os de Oguri e Tsutsumi^{13,14}, e bons (77%), como os de Wilson et al.²¹. A vantagem da transferência não-cirúrgica é que pode ser realizada a campo e com baixo custo. Oguri e Tsutsumi^{13,14} foram os primeiros autores que reportaram a transferência de embriões em eqüinos pela técnica não-cirúrgica. Onze embriões com idades entre 5 e 7 dias foram transferidos para as receptoras que ovularam no mesmo dia da doadora, mas não resultaram em prenhez. Estes pesqui-

sadores publicaram em 1974 o primeiro sucesso de prenhez após a transferência de 15 embriões equínos, que resultaram em 6 gestações (40%), das quais 4 chegaram a termo (26,7%). Castleberry et al.³ obtiveram 60% e 12,5% de gestações após as transferências cirúrgica e não-cirúrgica, respectivamente. Imel et al.⁶ conseguiram 39 embriões em 47 colheitas (83%) no ano de 1979 e 75 em 104 colheitas (72%) no ano de 1980. Oito de 15 transferências cirúrgicas (53%) e 4 de 15 não-cirúrgicas (27%) resultaram em prenhez. Sirois et al.¹⁷ observaram a viabilidade do uso da transferência de embriões em equínos, pelo método transcervical, realizada em um centro hípico. Após 25 colheitas, recuperaram 16 (64%) blastocistos, dos quais 13 foram transferidos e resultaram em oito gestações (61,5%). Fleury et al.⁵ publicaram os resultados de um programa comercial de transferência de embriões envolvendo animais de raça Mangalarga; em 90 transferências pela técnica cirúrgica, 71 (78,9%) fêmeas tornaram-se gestantes. Farinasso e Guimarães⁴, trabalhando com animais das raças Quarto de Milha e Paint Horse, transferiram 32 embriões pela técnica transcervical com o auxílio do inovulador modelo Hannover, obtendo 68,7% (22/32) de taxa de prenhez aos 20 dias e 59,4% (19/32) aos 50 dias. Pashen et al.¹⁵ obtiveram, pela técnica não-cirúrgica, 61% de gestações (353/580). Considerando a necessidade crescente de pesquisas na área de transferência de embriões em equínos, foram objetivos deste experimento: a) estudar os efeitos da fração da lavagem uterina, do dia da colheita (D₇ ou D₈) e tamanho dos embriões sobre as taxas de recuperação e os índices de prenhez, após transferência de embriões; b) avaliar o efeito da idade do corpo lúteo das receptoras sobre os índices de prenhez; c) avaliar o percentual total de gestação obtidos pela técnica transcervical, durante dois anos hípicos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 77 doadoras da raça Mangalarga de 13 a 18 anos de idade e 107 receptoras sem raça definida de 3 a 10 anos de idade, cujo percentual de reutilização no segundo ano de trabalho foi de 57%. Todas as éguas apresentaram útero e ovários normais pela avaliação ultra-sonográfica transretal. Como doadores de sêmen foram utilizados 23 garanhões da raça Mangalarga, com idades entre 5 e 10 anos, que estavam servindo normalmente em regime de monta natural ou colheita de sêmen para inseminação artificial. O período de colheitas e transferências (inovulações) dos embriões foi de setembro de 1995 a março de 1996 e de setembro de 1996 a março de 1997. A monta ou inseminação artificial foram realizadas a cada 36 horas, a partir da detecção de um folículo de 35 mm de diâmetro até a ovulação. A inseminação artificial foi realizada com sêmen fresco ou resfriado diluído em extensor à base de leite desnatado⁹. O volume e a concentração da dose inseminante foi de 20 ml e 500 milhões de espermatozoides viáveis, respectivamente. A refrigeração do sêmen foi realizada acondicionando-o em um container que permitiu curva de resfriamento de 0,3°C por minuto até +5°C, assim permanecendo por no máximo 36 horas até sua utilização. Para a colheita dos embriões, foi utilizado o método não-cirúrgico, após adaptação do método descrito por Squires et al.¹⁸. As colheitas foram realizadas no 7º e 8º dias após a ovulação com cateteres possuindo balão de capacidade para 75 ml, cujo comprimento foi ampliado para 40 cm com mangueira plásti-

ca siliconizada. Após introduzir o cateter pela cérvix (via manovaginal) e alojá-lo no corpo uterino, o balão foi inflado com 50 ml de ar e tracionado para ser mantido em íntimo contato com a porção uterina da cérvix. Após a fixação do cateter no corpo uterino, 700 ml de Ringer com lactato², aquecido a 37°C, foram infundidos por gravidade e recolhidos por sinfonagem em proveta graduada (fração 1 da colheita), repetindo-se a operação por mais uma ou duas vezes consecutivas, quando necessário, com volume de 500 ml para cada infusão (fração 2 e fração 3 da colheita). Todo o líquido drenado do útero passou através de um filtro (75 µm) para reter o embrião, tomando-se cuidado para que permanecessem no filtro aproximadamente 30 ml de meio. A cada fração da colheita realizada, o líquido contido no filtro era colocado em placas de Petri siliconizadas, procurando-se os embriões em estereomicroscópio com aumento de 10 vezes. Uma vez identificados, a colheita era interrompida e os embriões eram classificados quanto à morfologia segundo McKinnon e Squires¹¹, com aumento de 40 vezes, e lavados através de 10 passagens consecutivas em solução salina tamponada de Dubecco (PBS) enriquecido com 15% de soro fetal bovino (SFB), esterilizado em membrana de 0,22 µm. Em seguida, os embriões foram acondicionados em pipetas para inseminação artificial de 50 cm de comprimento, respeitando-se a seguinte seqüência: coluna de meio (PBS + 15% de SFB) + coluna de ar + coluna de meio contendo o embrião + coluna de ar + coluna de meio. A pipeta foi revestida externamente por uma fina membrana plástica ("camisa sanitária" modelo francês), segundo Squires et al.¹⁹ e as transferências foram executadas pela via transcervical. Foram inovuladas as receptoras que ovulavam dois dias antes (assincronia + 2); um dia antes (assincronia + 1); no mesmo dia (sincrônicas) e até dois dias após (assincronia - 1 e - 2) a doadora. O diagnóstico de gestação foi realizado através da técnica de ultrasonografia aos 13, 17 e 30 dias após a ovulação da receptora. Os resultados foram apresentados em tabelas de frequência, com número e proporção de dados em cada grupo experimental. As comparações entre proporções de positividade foram efetuadas utilizando-se o teste de χ^2 (Qui-quadrado), contido no programa MINITAB^{®16}. Os dados significativos após a utilização do teste de Qui-quadrado foram novamente submetidos a análise de variância (ANOVA), e as comparações entre as médias obtidas foram realizadas pelo teste Tukey. A hipótese testada foi significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na Tab. 1 são apresentadas as proporções de recuperação dos embriões e os índices de prenhez nas frações de colheita. Os resultados mostram diferenças significativas na taxa de recuperação de embriões entre as frações da colheita, e que maior número de embriões é recuperado na primeira fração da lavagem. Não houve diferença significativa nos índices de prenhez com embriões coletados entre as três frações da colheita.

A Tab. 2 mostra o número de embriões recuperados, seu tamanho e os índices de prenhez em relação às colheitas feitas no 7º e 8º dias após a ovulação. Não foi verificada diferença significativa quanto à percentagem de embriões recuperados ($p = 0,051$). O tamanho dos embriões foi maior em D₈ e não houve diferença significativa nos índices de prenhez.

Tabela 1

Proporção de embriões recuperados e índices de prenhez, segundo a fração da colheita (Ano hípico 96/97). Pirassununga – SP.

Fração de colheita	Embriões recuperados			Prenhez	
	Total (A)	% em relação a		Total	% em relação a (A)
		n° de colheitas (n=154)	Total (n=94)		
1	42 ^a	27,3 ^a	44,7 ^a	32	76,2 ^a
2	24 ^b	15,6 ^b	25,5 ^b	20	83,3 ^a
3	28 ^{ab}	18,2 ^{ab}	29,8 ^{ab}	22	78,6 ^a
Total	94	61,1	100,0	74	78,7

^{a,b} Valores acompanhados por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p < 0,05).

Tabela 2

Embriões transferidos, tamanho dos embriões e índices de prenhez em colheitas feitas no 7º (D₇) e 8º (D₈) dias após ovulação (Ano hípico 96/97). Pirassununga – SP.

Colheitas		Embriões transferidos		Tamanho do embrião	Prenhez	
dia	n	Total (A)	%	Média ± EP	Total	% em relação a
D7	016	06	37,5	0,230 ^a ± 0,035	04	66,7
D8	132	83	62,8	0,896 ^b ± 0,063	65	78,3
Total	148	89	60,1	0,858 ± 0,092	69	72,5

^{a,b} Valores acompanhados por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p < 0,05).

Tabela 3

Embriões transferidos e índices de prenhez em éguas receptoras com diferentes idades do corpo lúteo (D₀ = dia da ovulação), (Ano hípico 96/97). Pirassununga – SP.

Idade do corpo lúteo (dias)	Embriões transferidos		Prenhez	
	n	%	n	%
D5	07		05	71,4
D6	18		16	88,9
D7	26		17	65,4
D8	26		22	88,6
Total	77		60	77,9

Tabela 4

Número de colheitas, embriões recuperados e índices de prenhez em receptoras equinas inovuladas pela técnica não-cirúrgica, durante dois anos hípicos (95/96 e 96/97). Pirassununga – SP.

Ano hípico	Colheitas	Embriões recuperados		Prenhez	
	n	Total (A)	%	Total	% em relação a (A)
95/96	212	108	50,9	78	72,2
96/97	158	94	59,5	73	77,7
Total	370	202	54,6	151	74,8

A idade do corpo lúteo das receptoras não exerce influência sobre os índices de gestação (Tab. 3).

O número de colheitas, de embriões recuperados e os índices de prenhez verificados nos anos hípicos 95/96 e 96/97 são apresentados na Tab. 4. Não houve diferença significativa entre os dois anos hípicos.

DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas nos índices de recuperação dos embriões entre as frações da colheita, mas não nos índices de prenhez após a inovulação. Os resultados do presente experimento confirmam o dados de Imel et al.⁶, que encontraram 52% de embriões na primeira fração, 34% na segunda e 14% na terceira.

Quanto aos índices de recuperação de embriões das doadoras no D₇ ou D₈, os resultados deste experimento foram semelhantes aos obtidos por Vogelsang et al.²⁰, que realizaram colheitas nos dias 5, 6, 7 e 8 após a ovulação (D₀), e relataram taxas de recuperação de embriões de 55, 51, 33 e 50% respectivamente, indicando efeito não-significativo. Iuliano et al.⁸ obtiveram recuperação de 75,5 e 81,8% de embriões, quando as colheitas foram realizadas no D₇ ou D₈, e não tendo encontrado diferença significativa. Quanto ao tamanho do embrião, em relação ao dia da colheita (D₇ e D₈), os resultados são semelhantes aos apresentados por Iuliano et al.⁸, que encontraram diâmetros médios de 0,488 mm no D₇ e 1,368 mm no D₈. As taxas de prenhez não foram influenciadas pelo dia da colheita dos embriões no presente experimento, o que também foi relatado por Meira et al.¹², que, apesar de um percentual de prenhez de 39,9% (9/23) no D₈ e 70,8% (7/10) no D₇, não encontraram diferenças significativas nos índices de gestação. Iuliano e Squires⁷, ao avaliarem o efeito da idade do embrião (D₇ ou D₈) e da técnica de transferência (cirúrgica e não-cirúrgica) sobre as taxas de prenhez, tiveram índices mais altos pela técnica cirúrgica, contudo não houve diferença significativa nas duas técnicas utilizadas com relação ao dia da colheita (D₇ ou D₈). Vários autores recomendam colheitas de embriões das doadoras no D₇ ou D₈, porque antes do D₇ os embriões apresentam-se com diâmetro pequeno, aumentando a possibilidade de perda e de não serem recolhidos pelas lavagens. Igualmente aumenta a possibilidade de sofrerem lesões causadas pela ação mecânica das lavagens devido ao tamanho grande que apresentam após o D₈.

Resultados semelhantes aos do presente experimento foram obtidos por McKinnon e Squires¹¹, que transferiram embriões em receptoras cujos corpos lúteos encontravam-se entre os dias 5 e 10 após a ovulação, não encontrando diferenças significativas (p > 0,05) nas taxas de prenhez. Por outro lado, Alvarenga¹ menciona tendência de melhora, embora não-significativa, nos índices de prenhez quando a idade do corpo lúteo decresce, ou seja, aproxima-se do dia da ovulação. O autor sugere que as éguas no D₆ são melhores candidatas a receptoras, pelo fato de que, neste período, o corpo lúteo é refratário a uma possível liberação de prostaglandina F_{2α}, conseqüente de manipulação uterina realizada no momento da inovulação.

Ao contrário do obtido nesse experimento, Oguri e Tsutsumi^{13,14}, que não tiveram sucesso na transferência não-cirúrgica

gica de onze embriões com idades entre 5 e 7 dias para receptoras que ovularam no mesmo dia das doadoras. Porém, conseguiram o primeiro sucesso de prenhez com a transferência não-cirúrgica (40%). Oguri e Tsutsumi^{13,14}; Castleberry et al.³; Imel et al.⁶ e Sirois et al.¹⁷ relataram índices de prenhez inferiores aos obtidos no presente experimento, 12,9%, 27,0%, 61,5%, respectivamente. Resultados próximos do presente trabalho foram citados por Pashen et al.¹⁵ (1993), que obtiveram 61,0% (353/580), por Farinasso e Guimarães⁴, que conseguiram 68,7%, e por Wilson et al.²¹, que lograram 77,0% de gestação, após utilização da técnica transcervical.

CONCLUSÕES

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos índices de recuperação de embriões entre as três frações da colheita, sendo

que quase 50% dos embriões foram recuperados na primeira fração. Porém, não houve diferença ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez após inovulações de embriões oriundos das três frações. As colheitas de embriões realizadas no D₈ apresentaram tendência ($p = 0,051$) de melhores resultados nas taxas de recuperação embrionária, quando comparados com os colhidos no D₇. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no tamanho dos embriões colhidos no D₇ e no D₈, porém as taxas de prenhez não foram diferentes ($p > 0,05$). O sincronismo entre doadora e receptora parece não ser fator limitante, pois não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos índices de prenhez entre receptoras cujos corpos lúteos encontravam-se entre cinco e oito dias após a ovulação. Os bons resultados obtidos pela técnica transcervical em equínos da raça Mangalarga (74,9% de prenhez) recomendam esse método nos programas de colheita e transferência de embriões, por ser realizada a campo com baixo custo.

SUMMARY

This study had the objective of evaluating the effect of uterine flushing part, flushing day (D₇ or D₈), embryo size, age of recipients corpus luteus and transcervical technique on embryos recovery and in the pregnancy rates. There were differences ($p < 0.05$) in embryos recovery rates on overall flushing (154) in relation to the flushing part (F.P.) 1 (27.3%), 2 (15.6%) and 3 (18.2%), but not statistical differences ($p > 0.05$) for the pregnancy rates (F.P.1, 76.2%; F.P.2, 83.3% and F.P.3, 78.6%). There was statistically tendency ($p = 0.051$) in the number of recovered embryos (37.5 and 62.8%) in the D₇ or D₈, respectively. However, there was no difference ($p > 0.05$) in the pregnancy rates (66.7 and 78.3%), when the embryos were recovered in the D₇ or D₈. It could be observed statistically differences ($p < 0.05$) in the embryos size, which were collected at D₇ (0.230 mm \pm 0.035 mm) and D₈ (0.896 mm \pm 0.063 mm). It's appropriate to emphasize that the pregnancy rates did not suffer any influence. Considering the age of the recipient corpus luteus at 5, 6, 7 and 8 days after the ovulation, there were no differences in pregnancy rates 71.4, 88.9, 65.4 and 88.6%, respectively, during the breeding season 96/97. There were not found relevant differences ($p > 0.05$) in the recovered embryos (50.9 and 59.5%) and pregnancy rates (77.2 and 77.7%), during the breeding season of 95/96 and 96/97, with inovulated embryos by the transcervical technique.

UNITERMS: Embryo; Equine; Corpus luteum; Mangalarga; Pregnancy.

REFERÊNCIAS

- 1- ALVARENGA, M. A. **Efeito de alguns fatores sobre índices de coleta e transferência de embriões em equínos**. 1989. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu.
- 2- ALVARENGA, M. A.; ALVARENGA, F. C. L.; MEIRA, C. Modifications in the technique used to recover equine embryos. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 3., 1993. Buenos Aires. **Proceedings...** p. 111-112.
- 3- CASTLEBERRY, R. S.; SCHEIDER Jr., H. J.; GRIFFIN, J. L. Recovery and transfer of equine embryo. **Theriogenology**, v. 13, n. 1, p. 90, 1980.
- 4- FARINASSO, A.; GUIMARÃES, E. M. Programa de transferência de embriões eqüinos por via transcervical. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7., 1992. Jaboticabal. **Anais...** p. 90.
- 5- FLEURY, J. J.; COSTA NETO, J. B. F.; ALVARENGA, M. A. Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2., 1989. Banft, Alberta. **Proceedings...** p. 73-74.
- 6- IMEL, K. J.; SQUIRES, E. L.; ELDEN, R. P.; SHIDELER, R. K. Collection and transfer of equine embryos. **Journal of Animal Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 10, p. 987-991, 1981.
- 7- IULIANO, M. F.; SQUIRES, E. L. Pregnancy rates after transfer of 7 or 8 day - old equine embryos either surgically or non-surgically. **Theriogenology**, v. 10, n. 1, p. 134, 1983.
- 8- IULIANO, M. F.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 1, p. 258-263, 1985.
- 9- KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, p. 327-336, 1975.
- 10- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 4, n. 2, p. 305-333, 1988a.
- 11- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of equine embryo - a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 3, p. 4016, 1988b.
- 12- MEIRA, C.; ALVARENGA, M. A.; HENRY, M.; FERREIRA, J. C. P. Transferência não-cirúrgica de embriões eqüinos: estudo retrospectivo. **ARS VETERINÁRIA**, v. 3, n. 2, p. 169, 1993. Suplemento.
- 13- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 313-320, 1974.
- 14- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, n. 2, p. 187-195, 1972.

- 15- PASHEN, R. L.; LASCOMBES, F. A.; DARROW, M. D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Veterinary Journal**, p. 119-121, 1993. Supplement 15.
- 16- RYAN Jr., T. A.; JOINER, B. F.; RYAN, B. F. **Minitab reference manual**. Pennsylvania : Statistics Department. Pennsylvania State University, 1981.
- 17- SIROIS, J.; BETTERIDGE, K. J.; BRAULT, A. Transcervical embryo transfer in horses: An application in an equestrian teaching center. **Canadian Veterinary Journal**, v. 28, n. 12, p. 750-753, 1987.
- 18- SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; VOSS, J. L. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction Laboratory**, v. 1, p. 38, 1985.
- 19- SQUIRES, E. L.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting the success of surgical and non-surgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 35-41, 1982b.
- 20- VOGELSANG, S. G.; BANDIOLO, K. R.; MASSEY, J. R. Commercial application of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 89-91, 1985. Supplement 27.
- 21- WILSON, J. M.; ROWLEY, W. K.; SMITH, H. A. Successful non-surgical transfer of equine embryos to post-partum lactating mares. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 295, 1987.

Recebido para publicação: 15/06/1998
Aprovado para publicação: 02/07/2001