



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

FATORES QUE INFLUENCIAM O SUCESSO DE UM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA  
DE EMBRIÕES EQUINOS

ANA LÚCIA CARVALHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Vogais

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor João Nestor Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor Orpheu de Souza Ávila Jr.

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2012

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

FATORES QUE INFLUENCIAM O SUCESSO DE UM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA  
DE EMBRIÕES EQUINOS

ANA LÚCIA CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Vogais

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor João Nestor Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor Orpheu de Souza Ávila Jr.

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2012

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

A todo o pessoal da Central Equina de Reprodução, que me receberam com enorme carinho e em especial ao Dr. Gelton, à Dra. Amanda e ao Dr. Carlos por toda a amizade e conhecimentos transmitidos ao longo do estágio.

Ao Dr. Orpheu de Souza Ávila Jr. por me ter recebido, permitido a realização do estágio que eu desejava e também pela cedência dos dados utilizados na realização desta dissertação.

Ao Engenheiro Bento Castelhana por toda a ajuda e pela sua tremenda disponibilidade.

Ao Dr. Bruno Miranda por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do estágio e principalmente pela sua amizade e paciência.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes pela colaboração na análise dos dados e pela enorme disponibilidade que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Graça Ferreira Dias pela orientação fornecida na realização desta dissertação, pela sua disponibilidade e grande simpatia.

Aos meus amigos e colegas de turma, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a minha formação.

Àquele grupinho de amigas que nunca deixaram de me apoiar.

A toda a minha família, mas principalmente aos meus pais por todo o apoio, carinho e confiança que têm depositado em mim.



**Título:** Fatores que influenciam o sucesso de um programa de transferência de embriões equinos

**Resumo:**

O sucesso de um programa comercial de transferência de embriões depende principalmente da interação dos fatores que afetam a recolha embrionária, a gestação e a morte embrionária após a transferência. O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação de alguns destes fatores, de forma a minimizar aqueles que possam ter uma influência negativa e permitindo também informar e aconselhar os proprietários dos animais de uma forma mais clara e correta.

O presente estudo foi realizado na Central Equina de Reprodução, no estado de São Paulo, Brasil. Foram analisados os dados relativos a 2086 recolhas e 1090 transferências, efetuadas ao longo de duas épocas reprodutivas consecutivas.

Neste trabalho, foi avaliada a influência na taxa de recolha embrionária, da época reprodutiva, do dia da recolha, do tipo de sémen (refrigerado ou congelado) utilizado na inseminação artificial e da raça da dadora. Relativamente às taxas de gestação e de morte embrionária, foi avaliada a influência da época reprodutiva, da idade do embrião, da ciclicidade (recetoras cíclicas e acíclicas) e do dia pós-ovulação em que a recetora se encontrava no dia da transferência. As variáveis foram analisadas pelo teste de Fisher ou Qui-quadrado em tabelas de contingência 2x2, sendo as diferenças consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

O tipo de sémen teve uma influência significativa na taxa de recolha embrionária. Foi possível concluir que em éguas inseminadas com sémen congelado a taxa de recolha embrionária é menor ( $p < 0,05$ ), sendo por isso preferível utilizar sémen fresco ou refrigerado.

A época reprodutiva afetou significativamente a taxa de gestação, tendo esta sido superior no ano de 2011-2012 ( $p < 0,05$ ). No entanto, em ambas as épocas reprodutivas, as taxas de gestação foram consideradas satisfatórias, sendo de 76,0% em 2010-2011 e de 81,8% em 2011-2012. Tanto a idade do embrião como a ciclicidade e o dia pós-ovulação da recetora não influenciaram as taxas de gestação nem as de morte embrionária. Estes resultados permitem concluir que é possível transferir embriões entre os 6 e os 10 dias de idade, utilizar éguas recetoras entre os 3 e os 9 dias pós-ovulação bem como éguas em anestro suplementadas com progesterona de longa ação, sem que isso afete o sucesso do programa de transferências.

**Palavras-chave:** Transferência de embriões, recolha embrionária, taxa de gestação, taxa de morte embrionária.



**Title:** Factors that influence the success of equine embryo transfer program

**Abstract:**

The success of a commercial embryo transfer program depends mainly on the interaction of factors that affect embryo recovery, pregnancy and embryonic loss after the embryo transfer. The objective of this study was to evaluate these factors, allowing us to minimize the ones that can have a negative influence, and simultaneously to correctly inform and give advice to animal owners.

Data of 2086 collections and 1090 transfers made over two consecutive breeding seasons in the Central Equina de Reprodução in the state of São Paulo, Brazil were analysed.

In this study, it was assessed the influence of reproductive season, collection day, type of semen used in artificial insemination (cooled or frozen), and donor breed in the embryo recovery rate. Regarding pregnancy and embryonic loss rates, the influence of breeding season, embryo age, cyclicity (cyclic and noncyclic recipients mares), and post ovulation day the recipient was on the transfer day, were assessed. The variables were statistically analysed according to the Fisher test or Chi Square in 2x2 contingency tables, in which the differences were held as significant if  $p < 0.05$ .

The type of semen was the only factor that had a significant influence on embryo recovery rate ( $p < 0.05$ ). Mares inseminated with frozen semen showed an embryo recovery rate lower than the rate obtained from mares inseminated with cooled semen.

The pregnancy rate was affected only by the breeding season ( $p < 0.05$ ). However, in both breeding seasons the pregnancy rates were viewed as satisfactory, being 76.0% in 2010-11 and 81.8% in 2011-2012. The embryo's age as well as the cyclicity and the recipient's post ovulation day did not influence either pregnancy or embryonic loss rates. These results demonstrate that it is feasible to transfer embryos between the 6<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days of age, to use recipient mares between the 3<sup>rd</sup> and 9<sup>th</sup> day post ovulation, as well as mares without ovarian cyclic activity treated with long acting progesterone, without endangering the success of the transfer program.

**Key words:** Embryo transfer, embryo recovery, pregnancy rates, embryonic loss rate.



## Índice

Índice de figuras .....	viii
Índice de gráficos.....	viii
Índice de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas e símbolos .....	cxi
I Introdução.....	1
II Relatório de estágio .....	3
1. Atividades realizadas .....	3
1.1 Central Equina de Reprodução .....	3
1.2 Estágio realizado sob orientação do Dr. Bruno Miranda .....	6
III Revisão bibliográfica.....	9
1. Enquadramento histórico e situação atual.....	9
2. Indicações e benefícios da transferência embrionária.....	11
3. Técnica de transferência embrionária .....	12
3.1 Seleção e manejo das éguas dadora e recetora .....	12
3.2 Sincronização do estro e indução da ovulação.....	13
3.3 Inseminação da dadora e colheita do embrião .....	14
3.4 Avaliação e manipulação do embrião .....	15
3.5 Transferência do embrião .....	17
3.6 Controlo da recetora após transferência.....	18
4. Morte embrionária.....	18
5. Programas comerciais de transferência embrionária.....	19
5.1 Fatores que afetam a recolha embrionária .....	20
5.2 Fatores que afetam as taxas de gestação e de morte embrionária após transferência .....	21
5.2.1 Éguas recetoras .....	22
5.2.2 Embrião.....	25
5.2.3 Técnica de transferência .....	26
5.3 Fatores limitantes da técnica.....	27
IV Trabalho experimental.....	31
1. Material e métodos .....	31
1.1 Animais e manejo.....	31
1.2 Análise estatística .....	35
2. Resultados e Discussão.....	37
2.1 Variáveis com eventual influência na recolha embrionária .....	37
2.1.1 Época reprodutiva .....	37
2.1.2 Dia da recolha .....	38
2.1.3 Tipo de sémen utilizado na inseminação artificial .....	40
2.1.4 Raça.....	42
2.2 Variáveis com eventual influência na taxa de gestação e de morte embrionária ...	43
2.2.1 Época reprodutiva .....	43
2.2.2 Idade do embrião no dia da transferência.....	45
2.2.3 Ciclicidade da égua recetora .....	47
2.2.4 Dia pós-ovulação da égua recetora no dia da transferência embrionária.....	48
3. Conclusão.....	51
V Bibliografia .....	53

VI Anexos .....	59
Anexo 1- Resultados dos Testes de Fisher e Qui-quadrado para fatores com eventual influência na taxa de recolha embrionária .....	59
Anexo 2- Resultados dos Testes de Fisher e Qui-quadrado para fatores com eventual influência na taxa de gestação e morte embrionária .....	60

## Índice de figuras

Figura 1: Instalações para reprodutores e paddocks da CER. ....	3
Figura 2: Contenção de éguas para monitorização e controlo folicular. ....	4
Figura 3: Inseminação artificial de uma dadora. ....	5
Figura 5: Recolha de sémen e laboratório para congelação do mesmo. ....	6
Figura 6: Recolha embrionária e material necessário para a recolha. ....	32
Figura 7: Embrião recolhido no dia 8 pós-ovulação e manipulação do mesmo. ....	33
Figura 8: Material utilizado na manipulação e transferência de embriões e embrião numa palhinha para transferência. ....	33
Figura 9: Higienização da recetora e transferência do embrião. ....	35
Figura 10: Diagnóstico de gestação aos 14 e 45 dias. ....	35

## Índice de gráficos

Gráfico 1: Taxa de recolha embrionária em função da época reprodutiva. ....	37
Gráfico 2: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha. ....	40
Gráfico 3: Taxa de recolha embrionária em função do tipo de sémen utilizado na IA. ....	41
Gráfico 4: Taxa de recolha embrionária em função da raça da égua dadora. ....	42
Gráfico 5: Taxa de morte embrionária em função da época reprodutiva. ....	43
Gráfico 6: Taxa de gestação em função da época reprodutiva. ....	44
Gráfico 7: Taxa de gestação em função da idade do embrião no dia da transferência. ....	45
Gráfico 8: Taxa de morte embrionária em função da idade do embrião no dia da transferência. ....	46
Gráfico 9: Taxa de gestação em função da ciclicidade da égua recetora. ....	47
Gráfico 10: Taxa de morte embrionária em função da ciclicidade da égua recetora. ....	48
Gráfico 11: Taxa de gestação em função do dia pós-ovulação da égua recetora no dia da TE. ....	49
Gráfico 12: Taxa de morte embrionária em função do dia pós-ovulação da égua recetora no dia da TE. ....	50

## Índice de tabelas

Tabela 1: Sistema de classificação de embriões de equinos. ....	16
Tabela 2: Variáveis analisadas com eventual influência na taxa de recolha embrionária. ....	36
Tabela 3: Variáveis analisadas com eventual influência nas taxas de gestação e de morte embrionária. ....	36
Tabela 4: Taxa de recolha embrionária em função da época reprodutiva. ....	37
Tabela 5: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha. ....	38
Tabela 6: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha para éguas inseminadas com sémen refrigerado. ....	39
Tabela 7: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha para éguas inseminadas com sémen congelado. ....	39
Tabela 8: Taxa de recolha embrionária em função do tipo de sémen utilizado na IA. ....	40
Tabela 9: Taxa de recolha embrionária em função da raça da égua dadora. ....	42
Tabela 10: Taxa de gestação e de morte embrionária em função da época reprodutiva. ....	43
Tabela 11: Taxa de gestação e de morte embrionária em função da idade do embrião no dia da transferência. ....	45
Tabela 12: Taxa de gestação e de morte embrionária em função da ciclicidade da égua recetora. ....	47
Tabela 13: Taxa de gestação e morte embrionária em função do dia pós-ovulação da égua recetora no dia da TE. ....	48



## Lista de abreviaturas e símbolos

µm- micron

AINE'S- anti-inflamatórios não-esteroides

APHA- American Paint Horse Association

APSL- Associação Portuguesa do Cavalo Puro Sangue Lusitano

AQHA- American Quarter Horse Association

BH- Brasileiro de Hipismo

CER- Central Equina de Reprodução

CL- corpo lúteo

COX-2- ciclo-oxigenase-2

CR- Crioulo

D- dia

Dr.- Doutor

E2- estrogénios

EAC- exame em acto de compra

eCG- hormona gonadotrófica coriónica equina

eFSH- hormona folículo-estimulante equina purificada

EHE- extrato hipofisário equino

EUA- Estados Unidos da América

FIV- fertilização *in vitro*

FSH- hormona folículo-estimulante

g- grama

GIFT- transferência intrafalopiana de gâmetas

GnRH- hormona gonadoliberina

h- horas

ha- hectares

hCG- hormona gonadotrófica coriónica humana

IA- inseminação artificial

ICSI- injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IETS- International Embryo Transfer Society

IV- endovenosa

ME- morte embrionária

P4- progesterona

P4LA- progesterona de longa ação

PGF2 $\alpha$ - prostaglandina F2 $\alpha$

PH- Paint-Horse

PSA- Puro Sangue Árabe

PSL- Puro Sangue Lusitano  
QM- Quarto de Milha  
SC- sémen congelado  
SR- sémen refrigerado  
TE- transferência de embriões  
TN- transferência de núcleo  
TO- transferência de oócitos  
UI- unidades internacionais

## I Introdução

Nas últimas décadas temos assistido a um enorme incremento de novas tecnologias reprodutivas na indústria do cavalo, sendo a transferência de embriões (TE) um procedimento que se tem tornado cada vez mais popular (Squires, 2005; Losinno & Alvarenga, 2006; Kumar et al., 2008). Esta técnica envolve a recolha de um embrião de uma égua dadora e transferência para uma égua recetora que levará a gestação a termo (Kumar et al., 2008).

A transferência de embriões permite obter múltiplos poldros por ano, de éguas geneticamente valiosas, de éguas subférteis, de éguas idosas que não consigam manter uma gestação ou de éguas em competição sem que necessitem de interromper a sua carreira desportiva (Arruda et al., 2001; Hurtgen, 2008).

O desenvolvimento desta técnica foi bastante lento no início, alcançando uma escala comercial apenas no início dos anos 90 na Argentina (Pashen et al., 1993; Riera & McDonough, 1993; Allen, 2005). A partir desta altura verificou-se uma crescente e acentuada aplicação da técnica, uma vez que houve um aumento das taxas de gestação após transferência e também porque em 2002 o registo de poldros nascidos após TE começou a ser aceite por alguns livros genealógicos, tendo sido retirada a restrição do registo de apenas um poldro por égua por ano (Vogelsang et al., 1979; Fleury & Alvarenga, 1999; Peres et al., 2002; Allen, 2005; McKinnon & Squires, 2007).

Dado que esta técnica se tornou numa prática corrente na indústria equina e com uma grande vertente comercial, é de extrema importância identificar os fatores que interferem na eficiência de um programa comercial de transferência de embriões.

A presente dissertação teve como objetivo identificar alguns fatores com eventual influência nas taxas de recolha embrionária, de gestação e de morte embrionária, uma vez que, o sucesso de um programa comercial de transferência de embriões depende essencialmente destes três parâmetros. Para tal, foram analisados os dados disponíveis referentes a 2086 recolhas e 1090 transferências, efetuadas ao longo de duas épocas reprodutivas consecutivas, num centro de transferência de embriões no estado de São Paulo, Brasil.



## II Relatório de estágio

### 1. Atividades realizadas

O estágio curricular foi efetuado em duas áreas diferentes. Primeiro na área de reprodução de equinos e depois na área de clínica. Teve início a 9 de Outubro de 2011 na Central Equina de Reprodução (CER) em Boituva, Brasil, tendo terminado, neste local, a 3 de Dezembro. A segunda parte do estágio teve a duração de 3 meses, tendo sido realizada em Portugal com o Dr. Bruno Miranda, no período de 9 de Janeiro a 13 de Abril de 2012.

#### 1.1 Central Equina de Reprodução

A Central Equina de Reprodução situa-se perto da cidade de Boituva, no estado de São Paulo, Brasil. É um centro que presta serviços na área de reprodução de equinos, sendo o único centro brasileiro credenciado pela União Europeia. O estágio decorreu no período de 9 de Outubro a 3 de Dezembro de 2011, sob a orientação do Dr. Orpheu De Souza Ávila Jr..

O centro tem uma área aproximada de 50ha onde se encontram os alojamentos para os trabalhadores e estagiários, o laboratório de reprodução, as instalações para as éguas dadoras e para os garanhões (cerca de 35 boxes fechadas), 5 troncos cobertos para palpação e maneio dos animais, 1 tronco próximo do laboratório para inseminação artificial com sémen congelado e recolha de embriões, 1 manequim para recolha de sémen e ainda diversos paddocks, alguns deles com comedouros, onde se encontram as éguas recetoras e algumas dadoras, divididas em lotes.

Figura 1: Instalações para reprodutores e paddocks da CER.



Durante o estágio foi possível acompanhar a rotina deste centro de reprodução, bem como as diferentes funções de todos os médicos veterinários que nele trabalham. A maior parte do estágio foi então efetuada na Central, no entanto, por diversas vezes foi possível acompanhar o trabalho realizado em diferentes coudelarias.

No centro de reprodução encontravam-se cerca de 120 éguas recetoras. O número de éguas controladas diariamente variava em função do número de recolhas de embrião agendadas, contudo em média eram avaliadas cerca de 60 éguas recetoras por dia. Estas éguas eram sujeitas a palpação transrectal e controlo ecográfico para monitorização da dinâmica folicular. Éguas com ciclicidade ovárica eram monitorizadas em dias alternados e caso fosse necessário, na presença de um corpo lúteo, era antecipado o estro com a administração de uma prostaglandina (PGF<sub>2</sub>α). Sempre que era detetado um folículo de 35mm ou mais de diâmetro, acompanhado de edema uterino, a ovulação era induzida com deslorelina e hormona gonadotrófica coriônica humana (hCG), de forma a ter sempre disponível um número aceitável de recetoras entre o dia 3 e 8 pós-ovulação. Sempre que o número de éguas recetoras cíclicas não fosse suficiente em relação ao número de recolhas de embrião agendadas, eram utilizadas éguas em anestro. Nestas éguas era administrado um estrogénio (benzoato de estradiol) e 2 a 3 dias depois era administrado um progestagénio (P4 de longa ação).

Eram também efetuados diagnósticos de gestação aos 14 dias em éguas que tinham recebido embrião, sendo confirmada a gestação aos 25 e 45 dias, antes da recetora ir para casa do proprietário.

Figura 2: Contenção de éguas para monitorização e controlo folicular.



Relativamente às éguas dadoras, estavam presentes na CER cerca de 40 éguas, que eram monitorizadas regularmente. A ovulação também era induzida com deslorelina e hCG sempre que fosse detetado um folículo de 35mm ou mais de diâmetro, acompanhado de relaxamento do cérvix e edema uterino. A inseminação, caso fosse com sémen refrigerado,

era efetuada 24h depois da indução da ovulação e era realizado novo controlo, 24h após a inseminação, para confirmação da ovulação. Caso a inseminação fosse com sémen congelado, a égua era monitorizada 24h depois da indução da ovulação e depois em intervalos de tempo mais reduzidos, consoante as características uterinas e foliculares, até ocorrer a ovulação, sendo a égua inseminada quando esta era detetada.

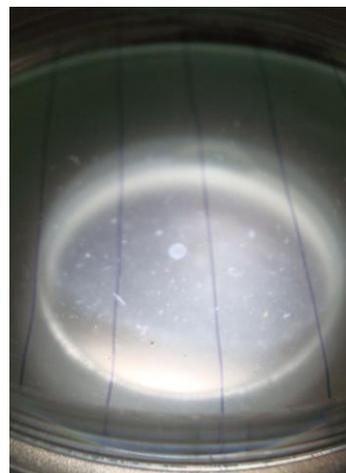
Figura 3: Inseminação artificial de uma dadora.



Assim sendo, foi possível efetuar a monitorização de um grande número éguas, tanto recetoras como dadoras, através de palpação e ecografia transrectal, induzir ovulações e antecipar estros. Foi também possível acompanhar e efetuar diversas lavagens uterinas e inseminações com sémen refrigerado, auxiliar nas inseminações com sémen congelado, na recolha, manipulação e transferência dos embriões. Além disso, houve a possibilidade de assistir à compra e seleção de novas recetoras para o centro e acompanhar o controlo e tratamento de algumas afeções respiratórias, piroplasmoses e cólicas.

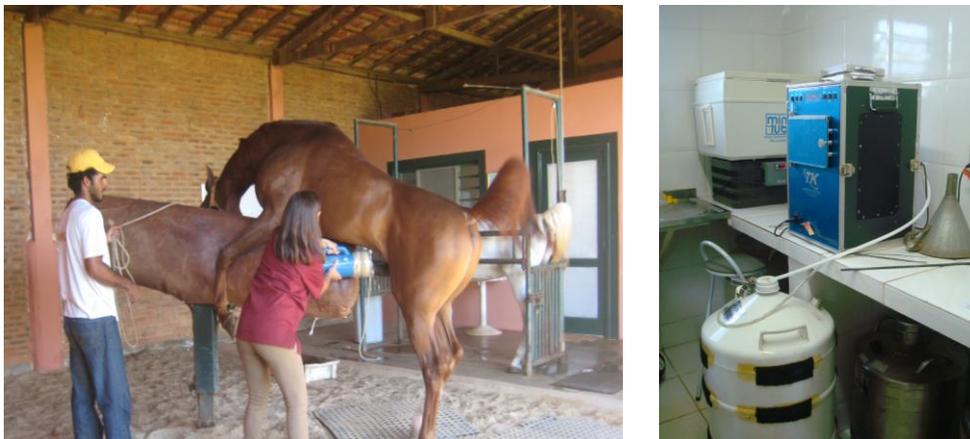
Durante o período de estágio foram então acompanhadas 60 inseminações com sémen refrigerado, tendo sido efetuadas algumas delas, 25 inseminações com sémen congelado, 110 recolhas de embrião e 155 transferências.

Figura 4: Recolha embrionária e embrião em placa de Petri após a recolha.



Foi também possível assistir a uma recolha de óocitos, acompanhar e efetuar recolhas de sémen tanto na CER como em diversas coudelarias e auxiliar na congelação do mesmo, no laboratório da Central.

Figura 5: Recolha de sémen e laboratório para congelação do mesmo.



Sempre que necessário, foi efetuado o acompanhamento nas deslocações às coudelarias em que a CER prestava serviços. Aí também eram feitos controlos da dinâmica folicular, inseminações artificiais e recolha de embriões, que depois eram transportados até à Central para serem transferidos para as recetoras.

## 1.2 Estágio realizado sob orientação do Dr. Bruno Miranda

A segunda metade do estágio teve a duração de 3 meses, tendo decorrido entre 9 de Janeiro e 13 de Abril de 2012. Consistiu no acompanhamento da clínica ambulatória de equinos, sob a orientação do Dr. Bruno Miranda, principalmente nas zonas da Estremadura, Ribatejo e Alentejo. A casuística deste estágio incidiu sobretudo em medicina desportiva, dentisteria, cirurgia de campo e exames em acto de compra (EAC).

Uma vez que a medicina desportiva foi a área mais abrangida neste estágio, as afeções do aparelho músculo-esquelético e articular foram as afeções que se encontraram em maior número. Foi possível assistir e auxiliar no diagnóstico de diversas afeções, utilizando frequentemente meios complementares de diagnóstico, como a radiografia e ecografia, tendo sido também possível acompanhar o tratamento destas afeções e efetuar o seguimento de alguns casos. As doenças encontradas ao longo do estágio foram de natureza bastante variada, abarcando patologias ósseas, de casco, articulares e de tecidos moles. De entre as mais frequentes podem destacar-se os abscessos do casco, ferrações incorretas, traumatismos, osteocondroses, osteoartroses, fraturas e exostoses dos ossos metacarpianos acessórios, luxações patelares, desmites do ligamento suspensor e do

ligamento anular palmar do boleteo e tendinites dos tendões flexor digital profundo e flexor digital superficial.

A dentisteria também foi uma área com grande casuística neste estágio, tendo sido possível acompanhar, principalmente, casos de regularização da mesa dentária e extração dentária, nomeadamente, dos primeiros pré-molares (os chamados “dentes de lobo”). Foi também possível assistir à remoção cirúrgica de um quisto dentífero.

Este estágio permitiu também participar num grande número de orquiectomias realizadas com o animal em estação e acompanhar algumas situações pontuais de afeções do aparelho gastro-intestinal e respiratório, como cólicas e diagnóstico de hemiplegia laríngea. Além disso permitiu ainda acompanhar o tratamento de feridas traumáticas e cirúrgicas, alguns casos de distrofia muscular nutricional em poldros, outros de dermatologia como dermatites bacterianas e assistir a algumas nevrectomias do nervo digital palmar e artroscopias.

A profilaxia e identificação de animais também foram áreas bastante presentes no estágio, tendo sido efetuadas diversas vacinações, desparasitações, resenhos, colocações de microchips e recolhas de sangue.

Adicionalmente, foi ainda possível acompanhar o Dr. Bruno Miranda nas suas funções (nomeadamente, prevenção, tratamentos, e inspeção veterinária) no Concurso Completo Internacional, realizado no Centro Hípico da Barroca D’Alva e no Pet Festival em Lisboa, onde decorreram, entre outros, o Concurso Nacional de Saltos E e uma Jornada do Campeonato Nacional de Horseball Masters.



### III Revisão bibliográfica

#### 1. Enquadramento histórico e situação atual

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, devido às suas características de seleção e aos problemas relacionados com o manejo reprodutivo (Ginther, 1992). Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou contornar o problema, permitindo um melhor aproveitamento dos animais e tornando possível acelerar o aperfeiçoamento das raças e seus cruzamentos. A transferência embrionária pode ser considerada como uma das ferramentas mais promissoras para essa finalidade, tornando-se assim, cada vez mais comum a sua utilização no mundo equino (Arruda et al., 2001; Kumar et al., 2008).

Nas últimas décadas, tem-se assistido a um intenso desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida (Squires, 2005). Entre elas, podemos destacar a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE), a transferência de oócitos (TO), a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a transferência de núcleo (TN; clonagem) (Hinrichs & Choi, 2005). Algumas destas tecnologias são já amplamente utilizadas na reprodução de equinos, outras vão sendo incorporadas lentamente, sendo que umas poderão nunca vir a ser utilizadas regularmente. A rapidez com que uma técnica é aceite e começa a servir de ferramenta na reprodução equina depende do seu sucesso, da postura dos criadores e médicos veterinários, bem como do seu custo-benefício (Squires, 2005). Como exemplos temos a IA, a TE e a TO que são já práticas correntes na reprodução de equinos e a ICSI que começa agora a ser mais utilizada. No entanto, as restantes técnicas mencionadas são quase exclusivamente empregadas na área da investigação (Hinrichs & Choi, 2005).

Embora o cavalo tenha sido dos primeiros animais onde a IA foi aplicada, a utilização e difusão destas novas tecnologias reprodutivas são relativamente recentes, quando comparadas com os avanços verificados noutras espécies animais. Contudo, devido ao seu recente e intenso crescimento, essa disparidade já não se verifica (Allen, 2005).

As primeiras transferências de embriões em equinos bem sucedidas datam dos anos 70. Allen e Rowson realizaram a primeira transferência entre burros e cavalos em 1971 em Cambridge e Oguri e Tsutsumi reportaram o nascimento de um poldro resultante de uma transferência não cirúrgica em 1974. O desenvolvimento desta técnica foi bastante lento no início, sendo que a sua aplicação comercial foi muito reduzida nos anos 70 e 80. Tal facto, deveu-se a diversos fatores entre os quais podemos destacar a resistência imposta pelos livros genealógicos da raça (só era possível registar um poldro por égua por ano), a dificuldade em induzir superovulações nas éguas dadoras e as baixas taxas de gestação após a transferência dos embriões pela técnica não-cirúrgica (Allen, 2005).

A TE de equinos alcançou finalmente uma escala comercial no início dos anos 90 na Argentina, onde se desenvolveu como um meio de produzir descendência das melhores pôneis de pólo sem que estas interrompessem as suas carreiras competitivas (Pashen et al., 1993; Riera & McDonough, 1993). A partir desta altura verificou-se uma crescente e acentuada aplicação da técnica, uma vez que houve um aumento das taxas de gestação após transferência, para valores próximos dos 75% e também porque em 2002 o registo de poldros nascidos após TE começou a ser aceite por alguns livros genealógicos, tendo sido retirada a restrição do registo de apenas um poldro por égua por ano. Este aumento nas taxas de gestação está principalmente relacionado com o aperfeiçoamento da técnica e especialização dos operadores (Vogelsang et al., 1979; Fleury & Alvarenga, 1999; Peres et al., 2002; Allen, 2005; McKinnon & Squires, 2007).

Além disso, foi também comprovado ser possível conservar embriões a uma temperatura de 5°C durante 24h sem decréscimos acentuados na sua viabilidade (Squires et al., 1999), o que tornou a TE mais acessível, uma vez que os embriões podem ser recolhidos em qualquer lugar e transportados para centros especializados que tenham recetoras sincronizadas e técnicos especialistas em transferência (Stout, 2006).

No Brasil, esta técnica em equinos foi primeiramente descrita em 1987 por Fleury et al., que adaptou a metodologia relatada por Douglas (1979), às condições brasileiras (Lira et al., 2009). Hoje, existem cerca de 40 Centros de TE no Brasil, sendo estimada uma média de 6000 gestações por ano de TE, onde são utilizadas uma variedade enorme de raças (Losinno & Alvarenga, 2006; Alvarenga, 2010).

Os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil são líderes mundiais no número de TE em equinos. Desde 2002, a maior associação equina, a American Quarter Horse Association (AQHA) e a American Paint Horse Association (APHA) tornaram possível o registo de um número ilimitado de poldros por égua por ano (Squires, 2005). Hoje, a maioria das associações de criadores de cavalo reconhecem os benefícios da técnica, permitindo o uso da TE (Losinno & Alvarenga, 2006). A aprovação por parte da Associação Portuguesa do Cavalo Puro Sangue Lusitano (APSL) deu-se apenas em 2009, sendo atualmente possível o registo máximo de 3 poldros por égua por ano (APSL, 2010).

Desta forma, a colheita e transferência de embriões frescos, são utilizadas de forma rotineira nos EUA, no Brasil e na Argentina, se bem que na Europa também têm uma utilização significativa em alguns países. Em Portugal não há dados recolhidos de forma centralizada que permitam aferir com rigor a utilização das técnicas de reprodução assistida em equinos, ou mesmo o número de éguas reprodutoras, mas houve um óbvio incremento da atividade nesta área nos últimos 5-6 anos. Uns dos principais fatores restritivos para o uso da TE em Portugal são a baixa produtividade, os custos inerentes ao processo e em particular o custo de manutenção das éguas recetoras num mercado pouco consistente (Rocha, 2011).

É importante ainda referir, que a transferência de embriões era tradicionalmente usada em larga escala em reprodutoras idosas que já dificilmente ficavam gestantes ou que efetivamente ficavam mas, sofriam de morte embrionária ou aborto. Como é óbvio, tal facto limitava a tecnologia, uma vez que, nestas éguas a probabilidade de gerar um embrião normal e apto para a transferência é menor que em éguas reprodutivamente saudáveis (McKinnon & Squires, 2007).

Mais recentemente, como a TE tem sido usada em éguas de desporto, tem sido combinada com novas técnicas reprodutivas como a inseminação com sémen congelado ou a inseminação com doses seminais de baixa concentração. A utilização destas novas tecnologias faz com que sejam necessários mais estudos para aperfeiçoar a técnica, investindo na pesquisa no sentido de desenvolver outros métodos como a criopreservação de embriões e o desenvolvimento de protocolos eficazes de superovulação em éguas. Poderá assim, ser possível aumentar a eficiência reprodutiva de um programa de TE, uma vez que estes dois fatores são, atualmente, os grandes entraves na expansão desta tecnologia (Squires et al., 1999; Squires, 2005; Losinno & Alvarenga, 2006; McKinnon & Squires, 2007).

## 2. Indicações e benefícios da transferência embrionária

A TE na espécie equina é uma técnica de suma importância para a indústria do cavalo. Esta biotecnologia possibilita o maior desenvolvimento do sector através do ganho na eficiência reprodutiva e do incremento do melhoramento genético, favorecendo o melhoramento das raças e seus cruzamentos (Losinno & Alvarenga, 2006; Lira et al., 2009).

Esta técnica tem sido utilizada para a produção de múltiplos poldros por ano, de éguas reprodutivamente saudáveis, de éguas que sejam idosas e não consigam levar uma gestação a termo e de éguas em competição sem que necessitem interromper, por longos períodos de tempo, a sua atividade desportiva. Pode ainda ser utilizada, para aumentar a descendência de éguas que possuam alto valor genético e para obter poldros de éguas subférteis por problemas adquiridos, as quais ficam impedidas de manter uma gestação, devido a uma variedade de razões, tais como infeção uterina crónica, danos no cérvix, etc. Algumas razões pouco comuns para usar a TE e preservar a égua na produção de poldros podem incluir laminites crónicas, artrites severas, cólicas não resolvidas ou problemas de maneio. Além disso esta biotecnologia favorece o maior controlo de doenças aquando da transferência de material genético entre estados ou países (Arruda et al., 2001; Stout, 2006; Kumar et al., 2008; Hurtgen, 2008; Lira et al., 2009). A TE pode também ser utilizada de forma a antecipar a reprodução, sendo possível recolher embriões de éguas com apenas 2 anos de idade (McKinnon & Squires, 2007).

### 3. Técnica de transferência embrionária

A complexidade da transferência de embriões é relativamente baixa quando comparada com técnicas mais avançadas, e pode ser facilmente executada por qualquer médico veterinário que trabalhe em reprodução de equinos. A dificuldade de um programa de TE está na organização e coordenação dos componentes que afetam o sucesso da taxa de gestação, como o manejo da égua dadora, a qualidade da égua recetora e sua sincronização e ainda a habilidade/técnica na transferência (Hinrichs & Choi, 2005).

Temos então alguns passos fundamentais no processo de transferência de um embrião:

- 1- Seleção e manejo das éguas dadora e recetora;
- 2- Sincronização do estro e indução da ovulação;
- 3- Inseminação da dadora e recolha do embrião;
- 4- Avaliação e manipulação do embrião;
- 5- Transferência do embrião;
- 6- Controlo da recetora após transferência.

#### 3.1 Seleção e manejo das éguas dadora e recetora

Na seleção da égua dadora devem ser considerados alguns fatores, dos quais podemos destacar a sua história reprodutiva, a fertilidade, as diretrizes do registo da raça, o valor potencial dos poldros resultantes e o número de gestações desejadas (Squires et al., 1999). A história reprodutiva e a fertilidade são fatores de extrema importância que vão influenciar bastante o manejo destas éguas. Dadoras com história de estabelecerem gestações e depois sofrerem aborto são melhores candidatas a TE do que éguas com história de retornarem repetidamente ao cio após a inseminação, uma vez que nestas últimas o oócito pode não chegar a ser fertilizado, podem existir alterações no transporte dos gâmetas ou a taxa de morte embrionária pode ser bastante alta (McKinnon & Squires, 2007). Outro problema está relacionado com a elevada percentagem de éguas idosas presentes em programas de TE, pois estas têm uma eficiência reprodutiva mais baixa do que éguas jovens. As falhas reprodutivas normalmente observadas estão associadas a alterações na ovulação e maturação dos oócitos e/ou endometrite crónica. Todos estes aspetos devem ser considerados, de forma a encontrar estratégias que aumentem a recolha embrionária nestas éguas (Losinno & Alvarenga, 2006).

O manejo consiste então em monitorizar o comportamento reprodutivo da égua, utilizando a palpação e a ecografia transrectal para monitorizar a atividade folicular e ovulação, e caso seja necessário, utilizando também hormonas exógenas para sincronização do estro e indução da ovulação. Quando em cio, a égua dadora é examinada diariamente para

monitorizar o crescimento folicular, identificando o melhor momento para a inseminação, seja ela com sémen fresco, refrigerado ou congelado (McKinnon & Squires, 2007; Vanderwall & Woods, 2007 citado por Lira et al., 2009).

Relativamente às éguas recetoras, uma adequada seleção e manejo são provavelmente uns dos fatores que mais afetam um programa de transferência de embriões. Os critérios de seleção incluem o peso da égua, a sua idade, ser de fácil manejo, ter um bom desenvolvimento mamário e boa conformação da genitália externa (Squires et al., 1999; McKinnon & Squires, 2007). Além disto, necessitam apresentar ciclos éstricos normais e não ter anomalias ováricas ou uterinas, como acumulação de líquido no útero, quistos, fisómetra ou debris, ou massas nos ovários (Squires et al., 1999). Carnevale et al. (2000) sugerem que uma recetora necessita de apresentar um corpo lúteo (CL) bem definido, bem como um bom ou excelente tônus cervical e uterino para poder ser considerada como “aceitável” num programa de transferências. Ainda de salientar que, segundo McKinnon e Squires (2007), éguas jovens ou de meia-idade que já tenham tido um ou dois poldros são normalmente preferidas como recetoras e deve ser feito um esforço para usar apenas recetoras que já tenham tido pelo menos dois ciclos éstricos normais durante a época de reprodução.

No momento da transferência, é importante que pelo menos duas recetoras estejam disponíveis para cada dadora, permitindo assim, escolher a que apresenta melhores condições reprodutivas para receber o embrião (McKinnon & Squires, 2007; Lira et al., 2009).

### 3.2 Sincronização do estro e indução da ovulação

A sincronização dadora-recetora tem uma enorme influência nos resultados de um programa de transferência de embriões (Panzani et al., 2009). As recetoras devem ovular um dia antes da dadora (+1) ou até três dias depois (-3) (McKinnon & Squires, 2007). No entanto, num estudo de Carnevale et al. (2000), os resultados indicam que o dia pós-ovulatório em que a recetora se encontra, seja talvez, mais importante que a sincronização dadora-recetora.

Quando existe um grande número de recetoras, uma dadora pode ser combinada com uma recetora que tenha ovulado espontaneamente, sem recorrer à utilização de hormonas para sincronizar os seus ciclos. No entanto, quando tal não é possível, a sincronização tem que ser feita recorrendo a hormonoterapia, uma vez que é aconselhável ter pelo menos 2 recetoras para cada dadora (McKinnon & Squires, 2007).

As hormonas mais utilizadas em reprodução são a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), estrogénios (E2), progestagénios (como a progesterona – P4), hormona gonadotrófica coriónica humana, hormona gonadoliberina (GnRH), extrato hipofisário equino (EHE), hormona foliculo-estimulante equina purificada (eFSH) e ocitocina (Faria & Gradela, 2010).

Atualmente, a sincronização entre dadora e recetora é uma técnica realizada de maneira relativamente simples em éguas cíclicas. Geralmente, administra-se uma única injeção intramuscular de PGF2 $\alpha$  ou de um análogo à dadora e procede-se da mesma forma 1 a 2 dias depois para as recetoras, de forma que, estas ovulem depois das dadoras (Lira et al., 2009). A prostaglandina F2 $\alpha$  vai provocar a lise do corpo lúteo, terminando assim a fase lútea e fazendo com que a égua retorne ao estro. No entanto, este tratamento só é efetivo se estiver presente um CL maduro, pois na maioria dos casos, o CL não é sensível à prostaglandina durante os cinco dias subsequentes à ovulação. Após a administração da prostaglandina, a égua demora, em média, cinco a sete dias a retornar ao cio e 9 a 10 dias até ovular (Bradecamp, 2007).

Outro protocolo utilizado consiste no tratamento diário de dadoras e recetoras, durante 10 dias, com progestagénios (progesterona de curta duração ou progestagénios orais) associados a um estrogénio (17- $\beta$  Estradiol) e ao fim destes 10 dias, aplica-se uma injeção de prostaglandina F2 $\alpha$  ou de um análogo. Ao fim de cerca de 3 dias, as éguas exibirão estro. Quando um folículo de 35mm de diâmetro for detetado pode induzir-se a ovulação com hCG ou acetato de deslorelina (Bradecamp, 2007; Squires, 2008; Faria & Gradela, 2010). Neste protocolo, o tratamento nas dadoras também convém ser iniciado um a dois dias antes que nas recetoras (Lira et al., 2009).

Quando temos éguas em anestro, estas podem ser utilizadas como recetoras recorrendo à utilização de progestagénios (Faria & Gradela, 2010). Num protocolo utilizado por Rocha Filho et al. (2004) e Testa et al. (2005), as éguas em anestro são tratadas inicialmente por 3 dias consecutivos com um estrogénio, sendo iniciado o tratamento com progesterona de longa ação, um dia após a última aplicação do estrogénio. O tratamento com progesterona é repetido a cada 7 dias até aos 120 dias de gestação da recetora (Losinno & Alvarenga, 2006).

### 3.3 Inseminação da dadora e recolha do embrião

Após a indução da ovulação, as dadoras são inseminadas de acordo com o protocolo eleito e com o tipo de sémen escolhido (fresco, refrigerado ou congelado). O oócito é fertilizado no oviducto e os embriões são seletivamente transportados para o útero entre os dias 5 e 6 pós-ovulação, encontrando-se na fase de mórula compactada, prontos para o desenvolvimento inicial de blastocisto. Após entrar no lúmen uterino, o seu tamanho aumenta drasticamente atingido o estadió de blastocisto expandido (England, 2005; McKinnon & Squires, 2007; Lira et al., 2009).

Desta forma, os embriões são recolhidos no dia 6, 7 ou 8, sendo o dia 0 o dia da ovulação. A colheita deve ser feita um dia mais tarde em éguas idosas ou que tenham sido inseminadas com sémen congelado, sendo por isso também possível fazer a recolha no dia

9 pós-ovulação. Estudos recentes têm sugerido que quando as éguas são inseminadas pós-ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada que o esperado, tendo sido também observado que as vesículas embrionárias são menores (o equivalente a um dia a menos). Além disso, foi também sugerido que em éguas idosas o desenvolvimento e o transporte embrionário através do oviducto podem ser mais demorados que o normal (Squires et al., 1999; McKinnon & Squires, 2007; Cuervo-Arango et al., 2009).

Os procedimentos para a recolha de embriões têm permanecido quase inalterados durante as últimas décadas, sendo esta realizada através de um procedimento transcervical não-cirúrgico (Squires et al., 2003).

Um cateter de silicone com cerca de 80 cm de comprimento, um diâmetro de cerca de 8mm e com um balão próximo da extremidade, é introduzido na vagina, passa o cérvix entrando aproximadamente 5cm no corpo do útero. Uma vez na posição correta, o balão é insuflado com 60 a 80 ml de ar e o cateter é tracionado caudalmente de encontro ao óstio cranial do cérvix e inicia-se a lavagem. A lavagem uterina pode ser feita com Lactato de Ringer, que deve ser aquecido a 30-37°C. Devem ser usados 1 a 2 litros de solução na infusão do útero (dependendo do tamanho do útero), sendo o líquido depois recolhido por gravidade para um filtro de 75µm de poro. Este procedimento é repetido pelo menos 3 vezes. A recolha da solução pode ser auxiliada com massagem do útero *per rectum*, e ocasionalmente com administração de 20UI de ocitocina por via endovenosa (IV). Deve ser feita a monitorização da quantidade de líquido recolhido, podendo ser utilizada uma proveta ou um cilindro graduado (Fleury & Alvarenga, 1999; Fleury et al., 2001; McCue et al., 2003; McKinnon & Squires, 2007; Lira et al., 2009). De acordo com McCue et al. (2003) uma lavagem extra com administração prévia de ocitocina e deixando permanecer a solução durante 3 minutos no útero aumenta significativamente a taxa de embriões recolhidos.

No final das lavagens ficam retidos no filtro, aproximadamente, 50ml de solução para pesquisa do embrião. Normalmente, os embriões maiores (dia 8 e 9) podem ser visualizados a olho nu no filtro, mas os mais pequenos requerem a utilização de uma lupa para poderem ser identificados (Stout, 2006; McKinnon & Squires, 2007).

#### 3.4 Avaliação e manipulação do embrião

Após a lavagem uterina, o líquido retido no filtro é vertido para uma placa de Petri para ser observado à lupa (ampliação de 10x) e identificar o embrião. Quando este é localizado, é removido para outra placa mais pequena contendo um meio de cultura próprio para embriões, onde é avaliado e classificado. A classificação embrionária é feita também à lupa com uma ampliação de 40x e de acordo com os parâmetros de estadios de desenvolvimento e qualidade, conforme as recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society) (Fleury et al., 2003; Stout, 2006). Os embriões recolhidos podem apresentar diferentes

estádios, tais como, mórula, jovem blastocisto, blastocisto ou blastocisto expandido (Lira et al., 2009). A avaliação da qualidade tem em consideração a morfologia, relacionando-a com a viabilidade. São avaliados quanto ao formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da zona pelúcida e classificados de 1 a 5, sendo o Grau 1 considerando excelente e o 5 degenerado (McKinnon & Squires, 1988).

Tabela 1: Sistema de classificação de embriões de equinos.

Grau 1	Excelente: Embrião ideal esférico com blastómeros de tamanho, cor e textura uniformes.
Grau 2	Bom: Imperfeições mínimas, como alguns blastómeros extrusados, ou formato irregular.
Grau 3	Razoável: Problemas bem definidos mas sem gravidade, como blastómeros extrusados, células degeneradas ou blastocelo colapsado.
Grau 4	Inferior/Mau: Problemas graves, blastocelo colapsado, inúmeros blastómeros extrusados e muitas células degeneradas.
Grau 5	Morto ou não fertilizado: Totalmente degenerados, com rutura ou não fecundados.

Adaptado de: McKinnon & Squires, 1988.

Após a avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção ou colocado numa placa de Petri contendo 10 gotas separadas desse mesmo meio de manutenção, onde o embrião é lavado pelo menos 3 vezes em cada gota (Fleury & Alvarenga, 1999; Fleury et al., 2001). O objetivo deste procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida antes de aspirar o embrião para a palhinha de congelação. Neste momento o embrião está pronto para ser transferido para uma recetora (Daels, 2007 citado por Lira et al., 2009). No entanto, muito frequentemente, a recetora não se encontra no mesmo local da dadora, sendo por isso necessário transportar o embrião. Uma das maiores alterações na técnica de transferência de embriões foi a possibilidade de os armazenar a 5°C, 15°C ou 20°C até 24h após a recolha. Refrigerar e armazenar embriões a esta temperatura permitiu que fosse possível efetuar o transporte dos embriões para uma estação centralizada onde se efetue a transferência para um recetora (Squires et al., 2003; Fleury et al., 2005).

O meio usado inicialmente para armazenar embriões de equinos foi o Ham's F-10. Este meio era gaseificado com oxigénio, dióxido de carbono e azoto, sendo composto por antibióticos e uma fonte proteica. No entanto, tinha uma desvantagem, pois uma vez preparado tinha de ser utilizado nas 72h seguintes. Outros meios foram então desenvolvidos, como o ViGro ou o EmCare, que estão prontos a ser utilizados e têm uma validade de cerca de um ano (Fleury et al., 2005; McCue, 2009a).

De referir também que os embriões podem ser criopreservados. No entanto, isto ocorre em pequeno número quando comparado com aqueles que são refrigerados ou diretamente transferidos para a recetora. Tal facto deve-se a algumas limitações ainda presentes na reprodução de equinos, como a dificuldade em superovular dadoras e em congelar embriões em estadios mais avançados, uma vez que apenas podem ser congelados mórulas ou jovens blastocistos (McCue, 2009b).

### 3.5 Transferência do embrião

A transferência de embriões em equinos pode ser realizada pela técnica cirúrgica, por incisão no flanco, ou pela técnica não-cirúrgica, por via cervical. Atualmente a metodologia mais utilizada é a transferência não-cirúrgica (Allen, 2005; Lira et al., 2009). McKinnon e Squires (2007) apenas utilizam a técnica cirúrgica em investigação e associada a outras tecnologias reprodutivas. A técnica não-cirúrgica além de também permitir elevadas taxas de gestação, é muito menos invasiva e mais rápida, uma vez que consiste em depositar o embrião no corpo do útero utilizando uma pipeta de inseminação que entra pela vagina e atravessa o cérvix (transcervical) (Lira et al., 2009). O embrião pode ser colocado numa palhinha estéril de 0,25 ou 0,5 ml e depois transferido com a ajuda da pipeta de transferência ou ser colocado diretamente na pipeta de inseminação esterilizada. A escolha do método é feita com base nas preferências do manipulador e consoante o tamanho do embrião. Em qualquer dos casos existem 3 colunas de líquido, separadas por espaços de ar, estando o embrião localizado na coluna do meio. Desta forma os movimentos do embrião são minimizados. Além disso, a primeira coluna serve para lubrificar a saída da pipeta e a terceira serve para assegurar que o embrião é realmente expelido para o útero (Stout, 2006).

Existem, no entanto, alguns cuidados a ter em conta no momento da transferência. Deve ser assegurado que a pipeta entra no útero sem ser contaminada pela vulva ou vagina da recetora e com o mínimo de dilatação do canal cervical, evitando traumatizá-lo bem como ao endométrio. A contaminação é minimizada introduzindo a pipeta numa bainha protetora. Quando a pipeta se encontra caudalmente ao óstio cranial do cérvix a pipeta é mantida no mesmo sítio e a bainha protetora é puxada para trás, de forma que, quando a pipeta entre no útero já não esteja envolvida pela bainha e continue estéril. Se necessário, a pipeta pode ser guiada com a ajuda da mão através do recto. Quando finalmente se encontra no corpo do útero o embrião é expelido da pipeta, e esta é retirada. Alguns médicos veterinários preferem depositar o embrião no corno uterino, não tendo, no entanto, sido verificado qualquer aumento da taxa de gestação devido a essa modificação da técnica. Uma tranquilização da recetora antes da transferência pode relaxar o cérvix, tornando assim mais

fácil o procedimento e evitando traumatismos do canal cervical (Hinrichs & Choi, 2005; Stout, 2006).

### 3.6 Controlo da recetora após transferência

Após a transferência, pode ser feito o diagnóstico de gestação nas recetoras a partir dos 11 dias pós-ovulação. O exame ecográfico transrectal neste dia pós-ovulação permite, a um técnico experiente, detetar 98% das gestações. No entanto, caso seja negativo deve repetir-se o exame ecográfico uns dias depois. Caso seja positivo, deve ser novamente efetuado a partir dos 22-25 dias para verificação da existência de batimento cardíaco e depois por volta dos 45 dias, quando o concepto já é considerado um feto, para verificar a ausência de morte embrionária (Carnevale et al., 2000; Frazer, 2004; Jacob et al., 2012).

### 4.Morte embrionária

A morte embrionária é responsável por perdas económicas significativas, principalmente em gestações estabelecidas após transferência de embriões (Greco et al., 2009). Esta perda embrionária é geralmente definida como uma interrupção na gestação, ocorrida entre a fertilização e os dias 40 de gestação (Vanderwall, 2008).

O diagnóstico de perda embrionária e o reconhecimento dos fatores que contribuem para a sua ocorrência, tiveram um avanço enorme com o estabelecimento da ecografia transrectal como prática rotineira no diagnóstico precoce de gestação (12-14 dias de gestação ou 10-11 dias em estudos experimentais). No entanto, antes do dia 10, o embrião é demasiadamente pequeno para ser visualizado com um equipamento normal de ecografia, tendo sido necessário o desenvolvimento de outros métodos, apenas a nível académico, para contornar este obstáculo. De referir que a morte embrionária antes do dia 10 deve ser diferenciada de uma possível falha na fertilização, sendo, contudo, bastante difícil de determinar a sua ocorrência (Vanderwall & Newcombe, 2007).

A maioria das perdas embrionárias ocorre nos primeiros dias após a fertilização ou durante o processo de implantação do embrião no útero (Vanroose et al., 2000). Num estudo efetuado por Duarte et al. (2002) para avaliar as taxas de perda embrionária em diferentes períodos da gestação, concluiu-se que o período que regista mais perdas se situa entre o 11º e 20º dia de gestação, registando 24 perdas das 38 ocorridas durante todo o estudo. Neste trabalho a percentagem de perda embrionária até aos 50 dias de gestação foi de 8,53%. Por seu lado, Vanderwall (2008) recolheu dados de 28 estudos anteriores entre o ano de 1982 e 2007 e avaliou a taxa de perda embrionária, a qual variou bastante, situando-se entre 2,6% e 24%, sendo que a média de todos os estudos foi de 8,6%.

Os fatores que podem contribuir para a morte embrionária foram classificados como intrínsecos, extrínsecos e embrionários. Como intrínsecos temos as doenças do endométrio, a sub-função lútea, a idade da égua, a lactação, o cio do poldro, o tempo de inseminação relativamente ao tempo de ovulação, o local de fixação da vesícula embrionária e as anomalias cromossômicas maternas. Como fatores extrínsecos temos o *stress*, a nutrição, o clima, a palpação e ecografia transrectal, o garanhão utilizado, o processamento do sêmen e a manipulação dos gâmetas nas técnicas de reprodução assistida. Como fatores embrionários temos as alterações cromossômicas do embrião ou de outras características, tais como a morfologia. No entanto estes fatores estão muitas vezes associados a fatores intrínsecos (idade da égua) ou extrínsecos (manipulação do embrião) (Vanderwall, 2008).

#### 5. Programas comerciais de transferência embrionária

O primeiro país onde a transferência de embriões alcançou uma escala comercial foi a Argentina, no início dos anos 90. No entanto, o grande desenvolvimento da técnica ocorreu a partir de 2002, quando a American Quarter Horse Association legalizou o registo de um número ilimitado de poldros por égua por ano (Pashen et al., 1993; Riera & McDonough, 1993; Squires, 2005). Hoje, quase a totalidade das associações de criadores de cavalos reconhecem os benefícios da transferência embrionária, permitindo a sua utilização e o registo dos poldros nascidos após transferência (Losinno & Alvarenga, 2006). A recolha e transferência de embriões tornou-se assim uma tecnologia amplamente utilizada na indústria de equinos (Squires et al., 2003).

Devido a esta utilização massiva e ao crescente interesse da indústria de equinos, principalmente nos EUA, Brasil e Argentina, o objetivo destes programas comerciais é maximizar o sucesso das transferências, sendo por isso essencial identificar os fatores que afetam a sua eficiência reprodutiva (Losinno & Alvarenga, 2006; Carneiro, 2010).

Para que um programa comercial de TE seja eficiente é imprescindível otimizar os índices de recolha embrionária e maximizar o sucesso das transferências, ou seja, aumentar as taxas de gestação e diminuir as taxas de morte embrionária após a transferência (Fleury & Alvarenga, 1999; Carnevale et al., 2000; Stout, 2006).

Contudo, é importante referir que existem algumas limitações que influenciam significativamente a eficiência destes programas, como a dificuldade em superovular dadoras e em criopreservar embriões (Stout, 2006; Alvarenga, 2010).

## 5.1 Fatores que afetam a recolha embrionária

Num programa comercial de transferência embrionária é importante desenvolver técnicas para otimizar os índices de recolha embrionária, de forma a diminuir os custos envolvidos num processo de transferência (Fleury & Alvarenga, 1999). Assim sendo, é importante identificar os fatores que afetam a recolha, para que seja possível aumentar a sua eficiência. Contudo é também importante realçar que existem fatores que não podem ser manipulados, sendo necessário alertar os proprietários atempadamente para os problemas com os quais se irão deparar (Stout, 2006).

De entre os fatores que afetam as taxas de recolha embrionária podemos destacar o número de ovulações, a idade da dadora e a sua história reprodutiva, o método de preservação, dose e qualidade do sémen e o dia da recolha (Fleury et al., 2001; Squires et al., 2003; Stout, 2006; Squires, 2006; McKinnon & Squires, 2007).

Atualmente, a maioria dos embriões recolhidos provêm de ovulações simples espontâneas, apresentando uma taxa de recolha de apenas 50% (Squires, 2006). Esta taxa relativamente baixa, aumenta o intervalo de tempo necessário para obter um embrião e consequentemente os custos do processo de transferência (Squires et al., 1999). O ideal, seria então aumentar o número de ovulações, tirando partido das duplas-ovulações espontâneas ou utilizando fármacos para induzir ovulações múltiplas. No entanto, existe ainda uma grande dificuldade em superovular éguas, não sendo por isso possível atingir uma taxa de gestação maior por cada ciclo da dadora (Losinno & Alvarenga, 2006; Squires, 2006).

As éguas dadoras são um ponto-chave num programa de TE e embora, hoje em dia, já sejam utilizadas muitas éguas jovens e reprodutivamente saudáveis, um dos grandes problemas que afeta a taxa de recolha embrionária é a elevada percentagem de éguas idosas e de éguas subférteis (Losinno & Alvarenga, 2006; McKinnon & Squires, 2007). Éguas idosas têm uma eficiência reprodutiva mais baixa com aumento da morte embrionária, estando as falhas reprodutivas associadas a alterações da ovulação e maturação de oócitos, doenças no oviducto e patologias uterinas como a endometrite crónica (Losinno & Alvarenga, 2006; Squires, 2006). Para contornar estes problemas pode-se aumentar o número de lavagens uterinas por estação, bem como o número de ovulações por ciclo, inseminar com doses seminais de baixa concentração, fazer lavagens uterinas antes e depois da inseminação e realizar lavagens mais tardiamente (dia 8, 9 ou 10 após a ovulação) uma vez que o desenvolvimento e transporte do embrião são mais retardados em éguas idosas (Squires et al., 1999; Losinno & Alvarenga, 2006).

Relativamente à qualidade do sémen, esta é de extrema importância pois nenhum programa se sustenta comercialmente se não houver um completo e objetivo diagnóstico andrológico e uma estimativa da capacidade reprodutiva dos garanhões (Losinno & Alvarenga, 2006).

Além de ser necessário um sêmen de boa qualidade, a dose utilizada e o método de processamento e conservação também influenciam a taxa de recolha embrionária. Normalmente, éguas inseminadas com sêmen fresco têm maior probabilidade de produzir embriões que aquelas que são inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado (Squires et al., 2003). Como tal, é importante definir o melhor regime semanal de recolha de sêmen para cada garanhão, determinar o melhor diluidor, a temperatura ideal e o tempo máximo de transporte para cada lote de sêmen, inseminar o mais próximo possível das ovulações e evitar a refrigeração ou congelação de sêmen pouco resistente a estes processos (Losinno & Alvarenga, 2006).

A recolha embrionária pode ainda ser influenciada pelo dia em que é efetuada. Embriões recolhidos no dia 6 pós-ovulação (D6) apresentam uma taxa de recolha menor àquela que é apresentada por embriões recolhidos dia 7, 8 ou 9. Isto porque, o embrião equino apenas atinge o útero no dia 5 ou 6 pós-ovulação, podendo ainda estar no oviducto no caso de a recolha ser efetuada no dia 6 (Stout, 2006; Squires, 2006; McKinnon & Squires, 2007). Embora estes embriões D6 sejam menores e mais difíceis de recolher, o seu estadio é o mais indicado para a micromanipulação, sendo por isso normalmente recolhidos quando é necessário congelar ou fazer bissecção (Squires et al., 1999; McKinnon & Squires, 2007). Num estudo efetuado por Fleury & Alvarenga (1999) foram comparadas as taxas de recolha embrionária para embriões recolhidos nos dias 7, 8 e 9, sendo que a maior taxa de recolha foi registada em embriões D8 (58%). Tais resultados foram também comprovados por Fleury et al. (2001), com uma taxa de recolha de 62,8% em embriões D8. Embriões maiores e com mais de 9 dias são mais suscetíveis de serem danificados durante o processo de recolha, sendo por isso evitada a recolha após o dia 9 (McKinnon & Squires, 1988 citado por Stout, 2006).

## 5.2 Fatores que afetam as taxas de gestação e de morte embrionária após transferência

Para maximizar o sucesso de uma transferência de embrião têm de ser identificados os fatores que podem afetar as taxas de gestação e de morte embrionária, uma vez que a variação destes fatores pode alterar significativamente estes dois parâmetros. Os principais fatores são então as éguas recetoras, o próprio embrião e a técnica de transferência (Carnevale et al., 2000).

### 5.2.1 Éguas recetoras

As éguas recetoras, o seu maneio e seleção são um dos pontos-chave de um programa de transferência de embrião (Squires et al., 1999; McKinnon & Squires, 2007), sendo um dos itens mais dispendiosos do orçamento. Considerada, durante anos, como uma égua de “segunda”, com atenção, condições de espaço, sanidade e alimentação limitadas e sub-ótimas, especialmente em relação às dadoras, hoje ocupam uma posição importante nas decisões a serem tomadas num programa comercial de TE (Losinno & Alvarenga, 2006).

As recetoras têm de ser avaliadas em dois momentos distintos. O primeiro, antes da compra, onde são avaliados diversos parâmetros, podendo a égua recetora, ser ou não aceite no programa, e posteriormente, no momento da transferência do embrião, quando se avalia se a égua, nesse momento, está apta ou não para receber esse embrião.

Durante os primeiros anos dos programas comerciais de TE, os requisitos para a compra de recetoras, em geral, somente abarcavam a idade, tamanho, condição corporal e a capacidade reprodutiva que era avaliada apenas através de um exame ginecológico transrectal. Hoje em dia no Brasil, a maioria dos médicos veterinários utilizam apenas, para além do mencionado, o exame ecográfico para compra ou refugo de recetoras (Losinno & Alvarenga, 2006). Qualquer sinal de alteração, como presença de fluido, quistos, ar ou debris no útero, massas ou outras anomalias ováricas impedem que a égua seja aceite no programa de TE (Squires et al., 1999). Ainda de referir que o cérvix não pode estar danificado e não deve ser tortuoso, pois dificuldades em passar o cérvix estão associadas a uma causa provável de falha no estabelecimento de gestação (Stout, 2006). É importante salientar que nem sempre a ausência de fluido uterino indica a inexistência de um processo inflamatório instalado. Em função disso, seria aconselhável que pelo menos o exame citológico fosse incluído na seleção das recetoras. A minúcia do exame reprodutivo depende mais das circunstâncias particulares da compra (preço, disponibilidade para recolha de amostras, autorização do proprietário, experiência do médico veterinário, etc.), do que da indicação médica. O ideal seria que uma égua candidata a ser incorporada como recetora, fosse sujeita a um exame de seleção que incluísse a avaliação da conformação da genitália externa, palpação e ecografia transrectais, citologia, cultura e biópsia endometrial (Losinno & Alvarenga, 2006).

Uma recetora deve então apresentar um bom estado geral, ter uma boa condição corporal, um peso compreendido entre os 400 e 550Kg, bom desenvolvimento mamário, boa conformação da genitália externa e ser relativamente jovem (3-10 anos) (Squires et al., 1999; McKinnon & Squires, 2007). A idade é um fator muito importante pois idades avançadas predispõem a alterações do endométrio que comprometem a capacidade de manter uma gestação (Morris & Allen, 2002 citado por Stout, 2006). Além disso, segundo

Carnevale et al. (2000) recetoras com idade inferior a 10 anos têm menores perdas de gestação.

É também importante que a recetora seja dócil e tenha algum instinto maternal. Ser de fácil manejo é um requisito básico pois na melhor das hipóteses a égua vai ser sujeita a pelo menos 10 controlos ultrassonográficos, gerar e criar um poldro, sendo o contacto com seres humanos indispensável. O instinto maternal é também importante já que a égua terá de amamentar a cria e por isso, a preferência de éguas que já tenham produzido um ou dois poldros (Losinno & Alvarenga, 2006; McKinnon & Squires, 2007).

Mesmo depois de a égua ser aceite no programa de TE, existem outros fatores a ter em conta no momento da transferência do embrião, como a ciclicidade, o tónus uterino e cervical, morfologia do corpo lúteo e número de dias após a ovulação (Carnevale et al., 2000).

Relativamente à ciclicidade, as éguas que não estejam ainda a ciclar podem ser usadas como recetoras logo no início da estação reprodutiva, quando éguas cíclicas ainda não estão disponíveis (Carnevale et al., 2000). No Brasil, o uso de progesterona em éguas em anestro ou em fase de transição, no início e final da estação de monta tem-se tornado frequente. Este protocolo é importante, pois é frequente as éguas dadoras começarem a ciclar mais precocemente que as recetoras no início da estação, bem como, deixarem de ciclar mais tardiamente no final da estação, permitindo assim um início mais precoce e um final mais tardio dos programas de TE (Losinno & Alvarenga, 2006).

Num estudo efetuado por Carnevale et al. (2000), a percentagem de perda embrionária em éguas recetoras que não estavam a ciclar foi superior. No entanto, o número de éguas utilizadas foi muito reduzido não podendo ser determinada nenhuma diferença significativa. Já Rocha Filho et al. (2004) e Pinna et al. (2006) também avaliaram em dois programas de TE distintos, os índices de gestação e de morte embrionária em éguas recetoras cíclicas e acíclicas (anestro e em fase de transição) tratadas uma vez por semana com progesterona de longa ação (P4 LA), não observando diferenças significativas entre o grupo com ciclicidade e o grupo de éguas em anestro, demonstrando que este tratamento é seguro na manutenção da gestação, permitindo a obtenção de taxas de gestação igualmente elevadas após transferência.

Quando se utilizam recetoras que já apresentam ciclicidade ovárica, devem ser escolhidas éguas que tenham ovulado um dia antes (+1) ou até 3 dias depois (-3) das dadoras (McKinnon & Squires, 2007). No entanto, segundo Carnevale et al. (2000), o dia pós-ovulação em que a recetora se encontra é mais importante que a própria sincronia com a dadora, sendo aconselhável o uso de recetoras que estejam entre o terceiro (D3) e o oitavo (D8) dia após a ovulação (Losinno & Alvarenga 2006; Fleury et al., 2006).

Estes últimos autores (Fleury et al., 2006) avaliaram a taxa de gestação consoante o dia pós-ovulatório da recetora, não tendo sido encontrada qualquer diferença significativa. No

entanto, outros estudos não encontraram os mesmos resultados. Carnevale et al. (2000), transferiram embriões para recetoras entre o dia 5 e 9 pós-ovulação, registando perdas de gestação significativamente menores em éguas que se encontravam entre o dia 5 e 6 (7,3% e 8,6% respetivamente) do que naquelas que se encontravam entre o dia 7 e 9 (22,4%, 15,1%, 30,8% respetivamente). Panzani et al. (2009) também encontraram taxas de gestação, aos 40 dias, superiores nas recetoras que se encontravam entre D4 e D7.

Possivelmente, quando as recetoras são usadas mais precocemente, o reconhecimento materno da gestação é mais eficiente ou a resposta uterina à manipulação é mais reduzida, resultando assim em maiores taxas de gestação e menores taxas de morte embrionária (Carnevale et al., 2000). Sevinga et al. (1999) demonstraram que o tamanho do corpo lúteo e a produção de progesterona no dia 8 ou 9 pós-ovulação são maiores em éguas gestantes do que em éguas não gestantes, o que sugere que as alterações fisiológicas associadas à gestação ocorrem antes desses dias e que o reconhecimento precoce da gestação afeta não só a produção de progesterona pelo corpo lúteo mas também a qualidade do ambiente uterino. Além disso, Alvarenga (1989) sugere que éguas com menor número de dias pós-ovulação (D6) são melhores candidatas a recetoras, uma vez que, neste período, o corpo lúteo é refratário a uma possível libertação de PGF2 $\alpha$ , conseqüente da manipulação uterina ocorrida no momento da transferência (citado por Fleury et al., 2001).

No que diz respeito às características uterinas, Fleury et al. (2006) verificaram que estas influenciam bastante as taxas de gestação. Recetoras com maior tónus uterino e com imagens ecográficas mais ecogénicas e homogêneas apresentam maiores taxas de gestação, o que sugere que um tónus reduzido pode indicar que o ambiente uterino não é totalmente compatível com o desenvolvimento e manutenção de um embrião (Carnevale et al., 2000).

Num estudo efetuado, Carnevale et al. (2000) classificaram as recetoras como “aceitáveis” e “marginais” baseando-se na palpação e ecografia transrectais, efetuadas ao 5º dia pós-ovulação. Aceitáveis se tivessem um corpo lúteo bem definido, um bom ou excelente tónus cervical e presença de tónus uterino. Marginais se na ecografia o CL fosse pequeno ou mal definido, o tónus cervical fosse fraco ou ausente e não houvesse tónus uterino. Quando comparadas as taxas de gestação, recetoras classificadas como aceitáveis tiveram maiores taxas do que as classificadas como marginais, sendo que estas últimas apresentaram também maior taxa de morte embrionária. Segundo Squires et al. (1999) os níveis de progesterona circulante são mais elevados em recetoras classificadas como aceitáveis, sendo que baixos níveis estão associados a reduzidos tónus cervical e uterino. Como tal, os critérios referidos por Carnevale et al. (2000) e Fleury et al. (2006) para seleção das recetoras são importantes e devem ser utilizados pois estão relacionados com os níveis de progesterona em circulação, essenciais para manter uma gestação (Carnevale et al., 2000; DeLuca et al., 2011).

## 5.2.2 Embrião

Outro componente essencial para o sucesso de uma transferência de embriões é o próprio embrião (Carnevale et al., 2000). As taxas de gestação e de perda embrionária podem ser influenciadas pela qualidade, idade, tamanho e grau de desenvolvimento do embrião e pelos métodos de preservação do mesmo (Carnevale et al., 2000; Squires et al., 2003; Stout, 2006; McKinnon & Squires, 2007).

O diâmetro médio para embriões recolhidos dia 7 e 8 é de 406  $\mu\text{m}$  e 1132  $\mu\text{m}$  respetivamente (Vanderwall, 1996).

Embriões menores que o normal para a sua idade ou com alterações morfológicas, apresentam menores taxas de gestação. No entanto, não quer dizer que embriões recolhidos mais cedo (dia 6 pós-ovulação) e por isso menores, tenham menor viabilidade (Carnevale et al., 2000; Squires et al., 2003).

Carnevale et al. (2000), referem taxas de gestação no dia 50 significativamente diferentes consoante o diâmetro e o estadio do embrião, sendo mais reduzidas para mórulas e embriões com diâmetro entre os 100  $\mu\text{m}$  e os 299  $\mu\text{m}$ . Esta diferença pode ser justificada pelo facto de a maioria destes embriões apresentar uma dimensão menor ou um estadio mais precoce relativamente à sua idade. Provavelmente, o que aconteceu a estes embriões é que teriam um atraso no seu desenvolvimento e daí as baixas taxas de gestação.

Camargo et al. (2008) efetuaram recolhas no dia 8 e 9 pós-ovulação, e também referem taxas de gestação superiores para os estadios de blastocisto e blastocisto expandido quando comparadas com as apresentadas pelos embriões nos estadios de mórula e jovem blastocisto. Estes autores constataram ainda que não houve diferença significativa na taxa de gestação para embriões de diferentes tamanhos, no entanto, o diâmetro da maioria dos embriões recolhidos neste estudo encontrava-se dentro dos valores normais para a sua idade, o que poderá explicar esta ausência de diferenças.

Relativamente à qualidade morfológica do embrião, esta pode influenciar significativamente as taxas de gestação (Squires et al., 2003). Segundo Camargo et al. (2008) embriões de grau 1 têm taxas de gestação maiores quando comparados com embriões dos demais graus. Num outro estudo, Squires et al. (1999) avaliaram as taxas de gestação após transferência cirúrgica de embriões frescos e refrigerados, consoante a sua classificação. Embriões classificados como grau 3 e 4 tiveram baixas taxas de gestação quando comparados com os classificados como grau 1 e 2. Carnevale et al. (2000) apresentaram resultados idênticos pois embriões classificados como grau 1 e 2 tiveram uma taxa de gestação significativamente mais elevada do que a dos classificados como grau 3 e 4. No entanto, embriões de grau 2 embora tenham tido taxas de gestação aos 12 dias idênticas à dos de grau 1, a morte embrionária foi significativamente superior (12,3% e 25,6% respetivamente). Aparentemente, mesmo que sejam pequenas as alterações morfológicas

do embrião, estas podem estar associadas a uma redução da viabilidade e baixas taxas de sucesso. Estas observações vêm suportar a importância da avaliação morfológica do embrião e salientar que a morfologia é um bom indicador da viabilidade e do possível sucesso do programa de transferência (Carnevale et al., 2000).

Os embriões podem ser recolhidos e transferidos imediatamente como frescos ou podem ser armazenados a 5°C, 15°C ou 20°C, por 24 horas, e enviados para o local onde se encontra a recetora (Fleury et al., 2005; Squires, 2006).

Contudo, não existem diferenças na taxa de gestação nem na de perda embrionária entre embriões frescos e aqueles que foram refrigerados e posteriormente transportados. Os resultados confirmam que refrigerar e depois transportar embriões, quando corretamente efetuado, é um procedimento possível e que não implica perda da viabilidade do embrião (Carnevale et al., 2000; Fleury et al., 2002; Squires, 2006).

No estudo efetuado por Fleury et al. (2005) os embriões foram mantidos em dois meios de cultura diferentes (ViGro e EmCare) durante 18h entre 15°C e 20°C antes de serem transferidos para as recetoras. Os resultados da taxa de gestação foram idênticos para ambos os meios. Tal resultado está de acordo com um estudo efetuado por Moussa et al. (2003), em que também não foram encontradas diferenças consoante os meios utilizados, tendo sido os embriões armazenados em 3 meios diferentes (Ham's F-10, EmCare e ViGro), durante 24h à temperatura de 5°C.

### 5.2.3 Técnica de transferência

Inicialmente, as transferências cirúrgicas tinham maiores taxas de sucesso que as transferências não-cirúrgicas. Num estudo efetuado por Iuliano et al. (1985) a taxa de gestação após transferência cirúrgica foi substancialmente superior (72%) que aquela registada para embriões transferidos não-cirurgicamente (45%). As possíveis razões para as baixas taxas de gestação após transferência não-cirúrgica podem ser o local de deposição do embrião, os danos causados no embrião durante a transferência ou a introdução de microrganismos no ambiente uterino (Iuliano et al., 1985). Outros estudos efetuados, também evidenciaram diferenças entre os dois métodos. Castleberry et al. (1980) obtiveram taxas de 60% e 12,5% após transferências cirúrgica e não-cirúrgica respetivamente, enquanto que Imel et al. (1981) obtiveram 53% de gestações em TE cirúrgica e 27% em TE não-cirúrgica (citados por Fleury et al., 2001).

Squires et al. (1999) após transferência cirúrgica de embriões de grau 1, registaram taxas de gestação, aos 12 dias, de 89% para embriões frescos e 86% para embriões refrigerados. No entanto, mais recentemente, McKinnon & Squires (2007) referem que em 8 anos de utilização da TE não-cirúrgica têm conseguido atingir taxas de gestação ao 15º dia de 75%,

o que vem demonstrar que a execução cuidada da técnica resulta em taxas de gestação consistentes.

Nesta técnica, além de ser imperativo evitar a contaminação do útero, deve ainda ser assegurado o mínimo de dilatação e traumatismo do cérvix, pois dificuldades em passar o cérvix estão associadas a uma causa provável de falha no estabelecimento de gestação. Uma tranquilização da recetora antes da transferência pode relaxar o cérvix tornando assim mais fácil o procedimento e evitando traumatismos do canal cervical (Hinrichs & Choi, 2005; Stout, 2006).

Squires et al. (1999) afirmam que os resultados das taxas de gestação com a utilização da técnica não-cirúrgica variam bastante consoante o técnico que a executa, o que foi confirmado num estudo efetuado por Peres et al. (2002), onde foram avaliadas as taxas de gestação ao dia 15, de transferências efetuadas por 6 técnicos diferentes. Quatro deles tiveram taxas idênticas (entre 62 e 65%) enquanto, as dos outros dois foram significativamente diferentes (38% e 44%). Neste estudo foi ainda avaliada a taxa de gestação consoante o equipamento utilizado e embora tenham sido encontradas diferenças, estas não foram significativas.

Com a intensificação da utilização da transferência de embrião, algumas alterações da técnica têm sido propostas no sentido de aumentar as taxas de gestação. Como exemplo disso temos o tratamento de recetoras com anti-inflamatórios não esteróides (AINE'S). Esta prática deve ser tida em consideração pois, o próprio processo de transferência pode causar uma resposta inflamatória subclínica do endométrio com aumento das proteínas ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e libertação de PGF2 $\alpha$ , estando assim associada a uma luteólise prematura que pode causar morte ou expulsão do embrião transferido (Koblischke et al., 2008). Outro exemplo disso é a deposição do embrião no corno uterino. No entanto, não foi registado qualquer aumento da taxa de gestação devido a essa modificação da técnica (Hinrichs & Choi, 2005).

### 5.3 Fatores limitantes da técnica

O interesse em desenvolver outras técnicas de reprodução assistida em equinos tem aumentado drasticamente, pois os proprietários não estão dispostos a aceitar as falhas de um programa de transferência convencional e exigem abordagens mais sofisticadas de forma a obter um maior número de gestações de éguas idosas ou geneticamente valiosas (Squires et al., 1999).

A superovulação de dadoras e a criopreservação de embriões são técnicas com um grande potencial para aumentar a eficiência e a flexibilidade de um programa de transferência de embriões. Embora tenham sido feitos avanços consideráveis em ambos os sectores, ainda permanecem muitos aspetos por melhorar (Stout, 2006).

Um dos maiores custos da TE é a manutenção das éguas recetoras quando não há embriões disponíveis para transferência. Isto acontece pois a maioria dos embriões recuperados são provenientes de ovulações simples espontâneas, resultando numa taxa de recolha de embriões de apenas 50% por tentativa. Um método que pode diminuir substancialmente o custo da manutenção das recetoras é o aumento do número de embriões recuperados por dadora através da indução de múltiplas ovulações (Squires, 2005).

Outra vantagem da superovulação é o aumento da taxa de gestação de éguas com fertilidade reduzida, uma vez que se aumenta o número de ovulações, e por via disso, a probabilidade de ocorrer fertilização (Squires et al., 2003).

No entanto, a dificuldade em superovular éguas não permite que a eficiência dos programas de TE seja muito grande, sendo necessário 2 a 3 ciclos para se obter uma gestação. O ideal seria encontrar um protocolo superovulatório que permitisse pelo menos garantir uma gestação por ciclo de cada égua dadora (Losinno & Alvarenga, 2006).

Os problemas encontrados na superovulação estão relacionados com a inconsistência do número de éguas que respondem ao tratamento, o reduzido número de fármacos disponíveis comercialmente, o custo do tratamento e uma possível diminuição da viabilidade de embriões provenientes de múltiplas ovulações (McKinnon & Squires, 2007).

Fármacos como a hormona folículo-estimulante (FSH) suína e a hormona gonadotrófica coriônica equina (eCG) estão disponíveis comercialmente. Embora se tenham obtido bons resultados quando utilizadas em outras espécies, as éguas são bastante refratárias a estas preparações hormonais. Atualmente, as preparações mais indicadas e utilizadas na indução de múltiplas ovulações em éguas são o extrato hipofisário equino (EHE) e mais recentemente a FSH equina purificada (Squires, 2005; Losinno & Alvarenga, 2006; McKinnon & Squires, 2007).

A resposta de éguas cíclicas à eFSH e ao EHE parece depender da população de folículos ováricos no início do tratamento, sendo que o momento ideal para se iniciar um programa de superovulação é o início da onda folicular, antes do aparecimento de um folículo dominante (Losinno & Alvarenga, 2006).

Alguns dos problemas relacionados com o uso destas hormonas são a falha na ovulação dos folículos mesmo quando atingem o tamanho pré-ovulatório e a baixa recolha embrionária por ovulação. Em algumas situações, as éguas ovulam um grande número de folículos, mas a recolha é baixa. Noutros casos, desenvolvem-se inúmeros folículos de grandes dimensões mas nenhum responde à hCG ou à GnRH, sendo por isso necessário desenvolver mais estudos para investigar a causa dos folículos anovulatórios e a reduzida recolha embrionária (Squires, 2005). No entanto, Losinno & Alvarenga (2006) defendem que os protocolos superovulatórios se têm mostrado eficientes em induzir múltiplas ovulações,

sendo o grande problema a recolha embrionária que continua baixa, com uma média de 30 a 40% de embriões por ovulação.

Carmo et al. (2005) demonstraram que em éguas superovuladas ocorre uma alteração na captação dos oócitos para o oviducto. No entanto quando o número de ovulações é menor que três, a taxa de recolha do oócito no oviducto é idêntica à registada nas éguas que não sofreram superovulação. Desta forma, seria importante desenvolver um protocolo que com baixas doses de eFSH ou EHE conseguisse induzir um menor número de ovulações e consequentemente aumentasse a recolha de embriões (Losinno & Alvarenga, 2006).

Idealmente, o pretendido seria então a recolha de um embrião a cada duas ovulações e sem incorrer em custos exagerados, utilizando tratamentos curtos de três a quatro dias ou com baixas doses, minimizando a quantidade de preparações hormonais utilizadas. Isto também porque a maioria dos criadores não está interessada na obtenção de quatro ou cinco embriões provenientes de uma determinada combinação égua-garanhão, ficando satisfeitos com a obtenção de um ou dois embriões por ciclo, podendo desta maneira mudar o garanhão no ciclo subsequente, obtendo combinações genéticas diferentes dentro de uma determinada estação reprodutiva (Squires, 2005).

Relativamente à criopreservação de embriões, esta apresenta algumas vantagens que poderiam melhorar a eficiência dos programas de TE (Stout, 2006). Como vantagens da criopreservação temos:

- Armazenamento por tempo indefinido de embriões de elevado valor genético;
- Redução do número de recetoras necessário num programa de TE, pois os embriões podem ser recolhidos, congelados e transferidos apenas quando uma recetora estiver disponível;
- Transporte de embriões sem que seja necessário haver recetoras sincronizadas para receber o embrião;
- Transporte internacional de embriões, uma vez que é bastante mais barato que o transporte de um animal vivo;
- Embriões recolhidos no meio ou final de uma época de reprodução podem ser congelados e transferidos apenas no início de outra época, isto quando é necessário obter poldros logo no início do ano.

No entanto, esta tecnologia está pouco desenvolvida quando comparada com outras utilizadas na transferência de embriões (McKinnon & Squires, 2007). Apenas alguns embriões são criopreservados e depois transferidos (Squires, 2005; McCue, 2009b). Isto pode estar relacionado em parte com a falta de aplicabilidade, devido à dificuldade em superovular as dadoras e recolher múltiplos embriões, e com a dificuldade em criopreservar embriões de grandes dimensões (Squires, 2005; McKinnon & Squires, 2007). A dificuldade em criopreservar embriões de grande dimensão parece estar relacionada com a baixa permeabilidade do blastocisto aos crioprotetores devido à presença de uma cápsula nos

embriões equinos (Squires et al., 1999; McCue, 2009b). Contudo embriões de pequenas dimensões são mais difíceis de recolher e a janela temporal para tal é muito reduzida pois eles atingem o útero entre o dia 5 e 6 pós-ovulação e ao 7º dia aumentam drasticamente o seu tamanho, pelo que tem de ser feita a colheita no dia 6 (McKinnon & Squires, 2007; McCue, 2009b). Outra técnica que também tem sido utilizada é a vitrificação, mas também apresenta melhores resultados em embriões de pequenas dimensões (mórulas e jovens blastocistos) com taxas de gestação rondando os 75% (Squires, 2005).

Desta forma, torna-se imperativo contornar estes obstáculos e continuar as investigações até aqui efetuadas, para que se possa tirar total partido das vantagens apresentadas por esta técnica (McCue, 2009b).

## IV Trabalho experimental

Para maximizar o sucesso de um programa comercial de transferência de embriões é importante identificar os fatores que afetam a recolha embrionária, a taxa de gestação e a morte embrionária, de forma a minimizar aqueles que possam comprometer o sucesso do programa. Contudo, quando se trata de um programa comercial de transferências nem todos os fatores podem ser controlados, principalmente aqueles que se prendem com os reprodutores, como a idade e o estatuto reprodutivo da égua dadora ou a qualidade do sêmen utilizado, uma vez que são impostos pelos proprietários dos animais.

Este trabalho experimental foi realizado na Central Equina de Reprodução, situada no Estado de São Paulo, Brasil. Foi efetuado um estudo retrospectivo, que teve como objetivo avaliar a influência de alguns fatores na eficiência de um programa comercial de transferência de embriões. Esta avaliação incidiu sobretudo em fatores passíveis de controlar pelo técnico responsável pelo programa, de forma a melhorar os resultados futuros. No entanto, nem todos os fatores pretendidos foram avaliados, pois uma vez que se trata de um estudo retrospectivo nem todos os dados estavam disponíveis.

Neste estudo foram então utilizados os dados relativos a 2086 recolhas efetuadas e a 1090 transferências de embrião, em duas épocas reprodutivas consecutivas (2010-2011 e 2011-2012).

### 1. Material e métodos

#### 1.1 Animais e manejo

Das 2086 recolhas embrionárias registadas, 836 foram efetuadas na Central Equina de Reprodução, tendo as restantes 1250 sido feitas em coudelarias que solicitavam os serviços prestados pela CER, sendo os embriões depois transportados para a Central. Todos os embriões recolhidos foram transferidos, num intervalo máximo de 8h entre a recolha e a transferência, para recetoras que se encontravam na CER.

Foram recolhidos embriões de 726 éguas dadoras pertencentes a diversas raças, entre elas, Puro Sangue Lusitano (PSL), Puro Sangue Árabe (PSA), Quarto de Milha (QM), Brasileiro de Hipismo (BH), Crioulo (CR) e Paint-Horse (PH). Alguns animais encontravam-se em regime extensivo outros em intensivo, sendo o regime alimentar definido pelo proprietário dos mesmos. Embora o controlo folicular e a inseminação artificial fossem efetuados por três médicos veterinários diferentes, todos eles seguiam o mesmo protocolo.

As éguas foram controladas através de palpação e ecografia transrectal dos órgãos genitais internos, sendo a ovulação induzida quando um folículo de diâmetro igual ou superior a

35mm era encontrado. A ovulação foi induzida com 1700UI de hCG por via endovenosa (Vetecort® ou Chorulon®) e 1mg deslorelina por via intramuscular (BioRelease® Deslorelin). Caso a inseminação fosse com sémen refrigerado, era efetuada 24h após a indução da ovulação e 24h depois da inseminação era feito novo controlo ecográfico para confirmação da ovulação. No caso de ser utilizado sémen congelado, o primeiro controlo ecográfico era feito 24h depois da indução da ovulação e eram avaliados diversos parâmetros, como a consistência e o tamanho do folículo e o edema uterino. Os intervalos entre os controlos seguintes eram definidos consoante os parâmetros avaliados. No entanto, a maioria das ovulações ocorreu depois das 36h pós-indução. Assim que era detetada a ovulação, as éguas eram inseminadas.

Todas as éguas foram novamente avaliadas 24h depois de terem sido inseminadas. Quando era identificada a presença de líquido no útero eram administradas 20UI de ocitocina (Ocitocina Forte UCB® ou Placentex®) por via endovenosa, duas vezes ao dia e se necessário, também eram feitas lavagens uterinas com Lactato de Ringer, consoante a quantidade de líquido e a história reprodutiva da dadora, sendo este procedimento prolongado no máximo até 4 dias após a ovulação. De acordo com a história reprodutiva da dadora e com o tipo de líquido recolhido na lavagem uterina (com sinais de inflamação) podia ser adicionado ao Lactato de Ringer, peróxido de hidrogénio ou antibiótico (normalmente ampicilina ou ceftiofur devido ao seu largo espectro). Sempre que era diagnosticada fisómetra, a vulva era parcialmente suturada com agrafos, que apenas eram retirados no dia da recolha do embrião.

As recolhas foram maioritariamente efetuadas ao dia 7 ou 8 pós-ovulação, sendo o dia 0 (D0) o dia da ovulação. No entanto, quando o sémen utilizado na IA era congelado ou as dadoras eram idosas o dia escolhido para a recolha era o D9.

Figura 6: Recolha embrionária e material necessário para a recolha.



Os embriões foram recolhidos por dois técnicos diferentes, através da técnica transcervical. A zona perineal da égua dadora foi lavada com uma solução iodada e seca posteriormente. O cateter de Foley foi introduzido no útero com o máximo de assepsia possível, e as lavagens foram feitas com Lactato de Ringer aquecido a 37°C. Foram feitas no máximo 4 lavagens uterinas, sendo o procedimento interrompido quando o embrião era visualizado no filtro de recolha. Após a recolha dos embriões foram administrados, por via intramuscular, 5mg de dinoprost (prostaglandina) (Lutalyse®) à égua dadora.

Depois de recolhido, o embrião foi lavado com Lactato de Ringer, identificado e classificado à lupa com uma ampliação de 10 e 40x respetivamente. Depois foi novamente lavado, desta vez com meio de manutenção de embriões (Holding Plus 0,4% BSA®). Se a recetora se encontrasse no mesmo local, este era colocado na palhinha de transferência ou na pipeta de inseminação, consoante o seu tamanho, e transferido. No caso de ter que ser transportado, era colocado num tubo contendo meio de manutenção e armazenado num contentor apropriado (BotuFlex®) a uma temperatura de 20°C até ser transferido. O intervalo de tempo entre a recolha e a transferência nunca ultrapassou as 8h.

Figura 7: Embrião recolhido no dia 8 pós-ovulação e manipulação do mesmo.

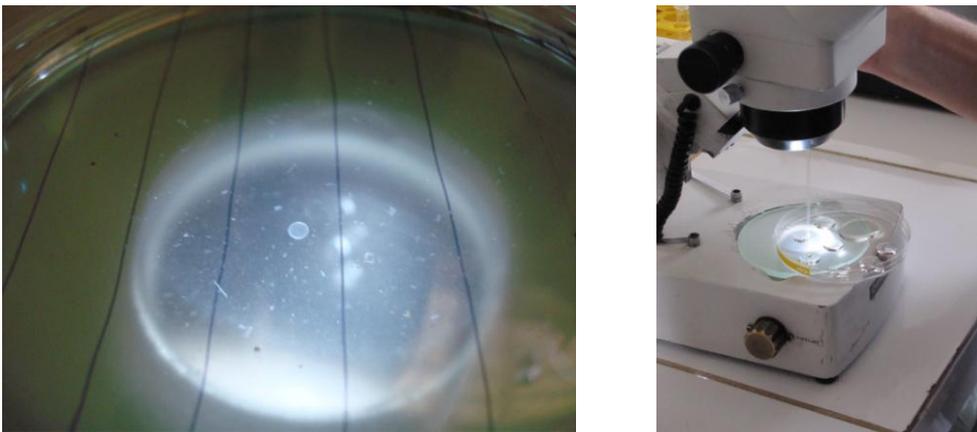


Figura 8: Material utilizado na manipulação e transferência de embriões e embrião numa palhinha para transferência.



No que diz respeito às recetoras, estas foram avaliadas no momento da compra relativamente à idade, conformação da genitália externa, características uterinas e cervicais. Só foram aceites recetoras com uma idade estimada entre os 6 e os 10 anos. A idade foi estimada através da dentição, não sendo por isso muito rigorosa. Além disso, era imperativo apresentarem uma boa conformação da genitália externa e ausência de anomalias no aparelho reprodutor, como grandes quistos uterinos ou massas nos ovários.

Depois de aceites no programa de transferência, as éguas foram colocadas em pastagem sendo a alimentação reforçada com um alimento concentrado energético. O número de éguas controladas diariamente variava em função do número de recolhas agendadas.

Nas éguas que apresentavam ciclicidade ovárica era feito um controlo regular (em dias alternados), e caso fosse necessário, em éguas que apresentavam corpo lúteo, administrava-se 10mg de dinoprost por via intramuscular (Lutalyse®) para antecipar o estro. Sempre que era detetado edema uterino e um folículo com diâmetro igual ou superior a 35mm era induzida a ovulação com 1mg de deslorelina por via intramuscular (BioRelease® Deslorelin) e 1700UI de hCG (Vetecort® ou Chorulon®) por via endovenosa. As éguas eram então utilizadas principalmente entre o 3º e o 8º dia após a ovulação.

O número de éguas recetoras disponíveis por dia era sempre superior ao número de recolhas agendadas. Em função do número de embriões recolhidos no dia, todas as éguas que se encontrassem entre o 3º e o 8º dia pós-ovulação eram novamente sujeitas a palpação e ecografia transrectais e eram avaliados diversos parâmetros, sendo escolhidas aquelas que apresentassem melhor tônus uterino e cervical, útero mais ecogénico e homogéneo e corpo lúteo mais definido. Éguas com pneumovagina ou presença de fluido no útero não eram selecionadas.

Sempre que o número de éguas cíclicas não fosse suficiente, eram utilizadas éguas em anestro suplementadas com progesterona. Era administrado um estrogénio, 5mg/dia de benzoato de estradiol por via intramuscular (Estrogin®) e ao fim de três dias, se houvesse edema uterino eram administradas, por via intramuscular, 1500mg de P4 de longa ação (BioRelease® P4 LA 300). O dia da administração de P4 era considerado o D0 exatamente igual ao D0 das éguas cíclicas, sendo que, a partir daí o procedimento era o mesmo para ambos os grupos, com ciclicidade ovárica e em anestro, utilizando-se éguas entre o D3 e D8. A única diferença ocorria após a transferência do embrião, pois nas éguas em anestro era administrada P4 de longa ação de 7 em 7 dias até aos 120 dias de gestação.

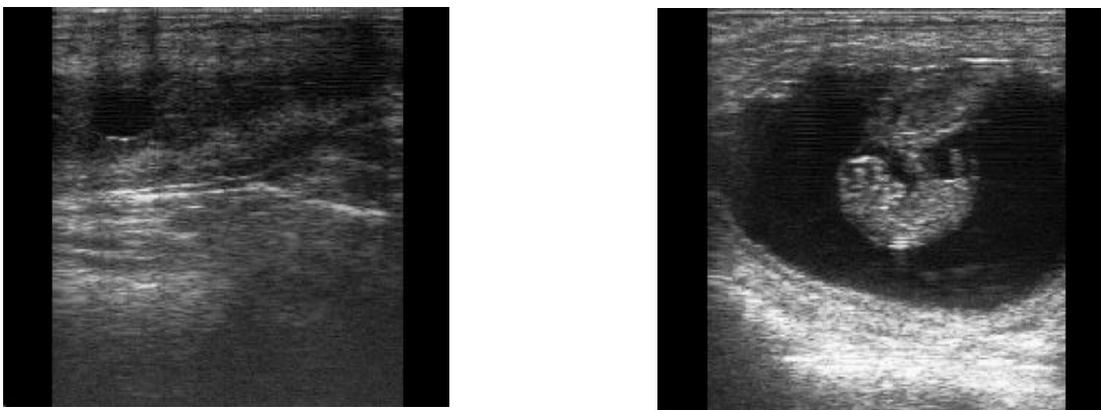
Todas as recetoras foram tranquilizadas com 4mg de acepromazina (Acepran 0,2%®) antes da transferência do embrião, de forma a evitar traumatismos no canal cervical. Caso fosse difícil ultrapassar o cérvix, utilizava-se outra recetora ou era administrado 0,5g de flunixinina meglumina (Desflan®) para evitar uma resposta inflamatória.

Figura 9: Higienização da recetora e transferência do embrião.



O diagnóstico de gestação nas recetoras foi feito aos 14 dias de idade do embrião. Se fosse positivo era novamente efetuado aos 25 dias para verificação da existência de batimento cardíaco e depois aos 45 dias, antes da recetora ser transportada para a casa do proprietário.

Figura 10: Diagnóstico de gestação aos 14 e 45 dias.



## 1.2 Análise estatística

Os dados obtidos nas 2086 recolhas de embrião foram registados numa base de dados em Microsoft Excel® e depois importados para o programa *R Development Core Team*® (The R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. 2012). No entanto, foram verificadas algumas falhas na recolha da informação, não sendo possível ter todos os dados de todas as recolhas.

Uma vez que todas as variáveis analisadas eram qualitativas, foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, e tabelas de contingência 2 x 2. As diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Ver Anexos 1 e 2).

O objetivo desta análise foi identificar as variáveis que podiam ser controladas pelo técnico envolvido no programa de transferência e que podem influenciar a taxa de recolha embrionária, a taxa de gestação e a taxa de morte embrionária. No entanto, uma vez que se trata de um estudo retrospectivo nem todos os dados pretendidos estavam disponíveis, tendo sido por isso apenas analisados alguns fatores, que estão descritos nas tabelas 2 e 3.

A taxa de recolha embrionária foi definida como o número de embriões recolhidos sobre o total de recolhas efetuadas. A taxa de gestação aos 14 e aos 45 dias foi definida para cada fator como o número de animais gestantes sobre o número total de animais que apresentavam essa informação. A taxa da morte embrionária foi encontrada através da diferença entre a gestação aos 45 dias e a gestação aos 14 dias.

Tabela 2: Variáveis analisadas com eventual influência na taxa de recolha embrionária.

Época reprodutiva	2010-2011 ou 2011-2012
Dia da recolha	Entre os 5 e 11 dias após a ovulação
Tipo de sémen utilizado na IA	Refrigerado ou Congelado
Raça	BH, CR, PH, PSL, PSA, QM

Tabela 3: Variáveis analisadas com eventual influência nas taxas de gestação e de morte embrionária.

Época reprodutiva	2010-2011 ou 2011-2012
Ciclicidade das recetoras	Cíclicas ou acíclicas
Idade do embrião no dia da TE	Entre os 6 e 10 dias de idade
Dia pós-ovulação da recetora no dia da TE	Entre os 3 e 9 dias pós-ovulação

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1 Variáveis com eventual influência na recolha embrionária

#### 2.1.1 Época reprodutiva

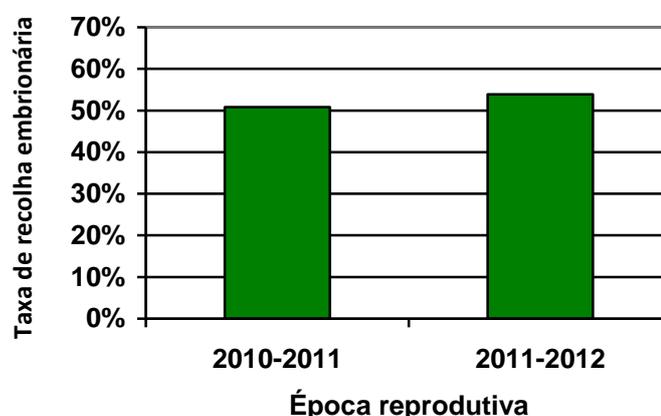
Embora na época reprodutiva de 2011-2012 a taxa de recolha embrionária tenha sido superior (53,9%), não foram registadas diferenças entre as duas épocas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). Em ambas, a taxa encontra-se entre os valores referidos noutros estudos, como os de Fleury et al. (2001), Peres et al. (2002) e Hudson & McCue (2004) onde foram reportadas taxas de recolha embrionária de 60,1%, 62% e 43,5% respetivamente. Estes valores podem ser considerados aceitáveis uma vez que a média de embriões recolhidos por ciclo é de 50% (Squires et al., 2003).

Tabela 4: Taxa de recolha embrionária em função da época reprodutiva.

Época reprodutiva	Recolha embrionária
2010-2011	50,8% (556/1094)
2011-2012	53,9% (534/991)

Embora os reprodutores não tivessem sido exatamente os mesmos nas duas épocas de cobrição, os procedimentos para a recolha dos embriões bem como o maneo dos animais não sofreram alterações de uma época para a outra, não havendo diferença nos resultados obtidos. Além disso, as condições meteorológicas foram idênticas em ambos os anos (não sendo atípicos para a região), não influenciando assim, negativamente a época reprodutiva.

Gráfico 1: Taxa de recolha embrionária em função da época reprodutiva.



## 2.1.2 Dia da recolha

O dia em que a recolha foi efetuada, por si só, teve uma influência significativa ( $p < 0,05$ ) na taxa de recolha embrionária. As taxas de recolha embrionária mais altas ocorreram no dia 7 e 8 pós-ovulação (53,6% e 56,1% respetivamente), sendo que os valores mais baixos foram registados nos dias 5 e 11 pós-ovulação (0% em ambos) (Tabela 5). No entanto, o número de recolhas no D5 e D11 foi bastante reduzido, tendo sido efetuadas estas recolhas em éguas problema, o que pode ter influenciado o resultado.

Tabela 5: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha.

Dia da recolha	Recolha embrionária
5	0% (0/2)
6	50,0% (20/40)
7	53,6% (283/528)
8	56,1% (592/1056)
9	44,4% (184/414)
10	33,3% (8/24)
11	0% (0/1)

Contrariamente ao encontrado neste estudo, em que as diferenças foram significativas, estudos anteriores como os de Jacob et al. (2012) referem apenas uma tendência para o aumento da taxa de recolha embrionária nas recolhas efetuada ao 8º dia pós-ovulação. Fleury e Alvarenga (1999) registaram taxas de recolha embrionária de 49,3%, 58,0% e 54,5% nos dias 7, 8 e 9 respetivamente e Jacob et al. (2012) taxas de 42%, 61%, 66%, 59% e 56% nos dias 6, 7, 8, 9 e 10 respetivamente. No entanto, Peres et al. (2002) registaram uma taxa de recolha superior no D9 (72%) quando comparada com as encontradas nos dias 6, 7 e 8.

Neste estudo, foi registada uma taxa de recolha de 0% em recolhas efetuadas no dia 5 e uma taxa de 50% em recolhas efetuadas no dia 6. Estes resultados podem estar relacionados com a presença do embrião ainda no oviducto, uma vez que este apenas atinge o útero entre o dia 5 e 6 pós-ovulação, ou com uma falha na recolha devido à maior gravidade específica do embrião nestes dias (McKinnon & Squires, 2007; Pycock, 2007).

As baixas taxas registadas nos dias 9, 10 e 11 (44,4%, 33,3% e 0% respetivamente) não são concordantes com os estudos já mencionados, pois embora estes embriões sejam mais suscetíveis a sofrerem danos durante a recolha, a sua taxa de recolha não tem sido muito diferente da registada no dia 8. No entanto, neste estudo, esta diferença pode estar relacionada com o facto de, das 439 recolhas efetuadas nestes dias, 318 terem sido feitas

em éguas que tinham sido inseminadas com sémen congelado, sendo sabido que as taxas de fertilização são menores para sémen congelado quando comparadas com as taxas registadas para sémen fresco ou refrigerado (Samper et al., 2007). Além disso, quando analisadas separadamente, consoante o tipo de sémen utilizado (Gráfico 2), verifica-se que as diferenças entre os dias não são tão acentuadas, registando-se taxas de recolha embrionária no dia 8, 9 e 10 de 57,3%, 51,5% e 50% respetivamente, em éguas inseminadas com sémen refrigerado (SR) e de 47,4%, 42,1% e 30% respetivamente, em éguas inseminadas com sémen congelado (SC) (Tabela 6 e 7).

Quando efetuada uma regressão logística, para analisar o efeito destes dois parâmetros em simultâneo na recolha embrionária, verificou-se que apenas o tipo de sémen tem uma influência significativa ( $Pr (>|z|) 0.00128$ ).

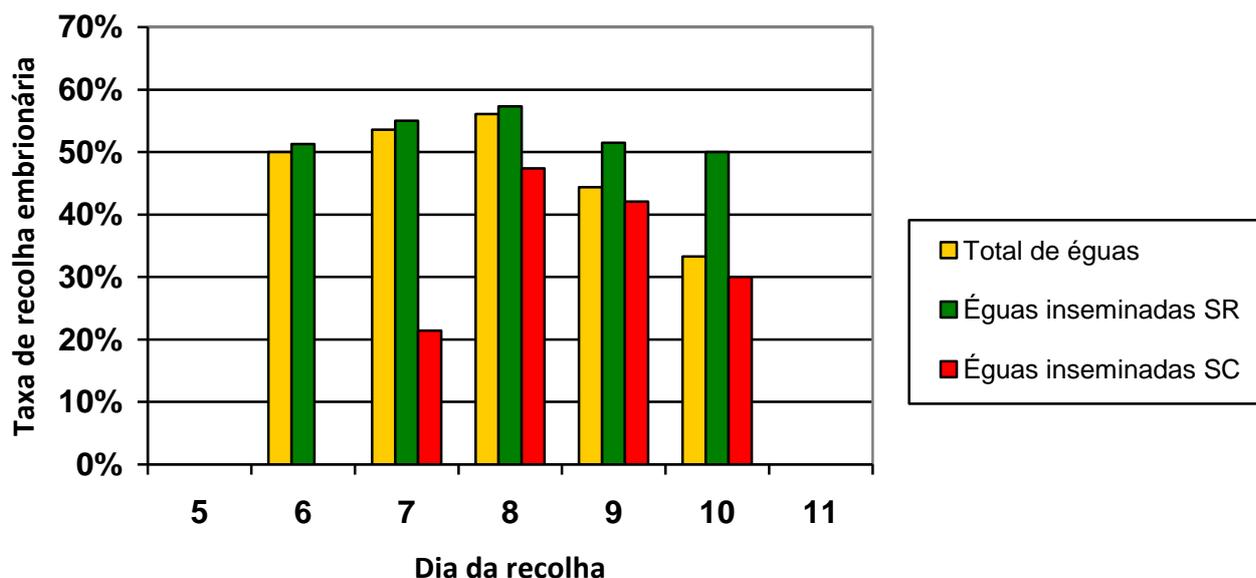
Tabela 6: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha para éguas inseminadas com sémen refrigerado.

Dia da recolha	Recolha embrionária
5	0% (0/1)
6	51,3% (20/39)
7	55,0% (270/491)
8	57,3% (501/875)
9	51,5% (53/103)
10	50,0% (2/4)
11	-

Tabela 7: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha para éguas inseminadas com sémen congelado.

Dia da recolha	Recolha embrionária
5	0% (0/1)
6	Na
7	21,4% (3/14)
8	47,4% (55/116)
9	42,1% (125/297)
10	30,0% (6/20)
11	0% (0/1)

Gráfico 2: Taxa de recolha embrionária em função do dia da recolha.



Além do sémen, teria sido também interessante relacionar a idade da dadora com o dia da recolha e ver a sua influência na taxa de recolha embrionária, uma vez que em éguas idosas as recolhas também eram efetuadas maioritariamente no dia 9 pós-ovulação. Isto porque, como já foi dito anteriormente, em éguas idosas o desenvolvimento e o transporte embrionário através do oviducto podem ser mais demorados que o normal (Squires et al., 1999; McKinnon & Squires, 2007; Cuervo-Arango et al., 2009). Contudo estes dados não estavam disponíveis.

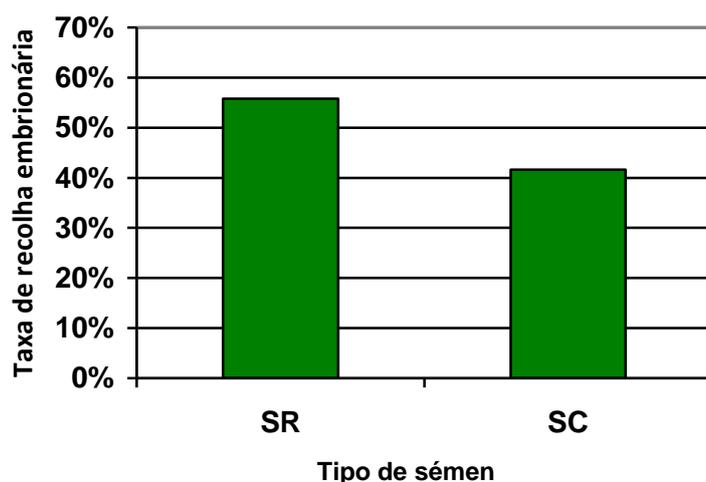
### 2.1.3 Tipo de sémen utilizado na inseminação artificial

O tipo de sémen utilizado na IA teve uma influência significativa ( $p < 0,05$ ) na taxa de recolha embrionária, sendo superior nas éguas inseminadas com sémen refrigerado (Tabela 8).

Tabela 8: Taxa de recolha embrionária em função do tipo de sémen utilizado na IA.

Tipo de sémen	Recolha embrionária
Refrigerado	55,8% (848/1520)
Congelado	41,6% (190/457)

Gráfico 3: Taxa de recolha embrionária em função do tipo de sémen utilizado na IA.



A taxa de recolha embrionária em éguas inseminadas com sémen refrigerado foi de 55,8%, sendo que a de éguas inseminadas com sémen congelado foi de apenas 41,6%. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriormente efetuados, uma vez que a probabilidade de produzir um embrião viável é menor em éguas inseminadas com sémen congelado (Squires et al., 2003). Sieme et al. (2003) registaram uma percentagem de 53,9% de embriões recolhidos em éguas inseminadas com sémen refrigerado e uma percentagem de apenas 44% em éguas inseminadas com sémen congelado.

Mesmo quando é possível controlar todos os fatores que influenciam as taxas de gestação em éguas inseminadas com sémen congelado, esta é sempre mais reduzida, bem como a taxa de fertilização, pois a qualidade do sémen também o é, devido ao processo de congelação/descongelação. O ideal, quando se utiliza este tipo de sémen, seria a utilização de éguas férteis e reprodutivamente saudáveis bem como um controlo adequado durante o estro, reduzindo ao máximo o intervalo de tempo entre a inseminação e a ovulação, já que o tempo de vida e a motilidade dos espermatozoides tende a ser menor no sémen congelado (Samper, 2001; Loomis & Squires, 2005; Metcalf, 2007; Samper et al., 2007; Miller, 2008). No entanto, como se trata de um programa comercial de transferência de embriões, nem todas as situações são ideais e muitas delas não podem ser controladas pelos técnicos que efetuam as transferências. Embora não tenham sido registados os valores exatos, foram utilizadas éguas idosas, subférteis, sémen de pior qualidade ou que não respondia bem ao processo de congelação/descongelação, apresentando uma motilidade reduzida após descongelação, o que provavelmente também influenciou os resultados obtidos.

## 2.1.4 Raça

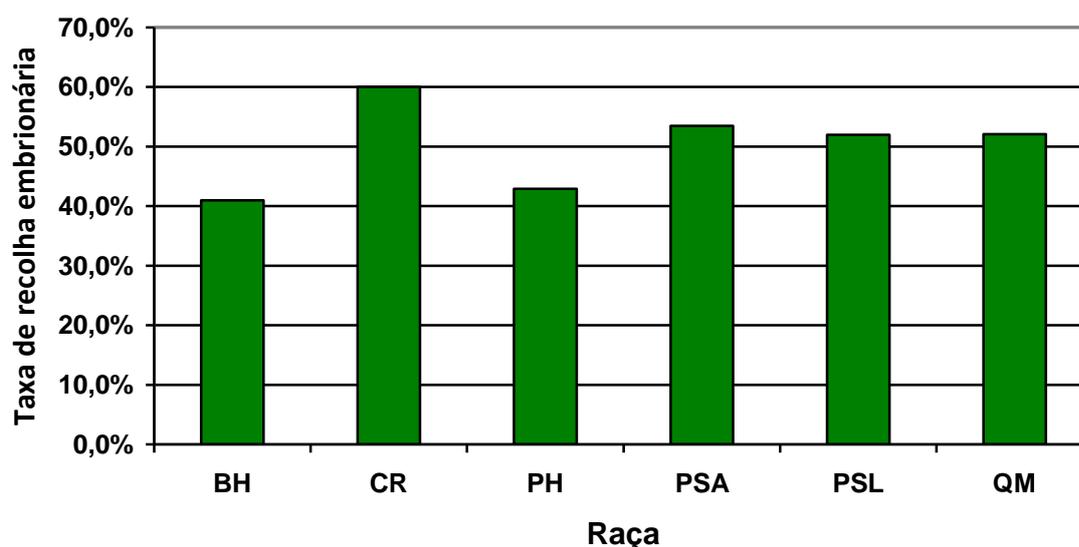
A raça da égua dadora não teve uma influência significativa na taxa de recolha embrionária ( $p > 0,05$ ).

Tabela 9: Taxa de recolha embrionária em função da raça da égua dadora.

Raça	Taxa de recolha embrionária
Brasileiro de Hipismo	41,0% (32/78)
Crioulo	60,0% (3/5)
Paint-Horse	42,9% (3/7)
Puro Sangue Árabe	53,5% (432/807)
Puro Sangue Lusitano	52,0% (104/200)
Quarto de milha	52,1% (510/978)

Uma vez que o centro de reprodução trabalha com diversas raças, era interessante avaliar se estas tinham uma influência na taxa de recolha embrionária. No entanto, tal não aconteceu, demonstrando que a recolha embrionária é idêntica em qualquer uma delas (Tabela 9), sendo por isso a transferência de embriões uma opção válida para todas as raças analisadas.

Gráfico 4: Taxa de recolha embrionária em função da raça da égua dadora.



## 2.2 Variáveis com eventual influência na taxa de gestação e de morte embrionária

### 2.2.1 Época reprodutiva

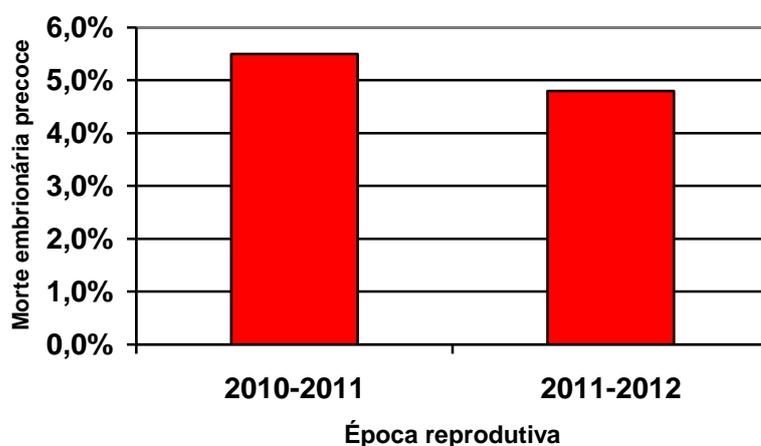
No que diz respeito à época reprodutiva, no ano de 2011-2012 houve uma taxa de gestação tanto aos 14 como aos 45 dias significativamente superior às taxas verificadas no ano de 2010-2011 ( $p < 0,05$ ). No entanto, embora a morte embrionária (ME) também tenha sido mais reduzida neste último ano, as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 10).

Tabela 10: Taxa de gestação e de morte embrionária em função da época reprodutiva.

Época reprodutiva	Gestação 14D	Gestação 45D	ME
2010-2011	76,0% (422/555)	71,9% (399/555)	5,5% (23/422)
2011-2012	81,8% (437/534)	77,9% (416/534)	4,8% (21/437)

Em ambas as épocas, a taxa de morte embrionária pode ser considerada como um bom resultado quando comparada com as descritas na literatura. Carnevale et al. (2000) registaram taxas de 15,5% e Duarte et al. (2002), taxas de 8,53%. Já Vanderwall (2008) recolheu dados de 28 estudos anteriores entre o ano de 1982 e 2007 e avaliou a taxa de perda embrionária, a qual variou bastante, situando-se entre 2,6% e 24%. Contudo, apenas em 6 destes estudos a taxa de perda embrionária se situou abaixo dos 6%.

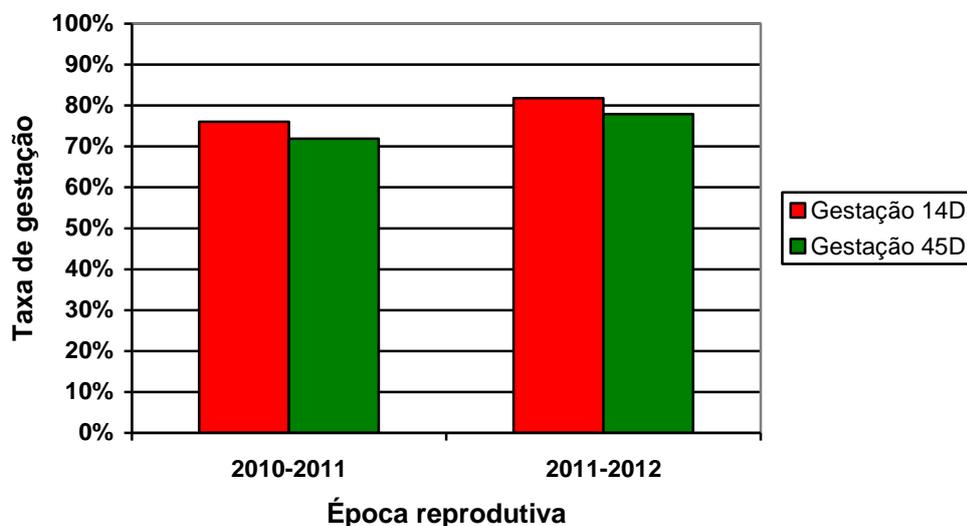
Gráfico 5: Taxa de morte embrionária em função da época reprodutiva.



Relativamente às taxas de gestação, embora estas tenham sido diferentes, ambas se situam dentro, ou mesmo acima, dos valores reportados na literatura. Carnevale et al. (2000) referem taxas de gestação de 67,8% e 57,6% aos 14 e 50 dias de gestação respetivamente. Fleury et al. (2001) e McKinnon e Squires (2007) referem taxas de gestação aos 15 dias de 74,8% e 75% respetivamente e Lopes et al. (2011) registaram taxas de gestação de 73,4% aos 15 dias e de 66,7% aos 45 dias de gestação. Estes bons resultados provavelmente estão relacionados com as diversas medidas tomadas neste programa de transferências, como uma seleção adequada das recetoras, uma manipulação correta dos embriões, uma execução cuidada da técnica, procurando sempre o máximo de assepsia, tranquilização da recetora no momento da transferência, de forma a evitar traumatismos no canal cervical e tratamento com anti-inflamatórios não esteroides em recetoras onde a transferência seja mais difícil.

As diferenças encontradas na taxa de gestação nas duas épocas não aparentam estar relacionadas com a técnica nem com as condições meteorológicas, pois ambas foram idênticas nos anos analisados. No entanto, podem estar relacionadas com as características das recetoras e com os próprios embriões. Uma vez que as recetoras utilizadas nas duas épocas não foram exatamente as mesmas e as características uterinas das mesmas não foram registadas, estes dois parâmetros podem ter influenciado a diferença nas taxas de gestação. O mesmo se pode afirmar em relação ao embrião, uma vez que não foram registados dados, que à partida poderiam influenciar a taxa de gestação, como a morfologia, estadio de desenvolvimento e o tamanho (Carnevale et al., 2000; Squires et al., 2003). Estes parâmetros podem ter sido diferentes nas duas épocas, influenciando assim as taxas de gestação.

Gráfico 6: Taxa de gestação em função da época reprodutiva.



## 2.2.2 Idade do embrião no dia da transferência

A idade do embrião no dia da transferência não influenciou significativamente a taxa de gestação nem a taxa de morte embrionária ( $p > 0,05$ ). Embora a taxa de gestação tenha sido superior no dia 6 e inferior no dia 10, o número de embriões transferidos com esta idade foi muito reduzido não podendo ser a diferença considerada significativa. O mesmo acontece com a taxa de morte embrionária para embriões transferidos com 10 dias de idade. Embora esta tenha sido de 20%, a diferença também não foi significativa, o que pode ser atribuído ao facto de o número de gestações aos 14 dias para embriões desta idade ter sido de apenas 5 (Tabela 11).

Tabela 11: Taxa de gestação e de morte embrionária em função da idade do embrião no dia da transferência.

Idade embrião	Gestação 14D	Gestação 45D	ME
6	90,0% (18/20)	85,0% (17/20)	5,6% (1/18)
7	78,8% (223/283)	74,2% (210/283)	5,8% (13/223)
8	78,7% (466/592)	75,5% (447/592)	4,1% (19/466)
9	79,8% (146/183)	74,3% (136/183)	6,8% (10/146)
10	62,5% (5/8)	50,0% (4/8)	20,0% (1/5)

Gráfico 7: Taxa de gestação em função da idade do embrião no dia da transferência.

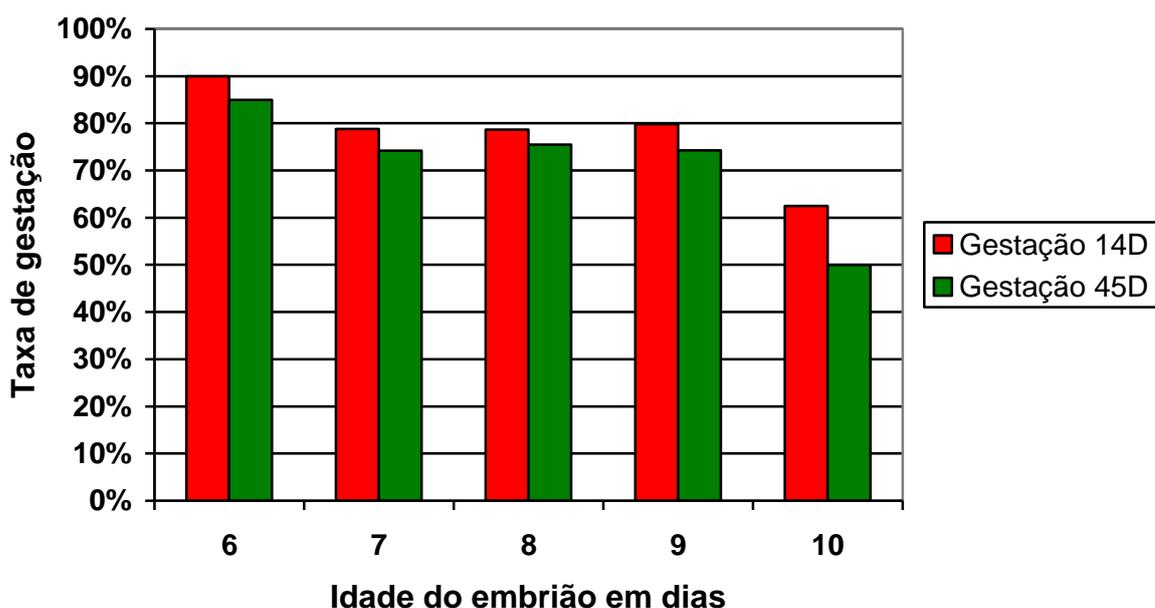
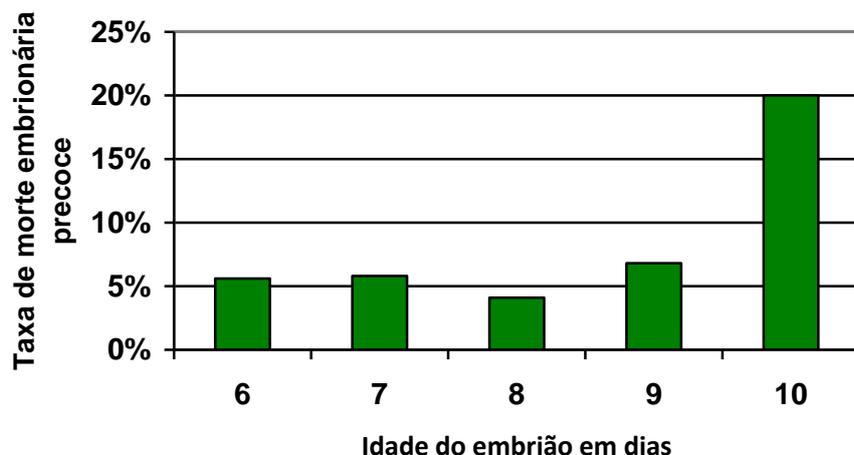


Gráfico 8: Taxa de morte embrionária em função da idade do embrião no dia da transferência.



Os resultados obtidos, estão de acordo com outros estudos anteriormente efetuados, onde também não foram encontradas diferenças significativas, consoante a idade do embrião. Fleury e Alvarenga (1999) registaram taxas de gestação de 74,5%, 74,7% e 76,5% para embriões com 7, 8 e 9 dias de idade respectivamente e Peres et al. (2002) obtiveram taxas de gestação de 64%, 59%, 53% e 64% para embriões com 6, 7, 8 e 9 dias de idade respectivamente.

Contudo, é importante referir que neste estudo, a ausência de diferenças pode não ter sido fruto do acaso, pois a escolha do dia da recolha também não era aleatória. Segundo Carnevale et al. (2000) e Camargo et al. (2008) embriões menores e com estadios de desenvolvimento mais precoces têm menores taxas de gestação e maiores taxas de morte embrionária.

No entanto, nem sempre se pode associar embriões mais jovens a diâmetros menores e estadios menos desenvolvidos ou embriões mais velhos a diâmetros maiores e estadios mais desenvolvidos, pois a relação entre eles pode não ser tão linear, podendo haver atrasos no crescimento e desenvolvimento do embrião.

Segundo Cuervo-Arango et al. (2009), as inseminações pós-ovulatórias dão origem a vesículas embrionárias de menor diâmetro, sendo esta diminuição equivalente a um dia a menos da idade efetiva do embrião. Além disso, quando comparados embriões de éguas idosas com os de éguas mais jovens, o estadio de desenvolvimento do embrião às 36h pós-ovulação e o tamanho do embrião no dia 11 pós-ovulação, são inferiores em éguas idosas (Carnevale et al., 1993).

Isto significa que a idade do embrião no momento da transferência por si só, pode não influenciar a taxa de gestação e a morte embrionária pois deve ser sempre relacionada com o diâmetro e estadio de desenvolvimento do embrião.

Tendo isto em linha de conta, embriões resultantes de inseminações pós-ovulatórias ou provenientes de éguas idosas eram recolhidos mais tardiamente, para que os atrasos no seu desenvolvimento e crescimento não comprometessem as taxas de gestação e de morte embrionária. Desta forma, como neste estudo não foram registados nem o tamanho do embrião nem o estadio em que se encontrava, embriões com idades diferentes poderiam ter tamanhos e estadios de desenvolvimento idênticos e por isso não terem sido encontradas diferenças significativas em ambas as taxas.

### 2.2.3 Ciclicidade da égua recetora

A ciclicidade da égua recetora também não influenciou significativamente as taxas de gestação e de morte embrionária ( $p > 0,05$ ).

Tabela 12: Taxa de gestação e de morte embrionária em função da ciclicidade da égua recetora.

Ciclicidade	Gestação 14D	Gestação 45D	ME
Recetoras cíclicas	79,4% (805/1014)	75,2% (763/1014)	5,2% (42/805)
Recetoras acíclicas	72,0% (54/75)	69,3% (52/75)	3,7% (2/54)

O mesmo foi reportado noutros estudos, como o de Rocha Filho et al. (2004) e Pinna et al. (2006), onde também foram comparadas as taxas de gestação e morte embrionária em recetoras com ciclicidade e em anestro tratadas com progesterona de longa ação. Estes resultados (Tabela 12) demonstram que o facto da progesterona em circulação ter origem exógena não influencia o reconhecimento nem a manutenção da gestação.

Gráfico 9: Taxa de gestação em função da ciclicidade da égua recetora.

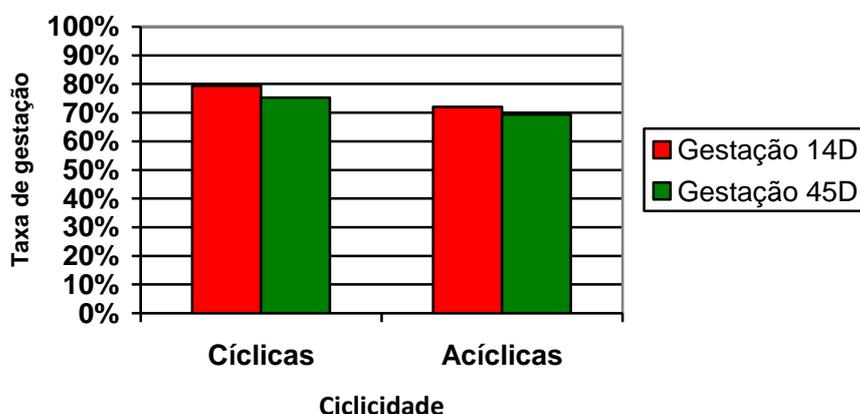
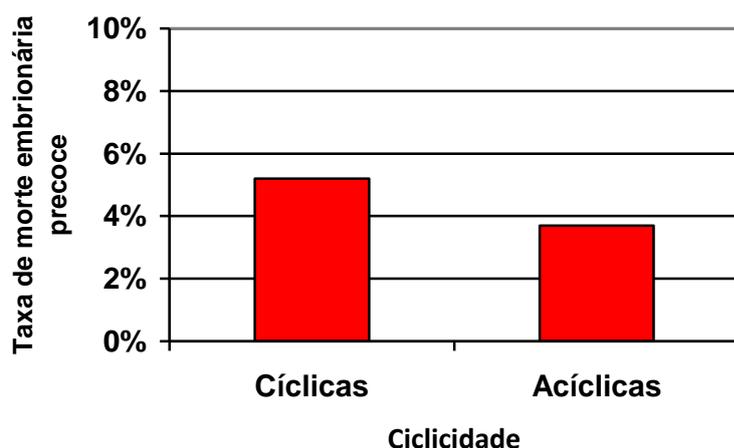


Gráfico 10: Taxa de morte embrionária em função da ciclicidade da égua recetora.



#### 2.2.4 Dia pós-ovulação da égua recetora no dia da transferência embrionária

Embora recetoras entre o 5º e o 7º dia pós-ovulação tenham registado taxas de gestação aos 14 dias superiores, o dia pós-ovulação em que a recetora se encontrava no momento em que recebeu o embrião não influenciou significativamente as taxas de gestação e de morte embrionária ( $p > 0,05$ ) (Tabela 13).

Tabela 13: Taxa de gestação e morte embrionária em função do dia pós-ovulação da égua recetora no dia da TE.

Dia pós-ovulação	Gestação 14D	Gestação 45D	ME
3	70,7% (41/58)	69,0% (40/58)	2,4% (1/41)
4	71,9% (69/96)	68,8% (66/96)	4,3% (3/69)
5	80,7% (176/218)	78,9% (172/218)	2,3% (4/176)
6	79,8% (237/297)	76,1% (226/297)	4,6% (11/237)
7	80,4% (197/245)	73,1% (179/245)	9,1% (18/197)
8	76,6% (59/77)	74,0% (57/77)	3,4% (2/59)
9	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)	0% (0/1)

A ausência de diferenças consoante o dia pós-ovulatório em que a recetora se encontra também foi reportada por Fleury et al. (2001), Fleury et al. (2006) e Jacob et al. (2012). No entanto, outros estudos não encontraram os mesmos resultados. Panzani et al. (2009) encontraram taxas de gestação, aos 40 dias, superiores nas recetoras que se encontravam entre D4 e D7 e Carnevale et al. (2000) registaram perdas de gestação significativamente menores em éguas que se encontravam entre o dia 5 e 6 pós-ovulação (7,3% e 8,6%

respetivamente) quando comparadas com aquelas que se encontravam entre o dia 7 e 9 (22,4%, 15,1%, 30,8% respetivamente). A justificação para estes resultados prende-se, possivelmente, com o facto do reconhecimento materno da gestação ser mais eficiente ou a resposta uterina à manipulação ser mais reduzida quando as recetoras são usadas mais precocemente (Carnevale et al., 2000). Contudo, tal não foi comprovado neste estudo, havendo até uma taxa de gestação tanto aos 14 como aos 45 dias superior para recetoras que se encontravam entre o 5º e o 8º dia pós-ovulação.

Porém, é importante referir que existem outros fatores relacionados com as recetoras que devem ser tidos em conta, como por exemplo as características do útero, cérvix e corpo lúteo no momento da transferência. Embora a maioria das éguas que receberam embrião tenha sido considerada como “aceitável” relativamente a estas características (bom tónus uterino e cervical, útero homogéneo e ecogénico, corpo lúteo bem definido e ausência de fluído ou pneumo-útero), estes dados não foram registados, não sendo por isso possível avaliar a sua influência na taxa de gestação e morte embrionária.

Gráfico 11: Taxa de gestação em função do dia pós-ovulação da égua recetora no dia da TE.

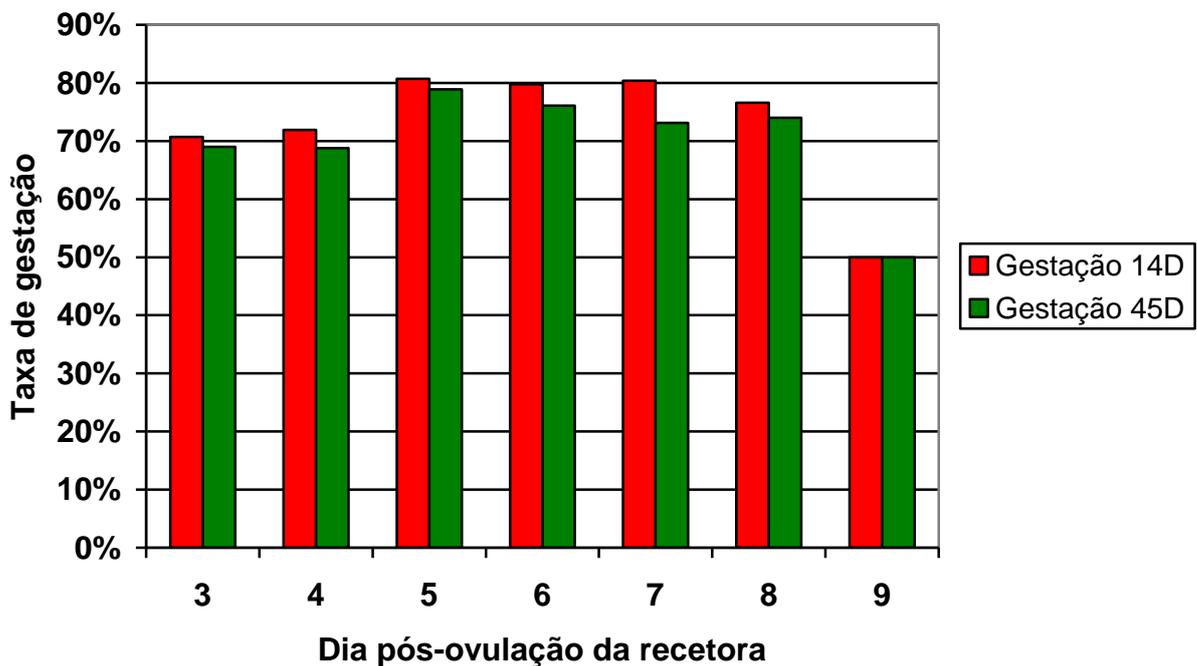
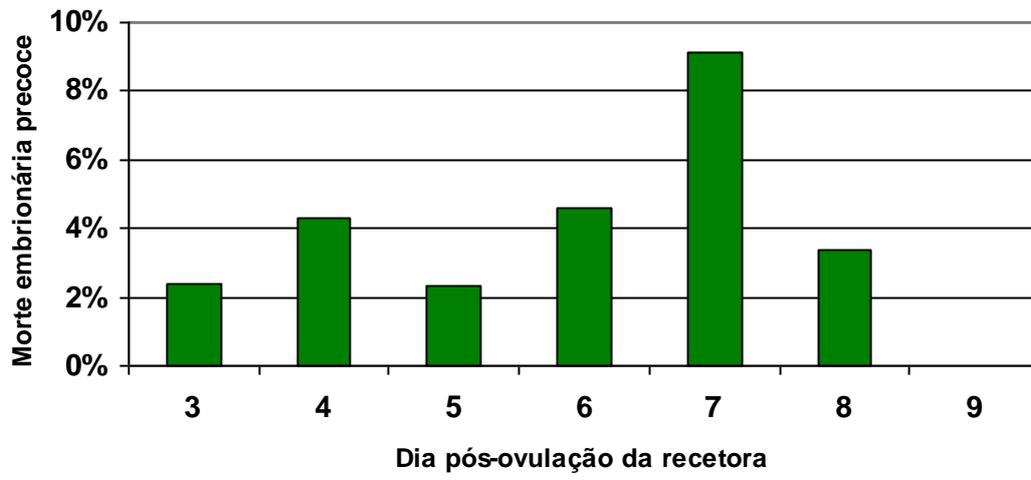


Gráfico 12: Taxa de morte embrionária em função do dia pós-ovulação da égua recetora no dia da TE.



### 3. Conclusão

No presente trabalho, foi possível concluir que existem algumas variáveis que influenciam significativamente o sucesso de um programa comercial de transferência embrionária.

Relativamente aos fatores analisados que poderiam afetar a taxa de recolha embrionária, verificou-se que apenas o tipo de sémen (refrigerado ou congelado) tem uma influência significativa, sendo a taxa de recolha menor para éguas inseminadas com sémen congelado. Este facto é de extrema importância e deve ser tido em consideração num programa de TE. Além de exigir um controlo mais rigoroso da dinâmica folicular, do momento da ovulação e da inseminação artificial, é um fator que deve ser sempre comunicado aos proprietários dos animais, de forma que, sempre que possível, se opte por um sémen fresco ou refrigerado, aumentando assim a probabilidade de recolha embrionária. O dia da recolha por si só, teve uma influência estatisticamente significativa na recolha embrionária. No entanto, uma vez que a escolha do dia não era aleatória, sendo influenciada pelo tipo de sémen utilizado na inseminação artificial e pela idade da dadora, não é possível retirar conclusões deste resultado. Quando relacionado com o tipo de sémen utilizado, este fator deixa de ser relevante, no entanto, teria sido importante relacioná-lo também com a idade da dadora.

Teria sido também bastante interessante avaliar se a idade da dadora e a sua história reprodutiva tinham ou não influência na taxa de recolha embrionária, no entanto, esses dados não foram recolhidos, não sendo possível, por isso, a sua análise. Contudo é importante realçar que o objetivo deste estudo foi o de avaliar os fatores que afetam o sucesso de um programa comercial de transferência embrionária, de forma a que, as alterações dos mesmos possam otimizar o programa nos anos seguintes. Embora estes dois fatores não tenham sido analisados, diversas medidas são já tomadas para que a sua influência seja a menor possível. Entre elas, podem-se destacar a recolha embrionária mais tardia em éguas idosas, as lavagens uterinas e antibioterapia em éguas com afeções no trato reprodutivo e as suturas parciais da vulva em éguas com pneumovagina.

No que diz respeito aos fatores com eventual influência nas taxas de gestação e morte embrionária, verificou-se que apenas a época reprodutiva teve uma influência significativa na taxa de gestação, tendo sido superior no ano de 2011-2012. No entanto, em ambas as estações reprodutivas, as taxas podem ser consideradas bastante positivas, estando de acordo e até mesmo acima das reportadas na literatura.

A ciclicidade da recetora (recetoras cíclicas e acíclicas) e o dia pós-ovulação em que esta se encontrava no dia da transferência não afetaram significativamente as taxas de gestação nem de morte embrionária deste programa comercial de TE. Estes dados são relevantes, pois permitem concluir que as recetoras acíclicas podem ser uma boa opção quando não

existem éguas cíclicas disponíveis e que, quando cíclicas, podem ser utilizadas éguas entre D3 e D8 sem que isso influa no sucesso do programa.

Porém, e embora tenham sido sempre escolhidas as recetoras consideradas melhores candidatas para a transferência, é importante referir que existem outros fatores relacionados com a recetora que poderiam ter influenciado as taxas de gestação e perda embrionária, como por exemplo as características do útero, cérvix e corpo lúteo no momento da transferência e que não foram analisados devido à ausência de dados.

A idade do embrião também não influenciou significativamente o sucesso deste programa de transferências, demonstrando assim, que é possível efetuar transferência de embriões entre os 6 e os 10 dias de idade. Contudo, teria sido interessante relacionar a idade do embrião com o seu estadio de desenvolvimento, mas esses dados também não foram registados.

Relativamente a outros fatores relacionados com o embrião, teria sido também importante estudar a influência da morfologia. No entanto, além de esses dados não estarem disponíveis, importa salvaguardar que o controlo deste fator é sempre muito reduzido, havendo poucas alternativas caso o embrião tenha uma classificação morfológica inferior.

Pode então concluir-se, que mesmo com alguns fatores que, segundo a literatura, podem ter uma influência negativa no sucesso de um programa de transferência de embriões, como por exemplo, o grande número de éguas idosas e subférteis presentes nestes programas, existem outros que são passíveis de controlar, e que podem assim aumentar as taxas de recolha embrionária e de gestação. Estes resultados permitem concluir que num programa comercial de transferência embrionária, sempre que possível, se deve optar pela IA com sémen fresco ou refrigerado e que esta técnica é viável para um variado número de raças, nomeadamente Brasileiro de Hipismo, Paint-Horse, Crioulo, Puro Sangue Lusitano, Puro Sangue Árabe e Quarto de Milha. Constata-se ainda, ser possível transferir embriões entre os 6 e os 10 dias de idade, utilizar éguas recetoras entre os 3 e os 8 dias pós-ovulação bem como éguas em anestro suplementadas com progesterona de longa ação, sem que isso afete o sucesso do programa de transferência embrionária.

## V Bibliografia

- Allen, W.R. (2005). The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. *Reproduction of Domestic Animals*, 40, 310-329.
- Alvarenga, M.A. (2010). Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (2), 319-323.
- APSL (2010). *Regulamento do Livro Genealógico – homologado pela FAR a 16 de Março de 2010*. Lisboa: Associação Portuguesa do Cavalo Puro Sangue Lusitano.
- Arruda, R.P., Visintin, J.A., Fleury, J.J., Garcia, A.R., Madureira, E.H., Celeghini, E.C.C. & Neto, N.J.R. (2001). Are there relationships between the luteal size, luteal morphoecogenicity by ultrasound and plasmatical progesterone concentrations in recipient mares?. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38 (5), 233-239.
- Bradecamp, E.A., (2007). Estrous Synchronization. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & McKinnon, A.O., *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp. 22-25). Missouri: Saunders Elsevier.
- Camargo, C.E., Weiss, R.S., Kozicki, L.E., Moreira, N., Pastorello, M.D., Duarte, M.C.G. & Treml, T.E. (2008). *Fatores reprodutivos que interferem nos índices de prenhez em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- Carmo, M.T., Losinno, L., Aguilar, J.J., Araujo, G.H.M. & Alvarenga, M.A. (2005). Efeito da superovulação com o extrato de pituitária equina no transporte do oócitos para o oviducto de éguas (resultados parciais). *Acta Scientiae Veterinariae*, 33 (1), 179.
- Carneiro, G.F. (2010). Particularities and difficulties related to equine embryo transfer in Northeast of Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (2), 324-331.
- Carnevale, E.M., Griffin, P.G. & Ginther O.J. (1993). Age-associated subfertility before entry of embryo into the uterus in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15, 31-35.
- Carnevale, E.M., Ramirez, R.J., Squires, E.L., Alvarenga, M.A., Vanderwall, D.K. & McCue, P.M. (2000). Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, 54, 965-979.
- Cuervo-Arango, J., Aguilar, J. & Newcombe, J.R., (2009). Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology*, 71, 1267-1275.
- DeLuca, C.A., McCue, P.M., Patten, M.L. & Squires, E.L. (2011). Effect of a nonsurgical embryo transfer procedure and/or altrenogest therapy on endogenous progesterone concentration in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31, 57-62.
- Duarte, M.B., Vieira, R.C. & Silva, F.O.C. (2002). Incidência de perda de prenhez até ao 50º dia em éguas Quarto de Milha. *Ciência Rural*, 32 (4), 643-647.
- England, G. (2005). Normal Pregnancy. In *Fertility & Obstetrics in the Horse*. (3th ed.) (pp. 60-70). Oxford: Blackwell Publishing.
- Faria, D.R. & Gradela, A. (2010). Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34 (2), 114-122.

- Fleury, J.J. & Alvarenga, M.A. (1999). Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 51 (1), 261.
- Fleury, J.J., Fleury, P.D.C. & Landin-Alvarenga, F.C. (2002). Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18°C – preliminary results. *Theriogenology*, 58, 749-750.
- Fleury, J.J., Pinto, A.J., Marques, A., Lima, C.G. & Arruda, R.P. (2001). Fatores que afetam a recolha embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38 (1), 29-31.
- Fleury, P.D.C., Alonso, M.A. & Balieiro, J.C.C. (2006). Avaliação da égua receptora: Efeito de características uterinas e tempo de ovulação [resumo]. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (1), 502.
- Fleury, P.D.C., Neto, J.R.N., Alonso, M.A. & Squires, E.L. (2005). Taxa de gestação após transferência não cirúrgica de embriões equinos mantidos em meio EmCare ou ViGro por 18 horas entre 15 e 20°C [resumo]. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33 (1), 205.
- Frazer, G.S. (2004). Disorders of reproductive system. In S.M. Reed, W.M. Bayly & D.C. Sellon, *Equine Internal Medicine*, (second edition). Missouri: Saunders.
- Ginther, O.J. (1992). *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects*. (2th ed.). Wisconsin: Equiservices Publishing.
- Greco, G.M., Fioratti, E.G., Dell'Aqua Jr., J.A., Rohen de Queiroz, F.J., Meira, C. & Alvarenga, M.A. (2009). Early embryonic death rates in cyclic recipient mares relative to different times in the breeding season. Acedido em Maio 25, 2012, disponível em: <http://www.abraveq.com.br/>
- Hinrichs, K. & Choi, Y.-H. (2005). Assisted reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 4, 210-218.
- Hudson, J.J. & McCue, P.M. (2004). How to increase embryo recovery rates and transfer success. In *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, (406-408). Denver, Colorado.
- Hurtgen, J.P. (2008). Management of Embryo Donor Mares With Chronic Infertility. In *Practitioners Proceedings of the 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners December 6–10, 2008, San Diego, California*. American Association of Equine Publication, 54, 414-417.
- Iuliano, M.F., Squires, E.L. & Cook, V.M. (1985). Effect of Age of Equine Embryos and Method of Transfer on Pregnancy Rate. *Journal of Animal Science*, 60, 258-263.
- Jacob, J.C.F., Haag, K.T., Santos, G.O., Oliveira, J.P., Gastal, M.O. & Gastal, E.L. (2012). Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a comercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 77, 1159-1166.
- Koblischke, P., Kindahl, H., Budik, S., Aurich, F., Palm, F., Walter, I., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hoppen, H.O. & Aurich, C. (2008). Embryo transfer induce a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology*, 70, 1147-1158.

- Kumar, D., Jhamb, D., Kumar, N. & Badial, D. (2008). Foals born through fresh embryo transfer in India. In *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association Jan. 28 – Feb. 1, 2008 - Moscow, Russia*, 567-568. Acedido em Abril 27, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org>
- Lira, R.A., Peixoto, G.C.X. & Silva, A.R. (2009). Transferência de embrião em equinos: revisão. *Acta Veterinária Brasileira*, 3 (4), 132-140.
- Loomis, P.R. & Squires, E.L. (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64, 480-491.
- Lopes, E.P., Siqueira, J.B., Pinho, R.O., Guimarães, J.D., Rocha, A.N., Carvalho, G.R. & Torres, C.A.A. (2011). Reproductive parameters of Mangalarga Marchador mares in a comercial embryo transfer programme. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 261-267.
- Losinno, L. & Alvarenga, M.A. (2006). Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (1), 39-49.
- Metcalf, E.S. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*, 68, 423-428.
- Miller, C.D. (2008). Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, 70, 463-468.
- McCue, P.M. (2009a). *Cooled-transported embryos*. Acedido em Maio 22, 2012, disponível em: <http://www.colostate.edu/>
- McCue, P.M. (2009b). Frozen embryos. Acedido em Maio 22, 2012, disponível em: <http://www.colostate.edu/>
- McCue, P.M., Niswender, K.D. & Macon, K.A. (2003). Modification on the flush procedure to enhance embryo recovery. *Journal of Equine Veterinary Science*, 23 (8), 336-337.
- McKinnon, A.O. & Squires, E.L. (1988). Morphologic assessment of the equine embryos. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 192, 401-406.
- McKinnon, A.O. & Squires, E.L. (2007). Embryo transfer and related technologies. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & McKinnon, A.O., *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp. 319-334). Missouri: Saunders Elsevier.
- Moussa, M., Duchamp, G., Mahla, R., Bruyas, J.-F. & Daels, P.F. (2003). In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, EmCare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology*, 59, 1615-1625.
- Panzani, D., Crisci, A., Rota, A. & Camillo, F. (2009). Effect of day of transfer and treatment administration on the recipient on pregnancy rates after equine embryo transfer. *Veterinary Research Communication*, 33 (1), 113-116.
- Pashen, R.L., Lascombes, F.A. & Darrow, M.D. (1993). The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, 25, 119-121.
- Peres, K.R., Trinquê, C.L.N., Lima, M.M., Duarte, M.P., Duarte, M.C.G. & Meira, C. (2002). Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. *Theriogenology*, 57 (1), 558.

- Pinna, A.E., Queiroz, F.J.R., Greco, G.M., Cavalcanti, A.S., Boité, M.C., Brandão, F.Z., Pinho, T.C., Nogueira, L.A.G. & Almeida, N.K.O. (2006). Estudo comparativo da taxa de gestação e incidência de morte embrionária em éguas receptoras de embrião cíclicas e acíclicas tratadas com progesterona de longa duração [resumo]. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (1), 508.
- Pycoc, J.F. (2007). Pregnancy diagnosis in the mare. In Samper, J.C., Pycoc, J.F. & McKinnon, A.O., *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp. 335-342). Missouri: Saunders Elsevier.
- Riera, F.L., McDonough, J. (1993). Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, 25 (supplement 15), 116–118.
- Rocha Filho, A.N., Pessôa, M.A., Gioso, M.M. & Alvarenga, M.A. (2004). Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Animal Reproduction*, 1 (1), 91-95.
- Rocha, A. (2011). Reprodução assistida em equinos: avanços e perspectivas no mercado nacional. Acedido em Abril 24, 2012, disponível em: <http://www.omv.pt>
- Samper, J.C. (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 68, 219-228.
- Samper, J.C., Estrada, A.J. & McKinnon, A.O. (2007). Insemination with frozen semen. In Samper, J.C., Pycoc, J.F. & McKinnon, A.O., *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp. 285-288). Missouri: Saunders Elsevier.
- Sevinga, M., Schukken, Y.H., Hesselink, J.W. & Jonher, F.H. (1999). Relationship between ultrasonic characteristics of the corpus luteum, plasma progesterone concentration and early pregnancy diagnosis in friesland mares. *Theriogenology*, 52, 585-592.
- Sieme, H., Schafer, T., Stout, T.A.E., Klug, E. & Waberski, D. (2003). The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 60, 1153-1164
- Squires, E.L. (2005). Perspectivas para o uso de biotecnologias na reprodução equina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33 (1), 69-82.
- Squires, E.L. (2006). Factors affecting embryo recovery and pregnancy rates after embryo transfer. In SIVE, *XII Congresso Multisala, Bologna, Italy 2006*. Acedido em Maio 17, 2012 em <http://www.ivis.org>
- Squires, E.L. (2008). Hormonal manipulation of the mare: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28 (11), 627-634.
- Squires, E.L., Carnevale, E.M., McCue, P.M. & Bruemmer, J.E. (2003). Embryo Technologies in the horse. *Theriogenology*, 59, 151-170.
- Squires, E.L., McCue, P.M. & Vanderwall, D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 91-104.
- Stout, T.A.E. (2006). Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal*, 38 (5), 467-478.
- Testa, A.C., Carmo, M.T. & Alvarenga, M.A. (2005). Perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião em anestro tratadas com progesterona de longa duração. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33 (1), 198.

- Vanderwall, D.K. (1996). Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12 (1), 61-83.
- Vanderwall, D.K. (2008). Early embryonic loss in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28 (11), 691-702.
- Vanderwall, D.K. & Newcombe, J.R. (2007). Early embryonic loss. In Samper, J.C., Pycocock, J.F. & McKinnon, A.O., *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp. 374-383). Missouri: Saunders Elsevier.
- Vanroose, G., Kruif, A. & Van Soom, A. (2000). Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 131–143.
- Vogelsang, S.G., Sorensen Jr., A.M., Potter, G.D., Burns, S.J. & Kraemer, D.C. (1979). Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27, 383-386.



## VI Anexos

Anexo 1- Resultados dos Testes de Fisher e Qui-quadrado para fatores com eventual influência na taxa de recolha embrionária

DIA DA RECOLHA	RECOLHA EMBRIONÁRIA				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
5	2	0	2	100	0
6	20	20	40	50.0	50.0
7	245	283	528	46.4	53.6
8	464	592	1056	43.9	56.1
9	230	184	414	55.6	44.4
10	16	8	24	66.7	33.3
11	1	0	1	100	0

Teste de Qui-quadrado  $p=0.0006905$

TIPO DE SÊMEN	RECOLHA EMBRIONÁRIA				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
REFRIGERADO	672	848	1520	44.2	55.8
CONGELADO	267	190	457	58.4	41.6

Teste de Fisher  $p=1.137 \times 10^{-7}$

ÉPOCA REPRODUTIVA	RECOLHA EMBRIONÁRIA				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
2010-2011	538	556	1094	49.2	50.8
2011-2012	457	534	991	46.1	53.9

Teste de Fisher  $p=0.1735$

RAÇA	RECOLHA EMBRIONÁRIA				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
BH	46	32	78	59.0	41.0
CR	2	3	5	40.0	60.0
PH	4	3	7	57.1	42.9
PSA	375	432	807	46.5	53.5
PSL	96	104	200	48.0	52.0
QM	468	510	978	47.9	52.1

Teste de Fisher  $p=0.4223$

Anexo 2- Resultados dos Testes de Fisher e Qui-quadrado para fatores com eventual influência na taxa de gestação e morte embrionária

IDADE EMBRIÃO	GESTAÇÃO 14 DIAS				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
6	2	18	20	10.0	90.0
7	60	223	283	21.2	78.8
8	126	466	592	21.3	78.7
9	37	146	183	20.2	79.8
10	3	5	8	37.5	62.5

Teste de Fisher p=0.5816

IDADE EMBRIÃO	GESTAÇÃO 45 DIAS				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
6	3	17	20	15.0	85.0
7	73	210	283	25.8	74.2
8	145	447	592	24.5	75.5
9	47	136	183	25.7	74.3
10	4	4	8	50.0	50.0

Teste de Fisher p=0.4337

IDADE EMBRIÃO	ME				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
6	17	1	18	94.4	5.6
7	210	13	223	94.2	5.8
8	447	19	466	95.9	4.1
9	136	10	146	93.2	6.8
10	4	1	5	80.0	20.0

Teste de Fisher p=0.2096

CICLICIDADE	GESTAÇÃO 14 DIAS				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
CÍCLICAS	209	805	1014	20.6	79.4
ACÍCLICAS	21	54	75	28.0	72.0

Teste de Fisher p=0.1424

GESTAÇÃO 45 DIAS					
CICLICIDADE	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
CÍCLICAS	251	763	1014	24.8	75.2
ACÍCLICAS	23	52	75	30.7	69.3

Teste de Fisher  $p=0.2703$

ME					
CICLICIDADE	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
CÍCLICAS	763	42	805	94.8	5.2
ACÍCLICAS	52	2	54	96.3	3.7

Teste de Fisher  $p=1$

GESTAÇÃO 14 DIAS					
DIA PÓS-OVULAÇÃO RCP	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
3	17	41	58	29.3	70.7
4	27	69	96	28.1	71.9
5	42	176	218	19.3	80.7
6	60	237	297	20.2	79.8
7	48	197	245	19.6	80.4
8	18	59	77	23.4	76.6
9	1	1	2	50.0	50.0

Teste de Qui-quadrado  $p=0.3812$

GESTAÇÃO 45D					
DIA POS-OVULAÇÃO RCP	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
3	18	40	58	31.0	69.0
4	30	66	96	31.2	68.8
5	46	172	218	21.1	78.9
6	71	226	297	23.9	76.1
7	66	179	245	26.9	73.1
8	20	57	77	26.0	74.0
9	1	1	2	50.0	50.0

Teste de Qui-quadrado  $p=0.4841$

DIA POS-OVULAÇÃO RCP	ME				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
3	40	1	41	97.6	2.4
4	66	3	69	95.7	4.3
5	172	4	176	97.7	2.3
6	226	11	237	95.4	4.6
7	179	18	197	90.9	9.1
8	57	2	59	96.6	3.4
9	1	0	1	100	0

Teste de Fisher p=0.132

ÉPOCA REPRODUTIVA	GESTAÇÃO 14 DIAS				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
2010-2011	133	422	555	24.0	76.0
2011-2012	97	437	534	18.2	81.8

Teste de Fisher p=0.02127

ÉPOCA REPRODUTIVA	GESTAÇÃO 45 DIAS				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
2010-2011	156	399	555	28.1	71.9
2011-2012	118	416	534	22.1	77.9

Teste de Fisher p=0.02534

ÉPOCA REPRODUTIVA	ME				
	NEG	POS	TOTAL	% NEG	% POS
2010-2011	399	23	422	94.5	5.5
2011-2012	416	21	437	95.2	4.8

Teste de Fisher p=0.7574