UNIVERSIDADE ESTADULA PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DAS CARACTERÍSTICAS UTERINAS E DIA DO CICLO NA TAXA DE PRENHEZ E NÍVEIS SÉRICOS DE PROGESTERONA EM ÉGUAS CANDIDATAS À RECEPTORA DE EMBRIÃO

MARIA AUGUSTA ALONSO

Botucatu - SP
Novembro 2007

UNIVERSIDADE ESTADULA PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DAS CARACTERÍSTICAS UTERINAS E DIA DO CICLO NA TAXA DE PRENHEZ E NÍVEIS SÉRICOS DE PROGESTERONA EM ÉGUAS CANDIDATAS À RECEPTORA DE EMBRIÃO

MARIA AUGUSTA ALONSO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu - SP
Novembro 2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Botucatu, 8 de novembro de 2007.

_____

Prof. Dr. Adj. Marco Antonio Alvarenga

_____

Prof. Dr. Adj. Rubens Paes de Arruda

_____

Prof. Dr. Adj. Cezinande Meira

DEDICATÓRIA

Dedico minha tese ao João (*in memoriam)*, que de uma forma toda especial, deu novo sentido aos meus dias e me presenteou com uma nova vida. A ele devo meu emprego, meu mestrado, parte da minha nova família e a felicidade indescritível que sinto a cada novo dia. Meu amor por tudo que faço e meu esforço pra tentar me tornar uma pessoa e uma profissional melhor. Apesar do pouco tempo, provocou a maior mudança da minha vida. A você, meu muito obrigada, meu respeito, meu amor e minha admiração. E uma grande saudade!

AGRADECIMENTOS

Antes e primeiro de tudo devo agradecer ao meu pai, meu melhor amigo, companheiro e maior incentivador. Sem ele, eu não teria me tornado a pessoa que sou, não teria um sorriso no rosto, não saberia o verdadeiro significado da palavra amor. Não existem palavras suficientes para expressar tudo que você significa pra mim. Obrigada por ser você!

A minha mãe, Gorda, que me adotou, me agüentou e me ensinou que o amor incondicional nasce, cresce e se cultiva, mesmo não existindo nenhum laço de sangue. E que este amor pode se tornar essencial! Pelos ensinamentos sobre cavalos, ética e profissionalismo, pelas conversas, pelo colo, pelos conselhos.... Por ser minha mãe!

A minha mãe, por ter me mostrado que apesar dos desvios no caminho, das dores e lágrimas, podemos amar incondicionalmente e aprender a respeitar as diferenças.

À Perla, por ser minha irmã, minha amiga, minha confidente, minha mentora, minha educadora, minha inspiração, meu exemplo. Pela oportunidade, confiança, e respeito. Por ter me dado o prazer de ser a tia Bubu do meu tão amado Gabriel e ser meio filha da D. Muntaha e do seu Laerte. Amo vocês!

À D. Muntaha e o seu Laerte (*in memoriam)* por terem me acolhido na sua família e me feito sentir como uma filha... o apoio e carinho de vocês foi maravilhoso!

À minha irmã, Julia, por ter sempre estado na minha vida como um aprendizado diário, um amor mais do que fraternal...

À Mari! Minha alma gêmea! Por 26 anos sem nunca sentir solidão, sabendo que em algum lugar existia você. Meu afilhado, Pedro Augusto, meu maior presente!

À Ju, minha mais nova irmãzinha! Minha confidente! Por horas de choro, paciência e conversas intermináveis....

À Loka, que com seu jeito único, tornou meus dias mais divertidos, mais alegres e muito mais azuis!

À Jess, a Paty... vocês são mais do que especiais...!

À Lu por ter se tornado uma grande amiga!

À Fra, minha amiga de várias horas, de muitos de papos, uma nova alegria nas idas pra São Paulo ....

À Aninha, a Tha, Baiano, Gaúcho, Rafa, Goiano, Bru...meus estagiários, companheiros, e hoje grandes amigos! E que me ajudaram no experimento... E todos os outros estagiários com quem convivi....

À Carol, minha companheira de estágio e início na feliz empreitada da reprodução, apesar da distância sempre presente....

A Jenna, Laurel, Nichole, Melissa, Hallie, por terem me acolhido de forma tão calorosa e me acompanhado à distância.

A minha vó Elza, por ter me mimado e me amado por todos os dias da minha vida. E acreditado que minhas mãos fariam algo de importante neste mundo.... mas não foi tocar piano!

À vó Zezé e o vô Geraldo (*in memoriam)*! Minha saudade infinita, o amor imenso...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga, pelo convite para o mestrado, pela confiança, paciência e aprendizado durante estes 2 anos.

Ao prof. Rubens Paes de Arruda, por seu apoio, pelos primeiros passos na reprodução de eqüinos, pela presença constante na minha trajetória.

Ao Dr. Patrick McCue, por seus ensinamentos, por sua brilhante capacidade, humildade, e por me contaminar com sua paixão de ensinar.

A todos os amigos da pós graduação, em especial ao Wolff, à Renata e à Gaúcha.

A prof. Eunice Oba e a Luciana Leal, pelo auxilio nas mensurações de progesterona.

Ao Gustavo, pela ajuda com a estatística.

A todos os funcionários da Fleury Reprodução Eqüina, que ao longo desses 5 anos, estiveram sempre ao meu lado e dispostos a ajudar! Em especial ao Alex!

Ao Zé, por ter se dedicado tão brilhantemente ao lado dos meus cavalos, e por ter sido meu amigo sempre e me ensinado muito.

À todos os outros amigos que fizeram ou fazem parte da minha vida.

Aos cavalos, meu estímulo, as grandes razão da minha vida. Por ter aprendido muito sobre o respeito, o amor, a compaixão, e por terem sido responsáveis pela escolha do caminho que percorri. Especialmente ao Tico e a Luna!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Taxa de prenhez no dia 15 do embrião em éguas receptoras nos dias 3 a 8 pós ovulação no dia da TE 43

TABELA 2. Taxa de prenhez no dia 15 do embrião em receptoras com diferentes morfoecogenicidades uterinas no dia da TE 44

TABELA 3 Taxa de prenhez no dia 15 do embrião em receptoras com diferentes tônus uterinos no dia da TE 45

TABELA 4 Média e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) em éguas candidatas à receptora de embrião classificadas como marginal ou aceitável nos dias 4 e 8 pós ovulação 46

TABELA 5 Média e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) em éguas candidatas à receptora de embrião com diferentes morfoecogenicidades uterinas nos dias 4 e 8 pós ovulação 46

TABELA 6 Média e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) em éguas candidatas à receptora de embrião classificadas com diferentes tônus uterinos nos dias 4 e 8 pós ovulação 47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diferentes padrões de morfoecogenicidade uterina. Morfoecogenicidade 1 (A); Morofoecogenicidade 2 (B);. Morfoecogenicidade 3 (C) ;Morfoecogenicidade 4 (D). 37

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

% → porcentagem

º C → graus Celsius

α → alfa

ANOVA → análise de variância

CO_2 → gás carbônico

D → dia

DPBS → solução salina fosfatada tamponada (Dulbecco modificada)

GnRH → hormônio liberafor de gonadotrofina

hCG → gonadotrofina coriônica humana

IA → inseminação artificial

IFN - δ → interferon tau

IM → intramuscular

n → número de animais

M → molar

N_2 → gás nitrogênio

O_2 → gás oxigênio

$PGF_{2\alpha}$ = Prostaglandina $F_{2\alpha}$

TE → transferência de embrião

SUMÁRIO

RESUMO XIII

ABSTRACT XV

1.INTRODUÇÃO 1

2.REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1 Principais fatores que afetam a taxa de prenhez na transferência de embriões em equinos... 5

2.1.1 Fatores relacionados à égua receptora de embrião 5

2.1.1.1 Seleção da receptora de embrião 5

2.1.1.2 Sincronia doadora e receptora 8

2.1.1.3 Características uterinas da égua receptora no dia da TE 11

2.1.2 Fatores relacionados ao embrião 17

2.1.2.1 Qualidade do embrião 17

2.1.2.1 Idade, tamanho e grau de desenvolvimento do embrião 18

2.1.2.3 Método de preservação do embrião 19

2.1.3 Fatores relacionados à doadora de embrião 24

2.1.4 Técnico 27

2.2 Progesterona e Fertilidade 27

3. OBJETIVO 30

4.MATERIAL E MÉTODO 32

4.1 Local 33

4.2 Animais 33

4.3 Manejo Reprodutivo 34

4.3.1 Doadoras 34

4.3.2 Receptoras 35

4.4 Colheita de embriões 37

4.5 Manipulação e classificação dos embriões 38

4.6 Transferência dos embriões 38

4.7 Colheita de amostra de sangue para dosagem de progesterona 40

4.8 Análise estatística 40

5. RESULTADOS 42

6. DISCUSSÃO 48

7. CONCLUSÃO 56

8. BIBLIOGRAFIA 58

RESUMO

ALONSO, MARIA AUGUSTA. Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião. Botucatu, 2007. 72p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

A técnica de transferência de embrião (TE) foi desenvolvida nos anos 70, e vem sendo cada vez mais difundida. A eficiência de um programa de TE será determinada pelos índices de recuperação embrionária e taxa de prenhez. A receptora de embrião consiste no ponto crítico do programa de TE, e a correta seleção deste elo (fundamental) da cadeia é imprescindível para o sucesso da técnica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do dia do ciclo da receptora sobre as taxas de prenhez pós transferência de embrião; o efeito do tônus e morfoecogenicidade uterina nas taxas de prenhez de receptoras de embrião; relacionar a concentração plasmática de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião classificadas como marginais e aceitáveis e relacionar as concentrações plasmáticas de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião apresentando diferentes tônus e morfoecogenicidade uterina. Éguas receptoras entre os dias 3 a 8 pós ovulação foram utilizadas. A morfoecogenicidade e tônus uterino no dia da TE foram avaliados. O diagnóstico de prenhez foi realizado no dia 15 do embrião. Utilizou-se o Qui-Quadrado para análise das taxas de prenhez nos dias do ciclo, assim como para as taxas de prenhez e características uterinas. Para avaliação do efeito da concentração de progesterona sobre a classificação foi utilizada ANOVA. A comparação das concentrações plasmáticas de progesterona com as características uterinas foi feita utilizando-se o teste t. As taxas de prenhez não foram afetadas pelo dia do ciclo da receptora. As éguas apresentando morfoecogenicidade 1 e 2 tiveram maiores taxas de prenhez do que as éguas com morfoecogenicidade 3, diferindo estatisticamente ($p<0,05$). As éguas com morfoecogenicidade uterina 4 apresentaram índices de prenhez inferiores estatisticamente aos 3 outros padrões. O tônus uterino da receptora afetou as taxas

de prenhez, sendo que as éguas com tônus 1 tiveram taxa de prenhez estatisticamente maior do que os tônus 2 e 3, com p<0,05. As éguas com tônus uterino 2 apresentaram taxas menores do que o tônus 1, porém maiores do que o tônus 3, sendo detectada diferença estatística (p<0,05). A concentração plasmática média no dia 8 pós ovulação foi maior do que o dia 4 pós ovulação, com p<0,0002. Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de progesterona entre as éguas classificadas como marginais e aceitáveis, tanto no dia 4 (p=0,98) como no dia 8 pós ovulação (p=0,50). Comparando-se as éguas com morfoecogenicidades 2 e 3, tanto no dia 4 como no dia 8, não houve diferença estatística na concentração plasmática de progesterona (p=0,93 e p=0,77, respectivamente). Por fim, as éguas no dia 4 pós ovulação que apresentavam tônus uterino 1 e 2 não apresentaram diferença de concentração plasmática de progesterona (p=0,87). Assim como nas éguas no dia 8 pós ovulação com os diferentes tônus, 2, 3 e 4, não foi detectada diferença estatística nos níveis plasmáticos de progesterona (p=0,33). Pode-se concluir neste estudo que o dia do ciclo, entre os dias 3 a 8 pós ovulação, não afeta os índices de prenhez pós transferência. Por outro lado, a morfoecogenicidade e tônus uterino da receptora afetaram a taxa de prenhez pós TE, sendo importantes parâmetros para serem levados em conta na escolha da receptora. As concentrações plasmáticas de progesterona não apresentam relação com as características uterinas morfoecogenicidade e tônus e com a classificação da receptora em marginal ou aceitável, sugerindo desta forma que algum outro fator, que não a concentração plasmática de progesterona, seja responsável pelas diferenças apresentadas entre as éguas. Talvez, a expressão de receptores de progesterona no endométrio seja uma explicação para as variações encontradas entre os animais.

Palavras-Chave: eqüino, receptora, TE, progesterona, taxa de prenhez, tônus uterino, morfoecogenicidade uterina

ABSTRACT

ALONSO, MARIA AUGUSTA. Effect of uterine characteristics and day of cycle in pregnancy rates and progesterone concentration in candidate mares for embryo recipient. Botucatu, 2007. 72p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

Embryo transfer (ET) technique was developed in the seventies and nowadays it is spreading consistently. The efficiency on an ET programme is determined by recovery rate and pregnancy rate. The recipient mare is the most important factor in the ET programme, with special emphasis on its selection. The aim of this study was to evaluate the effect of the recipient's day of cycle on pregnancy rate after transfer, the effect of uterine tone and morphoecogenicity in pregnancy rates, relate plasmatic progesterone concentration in candidate recipient mares that were qualified as acceptable or marginal, and to relate plasmatic progesterone concentration to different uterine tone and morphoecogenicity in candidate recipient mares. Recipient mares were used between day 3 and 8 post ovulation. Morphoecogenicity and uterine tone were evaluated on ET day. Pregnancy diagnosis was performed on day 15 of the embryo. Chi square test was used to analyze pregnancy rates on the different days of cycle, and to relate pregnancy rates and uterine characteristics. In order to evaluate progesterone concentration in recipients that were classified as marginal or acceptable, ANOVA was utilized. To compare progesterone concentration and uterine characteristics, t test was performed. Pregnancy rates were not influenced by recipient's day of cycle on ET day. Mares presenting morphoecogenicities 1 and 2 had higher pregnancy rates than mares presenting morphoecogenicity 3, being statistically different ($p<0,05$). Mares presenting morphoecogenicity 4 had the lowest pregnancy rate, compared to the others. Uterine tone affected pregnancy rate. Mares with uterine tone 1 had higher pregnancy rates than uterine tone 2 and 3. Mares presenting uterine tone 2 had lower pregnancy rate than uterine tone 1, but higher than uterine tone 3 ($p<0,05$). Average plasmatic progesterone concentration on day 8 post

ovulation was higher than on day 4 post ovulation, with p<0,0002. There was no statistical difference on progesterone concentration in mares qualified as acceptable and marginal on days 4 (p=0,98) and 8 post ovulation (p=0,50). Mares presenting morphoecogenicity 2 and 3 on days 4 and 8 post ovulation did not have different plasmatic progesterone concentration (p=0,93 and p=0,77, respectively). Mares with uterine tone 1 and 2 on day 4 post ovulation had similar progesterone concentrations (p=0,87). Likewise, mares on day 8 post ovulation, with uterine tone graded as 2,3 and 4, had similar progesterone concentration (p=0,331). Based on the results of this study, the day of cycle, 3 till 8 post ovulation, does not affect pregnancy rate in recipient mares. Differently, uterine characteristics (morphoecogenicity and uterine tone) affected pregnancy rate after transfer. It can be concluded that these uterine characteristics should be used when choosing an adequate recipient. Plasmatic progesterone concentrations were not related to the uterine characteristics and recipient classification, suggesting that some other factor, other than plasmatic progesterone concentration, must be responsible for these differences among mares. Maybe, different endometrial expression patterns of progesterone receptors could be an explanation for the variations found.

Keywords: equine, recipient, embryo transfer, progesterone, pregnancy rate, uterine tone, uterine morphoecogenicity

1. INTRODUÇÃO

A técnica de transferência de embriões foi desenvolvida nos anos 70, e desde então sua utilização vem aumentando consistentemente, sendo atualmente permitida pela maioria das raças.

Os EUA, Argentina e Brasil são os paises que lideram o número de TE no mundo, sendo que no Brasil cerca de 6000 prenhezes são obtidas por ano.

A TE se tornou uma importante ferramenta em vários programas de melhoramento de eqüinos por todo o mundo. Ela permite a produção de múltiplos potros de éguas de alto potencial genético, envolvidas em alguma atividade como exposições e competições; possibilita produzir potros de éguas incapacitadas de levar uma gestação a termo e de potras ainda muito jovens para conceber; permite que produtos de éguas idosas tenham uma melhor condição de desenvolvimento pré e pós parto; poupa éguas idosas das dificuldades relacionadas a levar uma gestação a termo bem como de aleitar um potro, além de permitir armazenamento de material genético.

A eficiência de um programa de TE será determinada pelos índices de recuperação embrionária e taxa de prenhez, que por sua vez são influenciados por diversos fatores. Portanto, para haver um incremento dos resultados, com conseqüente redução de custos, as taxas de prenhez e recuperação embrionária devem ser maximizadas.

A taxa de recuperação embrionária depende da idade, *status* e manejo reprodutivo da doadora de embriões, da qualidade e tipo de processamento pelo qual o sêmen foi submetido e do dia da coleta do embrião.

A taxa de prenhez após TE é afetada basicamente por três fatores: a receptora, o embrião e a doadora pela qual o embrião foi gerado. Diversos estudos acerca de cada um destes fatores relacionados à taxa de prenhez têm sido realizados, havendo consenso em relação ao papel primordial desempenhado pela receptora na TE.

A sincronia entre receptora e doadora é levada em conta na seleção da receptora, porém este é um fator já muito estudado, e uma janela de +1 (ovulação da receptora 1 dia antes da doadora) a - 3 (ovulação da receptora três dias depois da doadora) é mundialmente aceita e utilizada. Um aumento

nesta janela de utilização das receptoras tornaria a sincronização e escolha de uma receptora adequada mais fácil e flexível.

A receptora de embrião, vale enfatizar, consiste no ponto crítico do programa de TE; sua correta seleção e manejo determinarão em grande parte, o sucesso da técnica. Existem dois momentos no qual a escolha se faz importante. O primeiro é aquele no qual o animal será incorporado ao plantel de receptoras. Nele, a idade, *status* reprodutivo, condição corporal, conformação externa da genitália, útero e ovários são avaliados. O segundo e mais importante, que terá relação direta com a taxa de gestação, é a seleção da receptora no momento da transferência do embrião. Normalmente, esta avaliação é feita de forma empírica e subjetiva, cada profissional leva em consideração parâmetros próprios. Poucos são os trabalhos que correlacionam as características uterinas da receptora no dia da TE com as taxas de prenhez e com concentrações plasmáticas de progesterona.

A égua é, na maioria da vezes, um animal monovulatório, estacional, restringindo assim o número de ciclos e ovulações utilizados por ano. Além disso, diferente do que ocorre com ruminantes nos quais a superovulação é comercialmente empregada, a égua não responde consistente e adequadamente à superovulação, e com isso, o número de embriões obtidos por égua, em uma determinada estação de monta, é reduzido. Portanto, é de vital importância se atingir a maior taxa de prenhez possível, para cada embrião obtido.

A determinação de um método que seja objetivo e confiável, visando a escolha da receptora de embrião mais adequada e com maiores chances de ter diagnóstico positivo de prenhez, seria de grande importância para os profissionais envolvidos com TE em eqüinos. Com base nos aspectos citados, o presente trabalho procurou confrontar diferentes métodos de avaliação de receptoras relacionando-os com níveis plasmáticos de progesterona.

.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Principais fatores que afetam a taxa de prenhez na transferência de embrião em eqüinos

2.1.1 Fatores relacionados à égua receptora de embrião

2.1.1.1 Seleção da receptora de embrião

As éguas receptoras de embrião geralmente são selecionadas ou rejeitadas baseadas na idade, histórico reprodutivo, conformação perineal e avaliação reprodutiva. Este exame de seleção deve incluir palpação, ultra-sonografia, cultura, citologia e biópsia (STOUT, 2006; MCCUE et al., 1999; SQUIRES & SEIDEL,1995; SQUIRES, 1993).

Deve-se selecionar receptoras que tenham um histórico de parição anterior, um tamanho adequado (entre 450 e 550kg), entre 3 a 10 anos de idade e que seja cabresteada (SQUIRES & SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999).

É de comum acordo que utilizar receptoras com sanidade reprodutiva é um importante aspecto no sucesso da TE (SQUIRES, 1989). Os requerimentos para que uma receptora seja utilizada variam entre os centros de reprodução, podendo variar desde éguas que tenham parido anteriormente (demonstrando assim habilidade de gestar um potro a termo), ou éguas virgens, eliminando a possibilidade de laceração cervical ou alterações uterinas prévias (HINRICHS,1993).

Uma receptora de embrião ideal deve ter tipo e tamanho semelhante ao da doadora, ser dócil e ter boa habilidade materna. Além de estar livre de quaisquer moléstias infecto-contagiosas, em especial Anemia Infecciosa Eqüina, babesiose, leptospirose e adenite eqüina (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

As éguas devem passar por um exame reprodutivo completo. Este exame inclui a observação da genitália externa, sendo necessário ter uma

conformação vulvar normal. A palpação retal deve ser realizada, sendo avaliados o tamanho e o tônus do útero, a cérvix e os ovários. Em seguida é realizado um exame ultrasonográfico do útero e dos ovários. Qualquer sinal de alteração, como presença de fluido uterino, cistos, ar ou debris no útero, tumores ou outras anormalidades ovarianas, deve determinar o descarte do animal. Aproximadamente 15 a 20% das éguas examinadas são descartadas. Uma cultura, citologia e biópsia deverão ser efetuadas de cada uma das éguas. Apenas éguas com biópsias de graus IA e IB e sem evidência de endometrite crônica ou aguda deveriam ser usadas como receptoras (SQUIRES & SEIDEL, 1995).

O ideal seria que as éguas apresentassem um ou dois ciclos normais antes de serem utilizadas. Éguas são excluídas do programa se apresentam constantemente ciclos erráticos e ciclo estral anormal incluindo falha de exibir estro, falha de ovulação, ou aquelas que apresentam períodos de diestro curto, com menos de 12 dias. Os animais que não se tornam prenhes após duas transferências ou que apresentem alterações uterinas também serão descartados (SQUIRES, 1993).

A minúcia do exame reprodutivo depende mais das circunstâncias particulares da compra deste (preço, disponibilidade de amostras, autorização do proprietário, habilidade do médico veterinário, etc) do que da indicação médica. Quanto maior a profundidade do exame, menor o erro, maior o preço da receptora. Mas, de acordo com os dados, está absolutamente justificado este exame mais pormenorizado, uma vez que há uma grande proporção de éguas aceitas e que não estão aptas reprodutivamente. O ideal seria que as éguas candidatas à receptora de embrião tivessem exame de biópsia endometrial além do exame ultrasonográfico, e apresentassem integridade dos genitais externos e competência cervical. No Brasil, os veterinários utilizam quase que exclusivamente a ultra-sonografia para compra ou descarte de receptoras. É importante salientar que nem sempre uma égua sem fluido uterino não tem um processo inflamatório instalado no útero. Em função disto, é aconselhável que pelo menos o exame citológico seja incluído na seleção de receptoras (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

A presença de cistos reflete senilidade uterina e normalmente estes estão presentes acompanhando alterações endometriais. Eles são associados

com aumento da idade e um escore de biópsia maior, indicando alterações fibróticas e glandulares. Stanton et al. (2004) encontraram que as éguas que apresentavam cistos tinham idade superior a 10 anos. Além disso, de todos os animais que apresentavam cistos, 73,1% eram éguas com mais de 14 anos, e apenas 29,1% eram éguas entre 7 e 14 anos (STANTON et al., 2004).

Ricketts & Alonso (1991) observaram que há um aumento na incidência de alteração endometrial em éguas mais velhas, incluindo aquelas que nunca foram cobertas. Vários outros estudos indicaram que a fertilidade da égua diminui com o aumento da idade (CARNEVALE & GINTHER, 1992), com um severo decréscimo em éguas de cria com mais de 15 anos (BALL, 1993). Sugere-se desta forma, que a idade deve ser levada em conta na seleção de receptoras (STOUT, 2006; CARNEVALE et al., 2000).

Analisando dados de campo, a taxa de perda de gestação de éguas receptoras de embrião variou entre 8 e 20 %. Este estudo realizou a classificação endometrial de receptoras e relacionou-a com a idade. Em éguas entre 2 e 10 anos de idade foram detectadas 37% como categoria IIB e 5 % como categoria III, de acordo com a classificação histopatológica de Kenney & Doig, (1986). Isto indica que na população estudada, 32% das éguas com ≤ 10 anos estavam seriamente comprometidas para levar uma gestação a termo, apesar de haverem sido classificadas clinicamente como aptas e compradas como receptoras. Além disso, quando duas faixas etárias foram comparadas, éguas classificadas no escore IIB e III representavam 75% das éguas com mais de 14 anos e 32% das éguas com menos de 14 anos. Baseados nesse resultado, estes autores sugerem que éguas com mais de 14 anos não devem ser utilizadas como receptoras de embrião. Da mesma forma, sugerem que éguas com menos de 14 anos devem ser submetidas a exame ginecológico completo que inclua biópsia endometrial antes de serem utilizadas como receptoras de embrião (LOSINNO et al., 2005).

Pascoe et al. (1985) demonstraram que mais embriões sobreviveram até dia 50 em receptoras com endométrio normal do que com alterações endometriais (63 e 28%, respectivamente).

Em contrapartida, em outro estudo realizado não foi encontrada diferença entre os dias 12 e 28 na taxa de sobrevivência para embriões transferidos para éguas normais e subférteis. Isto está de acordo com estudo

realizado em bovinos no qual não houve diferença na taxa de prenhez entre as vacas repetidoras de cio e as normais, sendo que as normais apresentaram índices superiores (BALL et al., 1987).

Carnevale et al.(2000), observaram a taxa de prenhez de receptoras entre 2 e 9 anos e esta não diferiu estatisticamente das receptoras entre 10 a 18 anos. Porém, a taxa de perda embrionária foi maior nas receptoras entre 10 e 18 anos (13,3% versus 20,5%).

2.1.1.2 Sincronia doadora e receptora

Um entrave ao desenvolvimento da TE em cavalos tem sido a sincronização de ovulação entre éguas doadoras e receptoras.

Devido a uma grande variabilidade da duração do estro entre éguas, terapias hormonais para sincronização da ovulação nem sempre alcançam uma sincronia próxima (GINTHER, 1992).

A sincronia de ovulação entre doadora e receptora afeta as taxas de prenhez em transferência cirúrgica e não cirúrgica (SQUIRES, 1992; SQUIRES, 1993).

Porém, resultados do estudo de Carnevale et al. (2000), mostraram que o tempo de ovulação, e não a sincronia entre doadora e receptora, pode ser mais importante quando é feita a escolha da receptora para a transferência do embrião.

A sincronia entre embrião e ambiente uterino é essencial para o estabelecimento da gestação. O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, sendo que um embrião em um útero não sincronizado pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes a fase na qual ele se encontra. Eqüídeos permitem que uma maior janela de assincronia seja utilizada comparando-se com bovinos (WILSHER et al., 2006).

As taxas de prenhez foram mais altas em receptoras que ovularam no mesmo dia ou nos 2 dias subseqüentes a ovulação da doadora. (DOUGLAS, 1982; IULIANO et al., 1985).

Oguri e Tsutsumi (1980) não obtiveram sucesso quando éguas que ovularam 2 dias ou mais dias antes da doadora foram utilizadas.

Imel et al. (1981) reportaram taxas de prenhez semelhantes entre éguas que ovularam 1 dia antes ou 1 dia depois da doadora ($p>0,05$). Outros pesquisadores relataram taxas de prenhez maiores em éguas que ovularam depois da doadora comparadas com as que ovularam antes (DOUGLAS et al., 1982; SQUIRES et al., 1985).

McKinnon et al. (1988) obtiveram taxas de prenhez semelhantes quando transferiram embriões em receptoras +1 (ovulação 1 dia antes da doadora) a -3 (ovulação 3 dias após a doadora) de sincronia. Corroborando com este estudo, Vogelsang et al. (1985) obtiveram 60% de prenhez quando utilizaram receptoras que estavam com -3 (ovularam 3 dias depois) de assincronia com a doadora, mas obtiveram resultados negativos quando utilizaram éguas com -4 a -6 dias de assincronia (ovularam 4 a 6 dias depois da doadora).

Fleury et al. (1989), transferiram embriões para 6 éguas que ovularam 3 dias depois da doadora e 3 éguas que ovularam 4 dias depois da doadora, obtendo taxa de prenhez semelhante à das receptoras com menor grau de assincronia.

Foss et al. (1999) propuseram a utilização de uma janela de assincronia de ovulação maior do que as antes utilizadas, sendo que éguas receptoras -5 (ovulação 5 dias depois da doadora) apresentaram resultados satisfatórios (5/6; 83,3%). A flexibilidade resultante desta maior janela de sincronia tornou a seleção de uma receptora apropriada mais fácil.

Aumentar o período útil de utilização da receptora é sempre um desafio que possibilita recompensas na redução do custo da TE em eqüinos (JASKO, 2002).

Caiado et al. (2007) verificaram que o tratamento diário com progesterona iniciado no dia da ovulação da receptora permitiu seu uso já no segundo dia pós ovulação, tendo sido obtidas taxas de prenhez próximas a 70% quando utilizada a progesterona e de 30% quando não utilizada a suplementação.

Fleury et al. (2006) observaram ser possível a utilização de receptoras no dia 3 pós ovulação, desde que estas apresentem bom tônus uterino na avaliação ginecológica.

Pool et al. (1987) propuseram dois experimentos com o objetivo de desenvolver regimes hormonais exógenos para utilizar como receptoras éguas cujas ovulações não estavam sincronizadas com a doadora. No primeiro experimento, o tratamento com 22mg diários de altrenogest era iniciado no dia da ovulação da receptora. Embriões foram transferidos em éguas entre 2 e 6 dias pós ovulação e em um grupo de éguas entre 7 e 12 dias pós ovulação. Uma maior taxa de prenhez (50% vs 0%) foi obtida nas receptoras que estavam entre 2 e 6 dias pós ovulação comparado com o segundo grupo.

Em um segundo experimento destes mesmos autores, a receptora recebia 10mg de PGF2α às 0h do dia no qual a doadora apresentava a ovulação, 20 mg de cipionato de estradiol às 12, 24, 36h, 500mg de progesterona em óleo às 48h e 22mg de altrenogest às 60, 72, 96h. O tratamento de altrenogest era mantido até o dia 28. A taxa de prenhez foi mais alta ($p<0,05$) para as 12 receptoras que estavam entre 10 e 14 dias pós ovulação do que para as 10 éguas que estavam entre 5 e 8 dias quando o tratamento foi iniciado. Esses pesquisadores sugerem que éguas entre 2 e 14 dias pós ovulação e não em sincronia de ovulação com a doadora podem ser usadas como receptoras de embrião; éguas que estão em inicio de diestro podem ser suplementadas com altrenogest enquanto que as em meio e final de diestro tem que ser submetidas a um regime hormonal mais complexo (POOL et al., 1987).

Parry-Weeks et al. (1987) propuseram um estudo para avaliar a eficiência do tratamento com altrenogest em receptoras em diversos graus de assincronia com a ovulação da doadora. Nenhuma das receptoras que receberam o altrenogest e estavam em estro mantiveram gestação, assim como as éguas que ovularam 5 ou mais dias antes da doadora. Nas 13 receptoras que estavam entre +3 dias a -3 dias de assincronia em relação às doadoras, a taxa de prenhez foi de 77% (10/13).

Em um esforço para eliminar a necessidade de sincronização entre doadoras e receptoras, éguas ovariectomizadas foram usadas como receptoras de embrião (HINRICHS et al., 1985; HINRICHS et al., 1987; MCKINNON & SQUIRES, 1988b), porém o resultado da utilização foi variável e não muito difundido (VANDERWALL, 2000).

Outra possibilidade é a utilização de receptoras com ciclo artificial. Esses animais são utilizados aplicando-se estrógeno e progesterona para mimetizar um ciclo natural em éguas em período de transição ou em anestro. As taxas de prenhez alcançadas utilizando-se este tipo de receptora foram semelhantes às de éguas ciclantes (10/18, 55,6% vs 400/590 67,8%) (CARNEVALE et al., 2000).

Em um estudo realizado em um programa comercial, a preparação das receptoras consistiu em aplicação dois dias de cipionato de estradiol (10mg/dia) e no dia seguinte, aplicação de progesterona. No experimento, 4 diferentes tratamentos com progesterona foram realizados: 200mg/dia, 400mg a cada 2 dias, 1500mg de progesterona de longa ação a cada 7 dias, ou a cada 6 dias. As taxas de prenhez alcançadas foram semelhantes entre os tratamentos e as éguas controle (75,0, 75,9, 76,9, 76,6, 73,3%, respectivamente) (ROCHA FILHO et al., 2004).

Diversos experimentos ao longo dos anos objetivaram estender a janela de assincronia, não sendo eficientes. O insucesso deles pode ser explicado pela necessidade do embrião de transmitir seu sinal de reconhecimento maternal antiluteolítico antes ou no dia 10 após a ovulação. Este sinal previne a regulação cíclica de receptores de ocitocina no endométrio que disparará a cascata luteolítica causada pela PGF2α. Em função do exposto, realizou-se um experimento com o intuito de utilizar receptoras que ovularam antes da doadora com taxas de prenhez adequadas. Aplicou-se ácido meclofenâmico, um antiinflamatório não esteroidal, da família dos fenamatos, que inibe a via da 5-lipoxigenase da cascata do ácido aracdônico e inibe a síntese de cicloxigenase, no dia da TE até 7 dias após. As receptoras foram divididas em grupo controle e tratadas (1g ácido meclofenâmico por dia, até 7 dias pós transferência). Dentro destes grupos existiam receptoras que ovularam 2 ou 3 e 4 ou 5 dias antes da doadora. Ambos os grupos tratados com ácido meclofenâmico apresentaram taxas de prenhez significativamente maiores no dia 16 comparados com as éguas controle. (+2 ou +3; 17/20, 85% e +4 ou + 5; 8/16, 50% versus controle +2 ou +3; 8/16, 50% e + 4 ou +5; 1/16, 6%: p=0,04 e 0,02, respectivamente) (WILSHER et al., 2006).

2.1.1.3 Características uterinas da égua receptora no dia da TE

A escolha da égua receptora através da avaliação ginecológica realizada no momento da transferência de embrião é de grande importância, tendo influência direta sobre a taxa de prenhez. Entretanto, esta escolha é, muitas vezes, feita de forma subjetiva pelo fato de cada veterinário possuir um método próprio de avaliação. Além disso, poucos estudos foram realizados com o intuito de verificar a influência dos diferentes parâmetros de seleção das receptoras na taxa de gestação (FLEURY et al., 2006).

Reporta-se que os efeitos da progesterona nas características morfológicas do útero são predominantes sobre os efeitos do estrógeno (Daels & Hughes , 1993).

A aparência ultra-sonográfica do útero é influenciada dramaticamente pela fase do ciclo estral e é dependente dos níveis de esteróides ovarianos predominantes (GINTHER, 1993; PELEHACH et al., 2002). Uma das características visualizada na ultra-sonografia é a aparência do endométrio durante o ciclo estral. Durante o diestro, as dobras endometriais individualizadas não são discernidas (GINTHER, 1984; GINTHER, 1986), e comparada com a do estro, a ecotextura é ultrasonograficamente homogênea. O lúmen do corpo do útero geralmente é detectado como uma linha branca formada por reflexões especulares sobre as superfícies luminais intimamente sobrepostas.

Por causa da prolongada duração dos picos de atividade mioelétrica, o total de atividade elétrica foi maior durante o diestro do que o estro (TROEDSSON et al., 1993). Isto correlaciona-se bem com o tônus aumentado e tubularidade que são características do útero eqüino durante o diestro à palpação retal (BONAFOS et al., 1994).

O tônus uterino que é característico do diestro, é atribuído, pelo menos em parte, à progesterona como indicam os estudos com suplementação com progesterona em éguas não cobertas durante a estação anovulatória e ovulatória. Ocorre um aumento gradual de tônus uterino em éguas não cobertas do dia 0 (dia da ovulação) ao dia 6 e subseqüente queda de tônus entre os dias 6 e 10. Esses achados demonstram que o tônus uterino durante o ciclo estral segue um padrão bimodal com pontos mais baixos no dia 0 e 10 e

picos nos dias 6 e 13. A base hormonal para esse padrão bimodal não é conhecida, mas foi sugerido que o pico de tônus do dia 6 pós ovulação pode estar relacionado com um aumento de estrógenos neste momento (BONAFOS et al., 1994).

Ainda é desconhecido o mecanismo de ação da progesterona na caracterização do escore uterino. Porém, em observações preliminares, as caracterizações dos escores uterinos não foram diferentes nas éguas tanto no período anovulatório, na ausência de progesterona, quanto no meio do período de diestro. Com isso, foi sugerido que baixas concentrações de estrógeno tem maior importância do que altos índices de progesterona no desenvolvimento de endométrio característico de diestro (HAYES et al., 1985).

Hayes e Ginther (1986) afirmaram que para se obter um tônus uterino de máxima intensidade (semelhante ao encontrado entre o 16º e o 25º dia de gestação), a progesterona tem que estar associada ao estrógeno.

Clínicos estão conscientes dos efeitos da progesterona sob o tônus uterino. De fato, progesterona exógena tem sido utilizada para melhorar o tônus uterino de éguas com baixo tônus durante o inicio da gestação (SQUIRES, 1993). A administração de progesterona em éguas ovariectomizadas ou intactas causou espessamento uterino ou um tônus característico de diestro, não tão grande quanto o que ocorre durante a gestação (BERG & GINTHER, 1978). Durante o diestro, quando o edema desaparece, a densidade tecidual aumenta, e os cornos ficam mais tubulares com maior e mais comprimida espessura, sendo de intensidade intermediáriaem relação ao tônus e espessura encontrados no estro e no inicio da prenhez (GINTHER, 1993).

No programa de TE da Universidade do Colorado, um exame reprodutivo nas éguas candidatas à receptora de embrião é feito no 5º dia pós ovulação, que geralmente são dois dias antes da utilização da receptora. Neste exame, as éguas devem apresentar uma cérvix firme e fechada, um útero arredondado e tubular, baseados na palpação retal. Além disso, não deve haver evidência de dobras endometriais ou fluido uterino na ultra-sonografia. O corpo lúteo deve ser identificado e medido. As receptoras com um corpo lúteo visível e grande, um útero firme, cérvix fechada são consideradas aprovadas e estão disponíveis como receptoras pelos próximos dias. Geralmente, 10% das

receptoras não passam nesse exame, em primeiro lugar por ter tônus uterino pobre, ou uma cérvix frouxa e aberta. Essas receptoras não são utilizadas neste ciclo e, se consistentemente não passarem neste exame do 5º dia, são eliminadas do programa (SQUIRES & SEIDEL, 1995; SQUIRES, 2006).

Diversos pesquisadores afirmam que fêmeas eqüinas que apresentam edema endometrial no quinto dia pós-ovulação não devem ser utilizadas como receptoras de embriões neste ciclo (SQUIRES et al., 1999; SQUIRES, 2003).

A presença de fluido durante o diestro pode ser sugestiva de endometrite aguda ou crônica (SQUIRES et al., 1988).

Carnevale et al. (2000), associaram o tônus uterino reduzido e a pior qualidade da receptora com reduzidas taxas de prenhez, além de terem tambem detectado uma taxa de perda embrionária mais elevada. Afirmaram que o tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não totalmente compatível com o crescimento e o desenvolvimento embrionário. Neste trabalho, as receptoras que apresentaram tônus uterino excelente ou bom tiveram 70,6% de prenhez aos 12 dias (269/381), enquanto nas que apresentaram tônus ruim a pobre, a taxa de prenhez foi de 63,6% (105/165), diferindo estes valores estatisticamente. Segundo Ginther (1992), éguas com tônus uterino ruim a pobre podem ter concentrações de progesterona circulantes mais baixas, o que poderia afetar o tônus do útero e cérvix.

Quando comparou-se as taxas de prenhez de receptoras com classificação marginal ou aceitável, baseando-se na presença e aspecto do corpo lúteo e no tônus uterino e cervical, foi encontrada diferença. As éguas classificadas como aceitáveis (apresentando um corpo lúteo bem definido e tônus uterino e cervical bom ou excelente) apresentaram taxa de prenhez de 70,3% (315/448), enquanto as éguas marginais (corpo lúteo pequeno ou com imagem ruim ou tônus uterino e cervical pobre a ruim) tiveram 56,2% (50/89), diferindo estatisticamente (CARNEVALE et al., 2000).

A progesterona desempenha um papel fundamental no estabelecimento e manutenção da gestação. Um estudo foi realizado para determinar se a concentração endógena de progesterona deveria ser utilizada como um critério de seleção de receptoras de embriões eqüinos, baseado na hipótese de que receptoras com concentração de progesterona mais alta teriam taxas de prenhez maiores do que aquelas com concentração mais baixa. As éguas

foram avaliadas 5 dias após a ovulação como candidatas à receptora de embrião (115 éguas, num total de 242 ciclos). O exame consistia na palpação do tônus uterino e cervical, ultra-sonografia do útero e ovários e coleta de uma amostra de sangue para análise de progesterona. Um total de 40 embriões de graus 1 e 1,5 foram transferidos para receptoras +1 (ovulação 1 dia antes da doadora) a -2 (ovulação 2 dias depois) de sincronia. A média da concentração de progesterona no 5º dia pós ovulação foi de 9,8 ± 4,2 ng/ml. A concentração de progesterona em éguas que qualificaram como potenciais receptoras de embrião (n=229) foi significativamente maior ($p<0.05$) do que em éguas que não passaram no exame (n=13) baseadas na palpação retal e exame ultrasonográfico (10,0±4,2 e 6,5±4,3 ng/ml, respectivamente). A concentração de progesterona nos 40 ciclos nos quais embriões foram transferidos foi de 9,5±3,1 ng/ml. A taxa de prenhez no dia 16 foi de 72,5%. Nove das éguas potenciais receptoras tiveram concentração de progesterona <4ng/ml. Destas, 8 (88,9%) foram desqualificadas como potenciais receptoras devido a um baixo tônus uterino e/ou cervical durante a palpação retal. Conclui-se então que baixas concentrações de progesterona parecem estar correlacionadas com tônus uterino inadequado e ou cervical e a avaliação do tônus uterino no dia da TE pode ser útil na rejeição de uma inadequada receptora de embrião (MCCUE et al., 1999).

A concentração de progesterona não diferiu estatisticamente entre as éguas que se tornaram prenhes ou vazias ($p>0,05$) (MCCUE et al., 1999).Em concordância, Arruda et al. (2001) também não detectaram diferença na concentração de progesterona entre os dias 0 e 7 pós ovulação nas éguas prenhes ou vazias após a TE.

Em bovinos, Kerbler et al. (1997) encontraram uma correlação positiva entre a concentração de progesterona e a síntese de IFN-τ pelo concepto, sugerindo que o aumento das concentrações de progesterona na vaca seria benéfico ao desenvolvimento embrionário.

Porém, outros estudos em bovinos não encontraram diferença na concentração plasmática de progesterona entre as vacas receptoras que se tornaram prenhes ou não após a transferência, concluindo assim que a concentração de progesterona no momento da TE não era preditiva da taxa de prenhez após a transferência (SPELL et al., 2001; LEAL, 2004).

O efeito do tônus uterino e do tratamento com fenilbutazona sobre as taxas de prenhez em um programa comercial de TE em equinos foi avaliado. As receptoras foram divididas em 5 grupos, sendo que: Grupo A era composto por éguas com tônus uterino ausente ou fraco, sem receber nenhum tratamento; Grupo B eram éguas que tinham tônus uterino ausente ou fraco, e receberam 1 dose única de 2g de fenilbutazona no momento da TE; Grupo C eram éguas que apresentavam tônus uterino ausente ou fraco, recebendo 3 doses de fenilbutazona de 2g, 3 vezes no dia da TE; Grupo D as éguas apresentavam tônus moderado a intenso, recendo 2 g de fenilbutazona no momento da TE e Grupo E, éguas com tônus uterino moderado a intenso que não foram tratadas. Todos os animais receberam um embrião. As taxas de prenhez encontradas foram 36,8; 35,7; 63,6; 82,6; 79,3%, respectivamente. As taxas de prenhez dos grupos A e B, das receptoras com tônus uterino ausente ou fraco, foram diferentes estatisticamente dos demais grupos, demonstrando desta forma a correlação entre tensão uterina da receptora e taxa de prenhez. Além disso, o grupo C, de éguas com tônus uterino ausente ou fraco, que receberam a fenilbutazona 3 vezes no dia da TE, apresentaram resultados comparáveis aos das éguas com bom tônus uterino, sugerindo desta forma que houve um efeito benéfico do tratamento na taxa de prenhez (DUARTE & VIEIRA, 2003).

Fleury et al. (2006) apresentaram os resultados de um programa comercial onde a seleção da receptora no dia da TE é baseada nas características uterinas de morfoecogenicidade e tônus. O tônus era avaliado por palpação retal, sendo escore de 1 (tônus máximo) a 4 (tônus mínimo). A ecogenicidade uterina era visualizada por ultra-sonografia, classificada como 1 (imagem homogênea e maior ecogenicidade) a 4 (imagem heterogênea e menor ecogenicidade). A taxa de prenhez nas éguas com tônus 1 e 2 foi maior do que nas com tônus 3 ($p<0,05$), assim como as taxas de prenhez para as éguas com ecogenicidade 1 e 2 foram mais altas do que nas éguas com ecogenicidade 3 e 4. As taxas de prenhez das éguas com ecogenicidade 3 foram superiores as das com ecogenicidade 4. Com isso, os autores concluíram que a ecogenicidade e tônus uterino devem ser levados em consideração na escolha da receptora de embrião.

Em outro estudo, os fatores relacionados à receptora de embrião que afetaram significativamente a perda embrionária foram a idade da receptora, tônus uterino antes da transferência e número de dias pós ovulação da receptora (CARNEVALE et al., 2000).

Em busca do aumento das concentrações de progesterona em éguas candidatas a receptora de embrião, a aplicação de anti-prostaglandínicos, progesterona, e mais recentemente, o uso da hCG (gonadotrofina coriônica humana) e dos análogos do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) têm sido estudado (FLEURY et al., 2007).

No experimento realizado por Fleury et al. (2004), a concentração de progesterona entre o dia da transferência e o dia 13 do embrião apresentou aumento significativo em receptoras tratadas com a hCG no dia da TE. As taxas de prenhez não diferiram estatisticamente, porém foi observado um aumento numérico na taxa de prenhez em todos os grupos em relação ao controle (FLEURY et al., 2004). Em um outro experimento, o grupo tratado com hCG apresentou maior número de éguas receptoras aptas a receber embriões (FLEURY et al., 2007).

2.1.2 Fatores relacionados ao embrião

2.1.2.1 Qualidade do embrião

A qualidade do embrião eqüino antes da transferência afeta as taxas de prenhez, de forma semelhante ao que acontece em bovinos (SQUIRES, 1993).

Os embriões são avaliados e um escore de qualidade é atribuído de 1 a 5, sendo 1=excelente e 5 = degenerado ou morto. Os parâmetros morfológicos avaliados são se os blastômeros são compactos, extrusados ou danificados, coloração e forma do embrião, tamanho do espaço perivitelino, dano à zona pelúcida e estágio de desenvolvimento comparado com a idade do embrião. A maioria dos embriões coletados são de graus 1 ou 2. As taxas de prenhez para embriões de graus 1 e 2 foram melhores (245/318, 77%) quando comparados com embriões de graus ≥ 3 (6/22, 27%) (SQUIRES & SEIDEL, 1995).

Dados encontrados em um programa comercial de transferência de embriões mostraram que a maioria dos embriões coletados eram considerados normais (escores 1 e 2), sendo cerca de 96% deles (290/302, 96%) (MCKINNON & SQUIRES, 1988a).

De acordo com Squires (2006), as taxas de prenhez para os embriões de graus 1 e 2 são geralmente 70 a 80% aos 14 dias, enquanto para os embriões de graus 3 e 4, ela sofre um decréscimo importante, sendo de 20 a 30%.

Também de acordo com Carnevale et al. (2000), a transferência de embriões de graus 1 e 2 resultaram em significativa maior taxa de prenhez que embriões de graus 3 e 4. Pode-se perceber a importância da avaliação morfológica dos embriões. Observações morfológicas (blastômeros extrusados, células escurecidas, blastocele colapsada) são um método objetivo de avaliar a viabilidade do embrião e estimar a probabilidade de estabelecimento de gestação após a transferência (MCKINNON & SQUIRES, 1988a; CARNEY et al., 1991; CARNEVALE et al., 2000).

Mortensen et al. (2006) relataram a observação de um decréscimo na qualidade de embriões provindos de éguas submetidas a exercício moderado (30 minutos ao trote e galope). Os autores sugeriram que o motivo pelo qual se acredita ter ocorrido esse decréscimo, foi o estresse térmico.

2.1.2.2 Idade, tamanho e grau de desenvolvimento do embrião

A maioria das coletas de embrião são feitas nos dias 6 a 9 pós ovulação. Estudos limitados estão disponíveis para avaliar o efeito da idade do embrião na taxa de gestação (SQUIRES, 1993).

O tamanho do embrião parece não influenciar a taxa de prenhez tanto para os embriões transferidos a fresco quanto para os refrigerados (CARNEY et al., 1991).

Um estudo comparando as taxas de prenhez de embriões de diferentes idades obteve 0% de prenhez com embriões de 9 dias e 10 dias, enquanto a taxa de prenhez para embriões de 6 dias foi de 61%, 7 dias foi de 55% e 8 dias foi de 25% (VOGELSANG et al., 1985).

Em contrapartida, Fleury & Alvarenga, (1999), obtiveram 74,5% de prenhez para embriões de 7 dias (d7), 74,7% para embriões de 8 dias (d8) e 76,5% para embriões de 9 dias. Concluíram que com adequada manipulação e técnica de transferência, os resultados obtidos com embriões de dia 8 e 9 são similares aquelas obtiidas para embriões de dia 7.

No laboratório da Universidade do Colorado, em diversos estudos, não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez entre embriões d 6, d 7 e d8, tornando, assim, flexível o dia da colheita do embrião (SQUIRES, 1993).

Carnevale et al. (2000) também observaram que a transferência de embriões pequenos (100 a 299µm) ou mórulas resultou em menor taxa de prenhez. As coletas eram efetuadas nos dias 7 e 8 pós ovulação e, portanto, potencialmente a maioria dos embriões pequenos que foram coletados estavam com seu desenvolvimento retardado. As possíveis causas deste retardo podem ser defeitos intrínsecos do embrião, exposição a um ambiente inadequado no oviduto ou útero, ou inseminação pós ovulação (GINTHER, 1992). Além disso, embriões provenientes de éguas idosas comparados com éguas jovens apresentam um atraso de desenvolvimento de cerca de 36hs (CARNEVALE et al., 1993).

Foss e Crane (2004), comparando o grau de desenvolvimento e taxa de prenhez, observaram que mórulas resultaram em menores taxas de prenhez comparadas com blastocistos. Segundo estes autores, as mórulas podem ser menos eficientes no reconhecimento materno fetal por causa do seu grau de desenvolvimento ou tamanho. Além disso, foi considerado que a recuperação de uma mórula no d 7 poderia significar que esse embrião apresentava crescimento e habilidade de interagir com o endométrio reduzidos.

Carney et al. (1991) reportaram as porcentagens de prenhez obtidas após transferência não cirúrgica de embriões entre 1,25 e 2,83 mm de diâmetro comparados com os de 0,4 a 1,24mm. Divergindo desses resultados, Fleury et al. (1989) reportaram semelhantes taxas de prenhez de embriões entre 200 e 500 µm, 501 a 1000µm, 1000 a 1700 µm e entre 1701 a 4200 µm de diâmetro.

2.1.2.3 Métodos de preservação do embrião

Outro fator estudado na taxa de prenhez é o método de preservação dos embriões. No caso da utilização da técnica da transferência de embriões em eqüinos, uma das maiores dificuldades está relacionada com a manutenção de éguas receptoras e a sincronização de seu ciclo estral com o da égua doadora (FLEURY, 2002).

Para contornar este problema, criaram-se fazendas especializadas na manutenção de éguas receptoras, nas quais estas são mantidas e sincronizadas de acordo com a necessidade. Foi necessário, então, desenvolver uma metodologia que permitisse a conservação dos embriões pelo tempo necessário para transporte dos mesmos até esses locais (FLEURY, 2002).

A conservação de embriões eqüinos por curtos períodos através do resfriamento é mais aplicável comercialmente do que a congelação, uma vez que a taxa de prenhez para embriões congelados é ainda insatisfatória e muitas raças ainda não aprovam a técnica (FLEURY, 2002).

Oguri e Tsutsumi (1974) coletaram embriões no dia 6 pós ovulação, e mantiveram embriões em solução salina com 2% de gelatina ou em mistura de Ringer com soro de égua a 30º C entre 29 a 70 minutos antes da transferência e não detectaram diferença entre as taxas de prenhez entre os dois tratamentos.

Já Douglas (1982) não obteve prenhezes de embriões transferidos com o meio TCM-199 (0/12), mas obteve 60% de prenhez para embriões colhidos e transferidos em meio DPBS.

Embriões mantidos em DPBS à temperatura ambiente por 6 a 24 horas antes da transferência resultaram em 3 prenhezes de 7 embriões transferidos aos 24 dias e nenhuma aos 100 dias. O contrário ocorreu com os embriões controle, que também permaneceram em DPBS mas à temperatura ambiente por até 3 horas, apresentando melhores resultados (20/28 no dia 14 e 14/28 no dia 100) (DOUGLAS, 1982).

De acordo com Imel, 1981, o DPBS não foi eficiente em manter a viabilidade do embrião por 24 horas. O melhor meio em manter a viabilidade do embrião eqüino foi o Ham´s F-10.

Carnevale et al. (1987) desenvolveram uma técnica para a manutenção de embriões que permitia sua conservação por um período de até 24 horas, que é o tempo necessário para viabilizar o transporte dos mesmos, sem um comprometimento da taxa de prenhez a ser obtida. O trabalho comparou os resultados obtidos com o meio Ham's F10 gaseificado com uma composição de 5% de CO_2, 5% de O_2, e 90% de N_2, com 10% SFB, penicilina e estreptomicina, e o Ham's F10 tamponado com Hepes, também com 10% SFB, penicilina e estreptomicina, mantidos a uma temperatura de 5^oC por 24 horas em um Equitainer®. Foi encontrada uma menor taxa de prenhez aos 14 dias, para os embriões mantidos em Ham's F10 + Hepes (20%) quando comparado com o grupo controle (90%) e com o grupo mantido em Ham's F10 + CO_2 (70% ; $P<0.05$). Seus resultados sugeriram ainda que os embriões eqüinos permanecem viáveis por até 24 horas em Ham's F10 + CO_2 em temperatura de 5^oC . Neste mesmo estudo, houve um aumento de 34,8 μm no diâmetro dos embriões armazenados por 24 horas em Ham's F10 + CO_2 e um decréscimo de 10,2 μm no diâmetro daqueles mantidos em Ham's F10 + Hepes (CARNEVALE et al., 1987).

Carney et al. (1991) comparam as taxas de prenhez entre embriões transferidos a fresco ou transportados. Os embriões eram coletados no dia 7 pós ovulação e transferidos imediatamente ou colocados em Ham´s F10 com 10% SFB em atmosfera a 5% CO_2, 5% O_2 e 90% N_2 em um Equitainer® a 5^oC. As taxas de prenhez aos 12, 35 e 50 dias foram semelhantes para embriões transferidos a fresco ou refrigerados (74, 64, 61% vs 80, 67, 66%), assim como quando comparados os embriões mantidos por 12 e 24 horas. Concluiu-se então que embriões eqüinos podem ser refrigerados a 5^oC e guardados por até 24 horas sem ocorrer diminuição da fertilidade.

Martin et al, (1991) realizaram um estudo onde os embriões foram armazenados a 5º C por 18 ou até 36 horas. Estes embriões eram colhidos com 7 dias, mensurados e seu grau de qualidade avaliado. Em seguida, eram mantidos em Ham's F10 com 10% SFB, gaseificado com 5% CO_2, 5% O_2 e

90% N_2. Os embriões foram então armazenados em Equitainer® por 18 ou 36 horas. Após o período de refrigeração, os embriões foram avaliados quanto ao tamanho e a qualidade e então transferidos para receptoras sincronizadas. O escore médio dos embriões antes do armazenamento foi 1,3 (escore de 1 a 5). Os embriões mantidos por mais tempo tiveram pior escore de qualidade (1,6 com 18 h; 2,0 com 36 h). Já o tamanho dos embriões não sofreu nenhuma alteração com 18 ou 36 horas. Concluíram a partir deste estudo que apesar da qualidade dos embriões diminuir levemente após 36 horas, a taxa de prenhez dos embriões foi similar àquela dos embriões mantidos por até 18 horas (36,6 e 40%, respectivamente).

Fleury et al. (1998) relataram a utilização de uma modificação da técnica descrita por Carnevale obtendo resultados satisfatórios. Esta modificação consistiu em utilizar o Ham's F-10 com menor concentração de Hepes.

Carnevale et al. (2000), avaliando os resultados obtidos com transferência de embriões a fresco ou resfriados, concluiram que a refrigeração e transporte de embriões eqüinos não afetam a taxa de prenhez. Os resultados de prenhez para embriões transferidos a fresco e refrigerados foram similares no dia 12 (64,6% fresco; 69,3% refrigerado) e no dia 50 (56,3% fresco; 56,0% refrigerado) (CARNEVALE et al., 2000).

McCue et al. (2000), procurando contornar a dificuldade do protocolo que necessita a incubação do Ham's F-10 com CO_2, desenvolveram um projeto piloto no qual comparou os resultados obtidos com o Ham's F10 com CO_2, com a utilização do meio Emcare®, que não exige a utilização da técnica da gaseificação para o equilíbrio do seu pH, não encontrando diferença significativa entre os grupos.

Fleury et al. (2005) reportaram taxas de prenhez semelhantes para embriões mantidos em meio Vigro ou Emcare por 18hs entre 15 e 20º C. Já em 2006, o mesmo grupo reportou taxas de prenhez semelhantes comparando-se diferentes tempos de manutenção dos embriões entre 15 e 18º C, até 24hs, demonstrando assim que é possível a permanência dos embriões por até 24 horas nesta temperatura, sem prejudicar a fertilidade.

A congelação de embriões é um método bastante difundido e utilizado para a conservação e a exportação de embriões bovinos. Em eqüinos o sucesso desta técnica é ainda limitado (FLEURY et al, 2002).

Embriões podem ser congelados por métodos convencionais similares àqueles utilizados em bovinos, ou por vitrificação. Na criopreservação convencional, é essencial remover a maioria da água das células antes de ocorrer o congelamento. Para a vitrificação, altas concentrações de crioprotetores permeáveis são utilizadas, tipicamente 5 M ou mais. O que ocorre neste processo é um aumento da viscosidade dos fluidos intra e extra-celulares conforme vai ocorrendo o resfriamento, ao invés da formação de cristais. Tambeém não é necessário o resfriamento lento do embrião (SQUIRES & SEIDEL, 1997; SQUIRES, 2005).

Há muitos anos, uma série de estudos tem procurado melhorar as taxas de prenhez dos embriões congelados. YAMAMOTO et al. (1982) reportou o nascimento do primeiro potro oriundo da congelação de embrião e neste estudo a taxa de prenhez obtida foi de apenas 9% (1 de 11).

Foi demonstrado que os embriões menores, coletados no dia 6 pós ovulação suportam melhor a criopreservação do que os maiores d7 (SQUIRES & SEIDEL, 1997; SQUIRES, 2003). Contudo, os embriões recuperados no dia 6 podem já ser muito grandes. Slade et al. (1985) reportaram que 11% dos embriões recuperados no d 6 tinham mais do que 260 μm de diâmetro.

Os embriões grandes em estágio de blastocisto ou blastocisto expandido não sobrevivem a congelação, diferindo assim de embriões bovinos, para os quais os melhores resultados são obtidos com embriões coletados entre 7 e 8 dias, no estágio de blastocisto inicial (SLADE et al., 1985).

Vários autores demonstraram que embriões <300um em tamanho sobrevivem a congelação e descongelação, enquanto os embriões grandes têm taxas de sobrevivência mais baixas (SLADE et al., 1985; SQUIRES et al., 1989; MEIRA et al., 1993). Seidel (1996) sugeriu que essa menor resistência dos embriões grandes se deve à baixa permeabilidade aos crioprotetores durante sua adição e remoção e a relação da superfície pequena com o volume do embrião. A cápsula pode ser responsável por impedir o movimento do crioprotetor de tal forma que este não consegue entrar e sair facilmente das células (SQUIRES & SEIDEL, 1997; SQUIRES et al., 2005). Pfaff et al. (1993) mostraram indiretamente que o fluxo de crioprotetores através da superfície embrionária diminui a medida que o embrião equino se desenvolve. Também existe a possibilidade de que a massa celular interna sofra menos dano do que

as células trofoblásticas, ajudando a explicar porque os embriões maiores resistem menos a criopreservação.

Slade et al. (1985) compararam os efeitos de diferentes procedimentos de congelamento. Foi utilizado o glicerol como crioprotetor e os embriões foram colocados em palhetas de 0,5ml ou ampolas de 1 ml de vidro. Os embriões foram resfriados a 4 ºC/min a partir da temperatura ambiente até -6 ºC, e feito o *seeding* a -6º C, e mantidos por 15min, então resfriados a 0,3 ºC/min ate -30 ºC e 0,1º C/min até -33 ºC. Após a descongelação, 23 embriões não puderam ser transferidos. Dos embriões que foram classificados como blastocisto inicial (diâmetro médio 173 μm), 8/10 resultaram em prenhez. Em contraste, dos 7 blastocistos apenas um resultou em prenhez.

Legrand et al. (2000), para investigar se a cápsula do embrião impede o congelamento, realizaram um experimento avaliando a relação entre a espessura da cápsula e os danos durante a congelação. Eles reportaram que o número de células danificadas era diretamente proporcional à espessura da cápsula e que a cápsula interfere, prevenindo a entrada do glicerol nas células embrionárias. Em um experimento subseqüente, eles expuseram embriões grandes a tratamentos enzimáticos para digerir a cápsula antes da congelação. A tripsina aumentou a permeabilidade da cápsula mais efetivamente do que a colegenase. O tratamento de embriões d8 com 0,2% do peso de tripsina por 15min antes da congelação resultou em 3 prenhezes de 4 para embriões >500μm. Eles concluíram que, quando embriões eqüinos grandes são congelados, a permeabilidade e espessura da cápsula precisam ser levadas em conta. Num estudo subseqüente, dos mesmos autores, embriões d7 e 8 foram tratados enzimaticamente ou não antes do início do congelamento com glicerol. Os 2 grupos eram (8 embriões grau 1 > 200μm) congelados sem tratamento enzimático prévio e congelados tratados previamente (banho 0,2% tripsina por 15 min). A congelação foi feita utilizando um método de resfriamento lento convencional. Nenhuma gestação foi conseguida no primeiro grupo e 3/11 do grupo 2 resultaram em gestação. A taxa alcançada foi mais baixa do que se esperava baseando-se no estudo preliminar.

Lascombes e Pashen (2000) reportaram os resultados de um programa comercial de transferência de embriões na Argentina no qual 44 embriões congelados foram transferidos. Os embriões eram coletados no dia 6-6,5 e

mediam <220µm. Foram congelados em solução Dulbecco´s fosfato tamponado salina com 10% de glicerol adicionado em 2 passos. A taxa de prenhez obtida foi 56%.

No experimento realizado por Stout et al. (2003) foi concluído que o congelamento de blastocistos expandidos causa ruptura do citoesqueleto e morte celular. Nele foi proposto o tratamento pré congelação com tripsina ou citocalasina B, pois a primeira pode aumentar a entrada de crioprotetor e a última, pode aumentar a flexibilidade da membrana, diminuindo sua fragilidade

A vitrificação, diferente da congelação convencional, é um procedimento rápido que requer menos do que 15 minutos (CARNEVALE et al., 2004) e não requer equipamentos especializados. Além disso, a diluição dos crioprotetores pode ocorrer dentro da palheta, e o embrião pode ser transferido imediatamente para a égua, sem ser retirado da palheta (HUDSON et al., 2006).

Elridge-Panuska et al. (2005), utilizando altas concentrações de glicerol e etilenoglicol para a vitrificação, obtiveram um resultado de 16/26 embriões prenhes. A vitrificação de embriões >300um não resultou em gestações.

Hudson et al., 2006, realizaram um estudo no qual foi feita a vitrificação imediata ou após o resfriamento do embrião por até 19 horas, de embriões provenientes de éguas superovuladas. Os resultados encontrados foram boas taxas de prenhez para ambos, sendo 65% (13/20) para embriões resfriados e em seguida vitrificados e 75 % (16/20) para os vitrificados imediatamente após a coleta, demonstrando desta forma que a vitrificação teve resultados comparáveis com a transferência de embriões a fresco.

2.1.3 Fatores relacionados à doadora de embrião

Diferente de outros animais, a égua permanece em atividade reprodutiva por um maior período de sua vida. Sendo comum encontrar éguas com mais de 20 anos de idade em programas de TE (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

Uma das indicações de TE em éguas é a transferência de embriões de fêmeas com alta taxa de perda embrionária para outras com trato reprodutivo normal. A taxa de perda embrionária é maior entre os 35 e 50 dias em

receptoras que receberam embriões de éguas inférteis, sugerindo que esses embriões eram anormais antes da TE (SQUIRES, 1992).

De acordo com Woods et al. (1986), a qualidade dos embriões recuperados de éguas normais versus inférteis foi mais alta e 53% dos lavados das éguas inférteis continham apenas embriões anormais comparado com apenas 3% dos lavados de éguas normais. Anormalidades embrionárias consistem em retardo de desenvolvimento, degeneração celular, necrose celular e invasão por hifas e podem ter diversas causas como falha na fertilização, embriões hereditariamente alterados, problemas do oviduto, e ambiente uterino inadequado.

Squires et al. (1982) mostrou uma taxa significantemente maior de perda embrionária nos dias 35 e 50 de receptoras que receberam embriões de éguas subférteis do que férteis.

Entretanto, Alonso et al. (2005) apresentaram dados de um programa comercial de TE no qual as taxas de perda embrionária não foi diferente para embriões de éguas idosas (mais do que 18 anos) e éguas jovens (entre 2 e 17 anos), sendo 12,5% e 13,2%, respectivamente.

A viabilidade reduzida dos embriões de éguas subférteis foi demonstrada em estudo de um programa comercial no qual embriões d7 de éguas subférteis tenderam a sobreviver em menor taxa do que embriões de éguas normais (IULIANO E SQUIRES, 1986).

Carnevale et al. (1993) demonstraram que blastocistos provenientes de éguas idosas apresentavam menos células totais, menores escores de qualidade e tendiam a ter menor diâmetro. Brinsko et al. (1994) sugeriram que defeitos de desenvolvimento do embrião ou do ambiente do oviduto poderiam explicar a falha no estabelecimento da gestação em animais idosos e subférteis.

Ball et al. (1989) observaram que a qualidade dos embriões era semelhante entre éguas subférteis e normais, contudo os embriões de baixa qualidade de éguas subférteis tenderam a ter menor taxa de prenhez do que os provenientes de éguas normais. Apesar do papel do ambiente uterino poder ser considerado como causador de defeitos embrionários, parece possível que muitos deles possam ser explicados por defeitos no oócito das éguas velhas e subférteis.

Oócitos de éguas idosas transferidos para o oviduto de receptoras jovens resultaram em menor taxa de gestação do que oócitos de éguas jovens (11/12, 92%; 8/26, 31%) (CARNEVALE & GINTHER, 1995). O tipo de alteração responsável por esta redução de qualidade ainda é desconhecida (AGUILAR et al., 2002). Foi sugerido que éguas velhas ovulam mais oócitos defeituosos do que éguas jovens, o que está de acordo com outros trabalhos prévios, sendo este fator parcialmente responsável pela subfertilidade em éguas idosas (CARNEVALE et al., 1993; CARNEVALE et al., 1999).

O efeito da idade da égua doadora de embrião nas taxas de prenhez foram investigados. Vogelsang e Vogelsang (1989) verificaram que embriões de éguas entre 2 e 8 anos (59/84, 70%) resultaram em mais prenhezes comparando-se com éguas entre 9 e 17 anos (50/97, 56%). Contrariamente, Carney et al. (1991) relataram que embriões de éguas entre 2 a 6 anos, 7 a 12 anos, 13 a 18 anos e mais que 19 anos resultaram em taxas de prenhez similares.

De acordo com Carnevale et al. (1993), um declínio na fertilidade associado com a idade ocorre antes da entrada do embrião no útero. Isso indica que as interações entre oócito e oviduto (baixas taxas de colheita) e /ou desenvolvimento do embrião dentro do oviduto (números de células embrionárias reduzidas e qualidade do embrião) estavam prejudicas em éguas idosas.

Carnevale et al. (2000), indicaram que anomalias morfológicas que não foram observadas no oócito de éguas jovens foram detectadas nos oócitos das éguas idosas.

A maior taxa de subfertilidade em éguas velhas pode resultar da fertilização de oócitos que não sofreram maturação meiótica adequada, ou porque os oócitos de éguas idosas podem ter maior prevalência de complementos cromossomais anormais (BRINSKO et al., 1994).

2.1.4 Técnico

A habilidade do técnico pode ser um fator muito importante na taxa de prenhez na transferência de embrião não cirúrgica (MCKINNON & SQUIRES,

1988b; SQUIRES & SEIDEL, 1995). A taxa de prenhez está relacionada ao técnico que realiza a transferência de embrião, e geralmente é mais alta para aqueles que realizam um grande número de transferências (HINRICHS & CHOI, 2005). Alguns experimentos foram realizados e as taxas de prenhez entre diferentes técnicos foram comparadas. Trinta e nove embriões foram transferidos por dois técnicos e 13 resultaram em gestação, sendo que 12 de 26 do técnico 1 e 1 de 13 do técnico 2 (SQUIRES et al., 1982a).

2.1.2 Progesterona e fertilidade

A progesterona é produzida pelo corpo lúteo (MCKINNON, 1993), formado após a ovulação de um folículo.

A concentração plasmática de progesterona só irá se elevar no plasma, na maioria das éguas, entre 10 e 12 horas pós-ovulação, mas existe uma variação individual bastante importante, podendo este aumento ocorrer entre 6 e 60 horas pós-ovulação (PLOTKA et al., 1975; TOWNSON et al., 1989).

No momento no qual a concentração atinge 1ng/ml, inicia-se o diestro (NEELY et al., 1979). Ela sofre um aumento contínuo rápido, atingindo um pico ao redor do dia 6, mantendo um platô (HUGHES et al., 1972). A concentração de progesterona atingiu valor de 7,7±3,8 ng/ml no dia 6 (SMITH et al., 1970). A progesterona atinge sua concentração plasmática máxima, de aproximadamente 10ng/mL, por volta do dia 5 a 7 pós-ovulação e é mantida até o dia 13 ou 14 pós-ovulação devido a luteólise que ocorre caso não exista o reconhecimento materno (HOLTAN et al., 1979). Autores encontraram valores médios de 10 ng/ml no dia 6 pós ovulação (STABENFELDT et al., 1971), 9,36 ng/ml no dia 8 (PLOTKA et al., 1971) e 5,49/ml no dia 5 (PLOTKA et al., 1972). Plotka et al encontrou valores entre 2,7 e 20,2 ng/ml no plasma.

Souza (2006) encontrou níveis de progesterona mais elevados dos que os descritos previamente na literatura, sendo que o grupo controle apresentou 8,42 ng/ml no dia 4 pós ovulação, e 16,08 no dia 8 pós ovulação. Nos grupos nos quais foi administrada a hCG para induzir a ovulação ou no dia 1 pós ovulação, as concentrações de progesterona no dia 4 foram de 16,01 e

14,85ng/ml respectivamente. Já no dia 8, a concentração foi de 16,08 e 17,31ng/ml, respectivamente.

Secreções do útero, chamadas de “leite uterino”, são aparentemente importantes na nutrição do concepto no inicio da gestação. A habilidade de o endométrio provir quantidade adequada de secreções depende em grande parte da progesterona. O total de proteína na secreção uterina ao longo do ciclo estral tem sido estudado e os resultados indicam que o conteúdo total cai abruptamente com o declínio da progesterona. Quando ocorre a manutenção do corpo lúteo e a produção de progesterona se mantém, o conteudo protéico da secreção uterina permanece elevado (ZAVY et al., 1979). A progesterona está associada com secreção de proteínas uterinas como a uteroferrina (SHARP,1992). Esta secreção parece ser tempo dependente, ocorrendo brevemente após a exposição do endométrio ao estrógeno seguido de progesterona (HINRICHS, 1989).

Concentrações reduzidas de progesterona podem ser associadas com perda embrionária espontânea e podem envolver luteólise induzida por endometrite, falha do concepto de bloquear a luteólise e a insuficiência luteal primária (BERGFELT et al., 1992).

Irvine et al. (1990) mensuraram o nível de progesterona de 179 éguas gestantes do dia 16 a 45 de gestação. Um total de 17 éguas sofreu perda embrionária, sendo que em apenas uma delas houve a queda da progesterona antecedendo a perda. Uma biópsia uterina foi realizada, e 7 das 17 éguas tinham biópsia endometrial classificada como grau IIB e III. Conclui-se, portanto, que a perda embrionária entre os dias 18 e 45 raramente é causada por insuficiência de progesterona (IRVINE et al., 1990). Papa et al. (1994) também avaliaram a causa da perda embrionária acompanhando as concentrações de progesterona de éguas prenhes. As concentrações de progesterona das éguas que sofreram perda ou não, foram semelhantes. Todos os animais que apresentaram perda embrionária apresentavam sintomas de endometrite aguda ou crônica, com graus de biópsia uterina variando de IIA (n=2), IIB (n=14) e III (n=1). Concluíram então que a endometrite foi a principal causa da perda embrionária. Apesar das éguas apresentarem o endométrio comprometido, nenhuma delas sofreu luteólise secundária.

Douglas et al. (1985) citam o nível de 2,5 ng/ml enquanto Shideler et al. (1982) falam em 4 ng/ml como sendo o valor crítico para a manutenção de gestação. Outro estudo indicou o nível de 2,5 ng/ml como sendo o mínimo requerido para a manutenção da gestação. Neste mesmo estudo, foi verificado que altas concentrações de progesterona (>20ng/ml) não incrementam as taxas de prenhez (KNOWLES et al., 1993). Concentrações de progesterona entre 2,2 e 25,2 ng/ml não afetaram as taxas de prenhez e a perda embrionária (KNOWLES et al., 1993). De acordo com Allen, a concentração de progesterona de 2 ng/ml foi suficiente pra manter a gestação (ALLEN, 1974).

Adams et al. (1987) observaram que éguas com fluido intraluminal apresentaram menor taxa de gestação e maior perda embrionária do que éguas sem fluido intraluminal As concentrações de progesterona foram significativamente menores no dia 8 nas éguas com fluido intraluminal e no dia 11 em éguas que tiveram perda embrionária, comparando com as que mantiveram a gestação. Concluíram que a baixa taxa de prenhez nas éguas com fluido era decorrente de uma inflamação uterina e subseqüente queda na concentração de progesterona devido a luteólise.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivos:

- **Avaliar o efeito do dia do ciclo da receptora sobre as taxas de prenhez pós transferência de embrião;**
- **Avaliar o efeito do tônus e morfoecogenicidade uterina nas taxas de prenhez de receptoras de embrião;**
- **Relacionar a concentração plasmática de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião classificadas como marginais e aceitáveis e apresentando diferentes tônus e padrões de morfoecogenicidade uterinas.**

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local

Este experimento foi realizado na Central Fleury Reprodução Eqüina, na fazenda Santa Cruz, localizada no município de São José do Rio Pardo, SP (21º 35' Latitude Sul e 46º 54' Longitude Oeste).

4.2 Animais

Para avaliar o efeito do dia do ciclo da receptora sobre as taxas de prenhez pós TE foram utilizados 905 embriões de 597 doadoras de embrião. Para avaliar o efeito da morfoecogenicidade e tônus uterino no dia da TE, sobre as taxas de prenhez, 666 embriões foram utilizados provenientes de 464 doadoras de embrião. Em ambos, as doadoras eram de diferentes raças: Mangalarga, Mangalarga Marchador, Campolina, Brasileiro de Hipismo, Cavalo de Pólo, Árabe e Quarto de Milha, com idades entre 2 e 25 anos.

Para a análise de concentração plasmática de progesterona nos dias 4 e 8 pós ovulação, foram utilizadas 79 éguas, sendo 49 no dia 4 pós ovulação e 30 no dia 8 pós ovulação.

Foram utilizadas éguas sem raça definida como candidatas à receptora, entre 3 e 15 anos.

Apenas os animais que foram considerados aptos, foram incluídos no experimento. Para serem considerados aptos, deveriam apresentar os seguintes pré-requesitos: ausência de alterações em útero e ovário, detectáveis à palpação retal e ultra-sonografia; ciclicidade regular após a observação de dois ciclos consecutivos; boa condição corporal e ausência de alterações clínicas.

4.3 Manejo Reprodutivo

As colheitas e transferências dos embriões foram realizadas entre setembro de 2003 a março de 2007, incluindo desta forma as estações reprodutivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007. As coletas de

sangue para mensuração de progesterona sérica foram realizadas de novembro de 2006 a março de 2007.

4.3.1 Doadoras

As fêmeas doadoras permaneceram em pastagens de coast cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers), recebendo 2 kg de concentrado balanceado, água e sal mineral *ad libitum.* Estes animais ficavam alojados na central ou nos haras aos quais pertenciam.

As fêmeas doadoras eram avaliadas por palpação retal e ultrasonograficamente (Aloka SSD 500,Aloka Co. Ltda, Tokyo, Japão, equipado com transdutor trans-retal de 5,0Mhz).

Os animais que apresentavam folículo com diâmetro igual ou maior do que 35 mm, com presença de dobras endometriais, recebiam a aplicação de 2500UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana), um indutor de ovulação (Vetecor®, Laboratório Calier, Espanha), na dose de 2500UI, intravenoso, e eram inseminadas no dia seguinte com sêmen fresco ou resfriado. A inseminação era repetida a cada 48 hs, até a detecção da ovulação.

A dose inseminante mínima utilizada era de 500 milhões de espermatozóides viáveis, sendo o sêmen diluído em diluente a base de leite em pó desnatado, glicose e antibióticos, segundo Kenney et al., (1975).

Todos os dados obtidos nos exames eram anotados em fichas de controle individuais.

4.3.2 Receptoras

As fêmeas receptoras de embrião eram mantidas em pastagens formadas por gramínea batatais (*Paspalum notatum* Flugge), coast cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) e Aruanã (*Panicum Maximum* cv. Aruana), recebendo 1,5kg de concentrado balanceado e 2 kg de aveia preta (*Avena strigosa*), com sal mineral *ad libitum*.

As éguas receptoras foram observadas para a detecção de estro uma vez ao dia, com a utilização de um rufião deferectomizado. O animal detectado com sintomas de estro era submetido à palpação retal e ultra-sonografia, sendo estes exames repetidos diariamente até o dia da ovulação. Os animais que ovularam, e que estavam entre 3 a 8 dias pós ovulação, eram avaliados toda vez que um embrião iria ser transferido. Esta avaliação, que era realizada sempre pelo mesmo técnico, consistia na palpação retal com a avaliação do tônus uterino utilizando os escores 1 (mais tenso), 2 (tenso porém um pouco menos do que 1), 3 (útero mais flácido do que 1 e 2, porém ainda diferente do tônus encontrado no estro) e 4 (flácido, tônus encontrado no estro). Em seguida, a ultra-sonografia era realizada, para a detecção do corpo lúteo, e a avaliação da morfoecogenicidade do útero, sendo os escores 1 (útero homogêneo, ecogênico, com pouca diferença entre miométrio e endométrio e com formato tubular), 2 (útero heterogêneo, com mais diferença entre miométrio e endométrio do que o escore 1, formato tubular), 3 (maior diferencça entre miométrio e endométrio do que os escores 1 e 2, mais heterogêneo, sendo as dobras endometriais ausentes) e 4 (útero heterogêneo, pouco ecogênico, com muita diferença entre miométrio e endométrio, com formato pouco tubular, já havendo presença de dobra endometrial), como demonstrado na Figura 1. Baseado no tônus e morfoecogenicidade uterinos, as éguas eram classificadas em aceitáveis, marginais e reprovadas. Era considerada aceitável aquela que apresentava tônus 1 e 2 e morfoecogenicidade 1 e 2. Marginal era a receptora que apresentava tônus ou morfoecogenicidade 3. As receptoras reprovadas eram aquelas que tinham um dos parâmetros 3 e o outro 4 ou ambos 4.

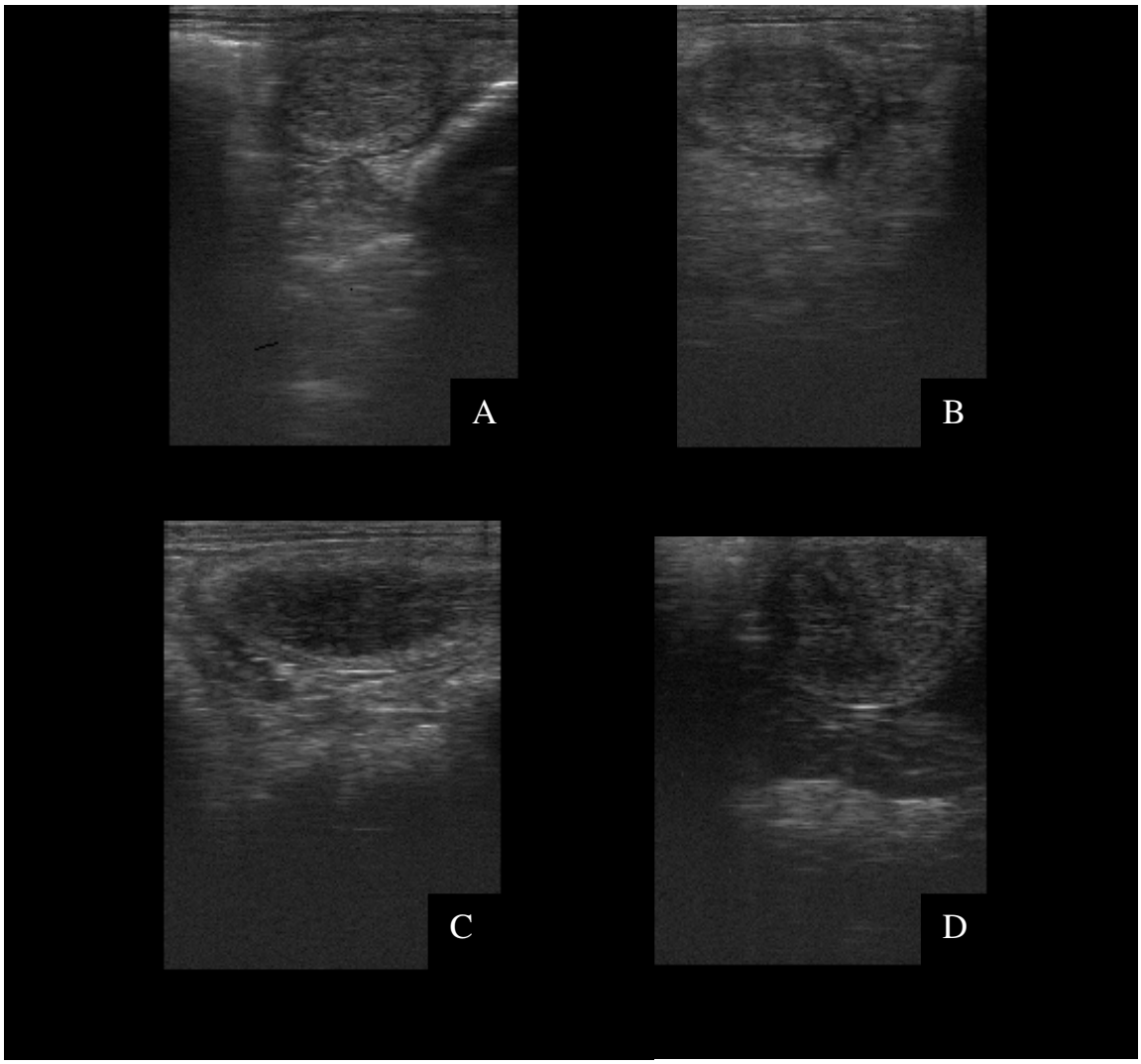


FIGURA 1. Diferentes padrões de morfoecogenicidade uterina. . Morfoecogenicidade 1 (A); Morofoecogenicidade 2 (B);. Morfoecogenicidade 3 (C) ;Morfoecogenicidade 4 (D).

As receptoras que tiveram um embrião transferido eram submetidas à avaliação ultra-sonográfica para diagnóstico de gestação 5 a 7 dias após a transferência.

4.4 Colheita dos embriões

O método de colheita utilizado foi o não cirúrgico, sistema aberto, sendo adaptado da metodologia descrita por Squires et al. (1985). As colheitas eram realizadas no dia 7, 8 ou 9 pós ovulação da égua doadora. Catéteres Bivona® (Bivona Medical Technologies,. Gary, IN, EUA) com balonete de 75 mL de capacidade, de cerca de 140cm de comprimento adaptados a mangueira plástica também siliconizada, foram utilizados. O catéter era colocado manualmente através da vagina, sendo introduzido através da cérvix, até atingir o corpo do útero. acoplada a um frasco de Ringer com Lactato de Sódio (J.P. Indústria Farmacêutica-Ribeirão Preto-SP), (Alvarenga et al., 1993). Em seguida, o balonete era inflado com 40 mL de ar, para que houvesse a fixação do cateter no interior do útero, sendo então tracionado para trás para que houvesse a oclusão da cérvix. Após a fixação do catéter, 1 L de Ringer com Lactato era infudido por pressão no útero. Massagem uterina por via retal era realizada de forma vigorosa, afim de que o Ringer atingisse todas as porções do útero. Em seguida, com a massagem sendo realizada, o Ringer era retirado por sifonagem, sendo diretamente filtrado. O filtro utilizado possui uma malha de 75µm para que o embrião seja retido. Este processo era repetido 3 vezes. Após cada drenagem do útero, uma inspeção visual era realizada no filtro, para uma possível localização do embrião. Uma vez que o número de embriões detectados no filtro era correspondente ao número de ovulações apresentadas pela égua, o procedimento era terminado. Toda a solução infundida era retirada completamente do útero.

Após a realização de cada colheita, as éguas doadoras recebiam 1 ml intramuscular de Lutalyse®, (prostaglandina $F2_{\alpha}$, dinoprost trometamina, 6,71mg/ml, Pharmacia, São Paulo-SP) com o objetivo de causar a lise do corpo lúteo, fazendo com que o animal retornasse o mais rapidamente ao estro.

4.5 Manipulação e classificação dos embriões

Após o término de todo o processo da colheita de embrião, o líquido remanescente no filtro era então colocado em uma placa de Petri siliconizada descartável, de 100 x 20mm, com linhas guia traçadas no fundo. A procura dos embriões era realizada em um estereomicroscópio com aumento de 10 vezes. Quando localizados, os embriões eram colocados em uma nova placa de Petri estéril, tampada, em um meio de manutenção Vigro® (Bioniche, Canadá).

No processo de manipulação dos embriões, palhetas de congelamento de sêmen (IMV, França), de 0,25 e 0,5 mL foram utilizadas, de acordo com o diâmetro do embrião obtido, para evitar qualquer lesão.

Esta placa continha de 8 a 10 gotas deste meio de manutenção, através das quais o embrião era passado e manipulado, com o intuito de diminuir a contaminação.

Em seguida, eles eram avaliados em aumento de 40x para a classificação morfológica e de qualidade, de acordo com McKinnon & Squires, (1988)a. Apenas embriões classificados como graus 1 e 2 foram utilizados neste experimento.

4.6 Transferência dos embriões

No experimento, um total de 905 transferências de embrião não cirúrgicas foram realizado. As receptoras nas quais os embriões foram transferidos estavam entre 3 e 8 dias pós ovulação. A escolha da receptora mais adequada foi realizada como descrito anteriormente.

No momento antecedente à transferência do embrião, a égua receptora recebia uma dose de 10 mg de Acepromazina (Rhobifarma, São Paulo-SP) por via endovenosa, com o objetivo de obter uma tranquilização, redução no estresse, e relaxamento da musculatura vulvar.

A higinenização da região perineal era realizada com a utilização de detergente e iodo povidona a 2%. Em seguida, a região era seca com papel.

Havia dois possíveis métodos de transferência dos embriões, de acordo com o seu tamanho. A pipeta (PROVAR, São Paulo-SP) para inseminação

artificial, com 60 cm de comprimento, acoplada a uma seringa de 1mL, foi utilizada para a transferência dos embriões maiores da seguinte forma: uma coluna de meio de manutenção era colocada inicialmente + coluna de ar + coluna de meio + coluna de ar + coluna de meio com o embrião + coluna de ar. As colunas de ar e meio tinham como objetivo auxiliar a saída do embrião da pipeta para o interior do útero.

Os embriões menores eram acondicionados em palhetas de 0,25 mL, da mesma forma como era feito com a pipeta. Em seguida, a palheta era colocada no interior de uma bainha francesa (Cultilab, Campinas-SP) com um aplicador.

A transferência era realizada por via transcervical, na qual tanto a pipeta como a bainha francesa eram protegidas por uma camisa sanitária (IMV, França) objetivando evitar a entrada de agentes contaminantes presentes na vagina e vestíbulo, para o interior do útero (SQUIRES et al., 1982b).

A mão do técnico, revestida por uma luva de palpação reta, lubrificada com gel natrosol era introduzida pela vulva, através da vagina. Quando a cérvix era localizada, e sua tensão e integridade eram avaliadas.

Em seguida, a extremidade da pipeta ou bainha francesa era colocada sob a mão enluvada e introduzida na vagina. Quando localizada a cérvix, o instrumento era posicionado na abertura cervical e introduzido aproximadamente 5mm, onde a camisa sanitária era rompida. Após a ruptura da camisa, o instrumento era colocado cerca de 7 a 10 cm no interior do útero, até sentir a parede do corpo do útero. Então o instrumento era afastado cerca de 1,5cm da parede do útero. Em seguida, era realizada a transferência pressionando-se o inovulador ou a seringa conectados a ele.

4.7 Colheita de amostra de sangue para dosagem de progesterona

As amostras de sangue para dosagem de progesterona foram colhidas da veia jugular de 79 receptoras, em tubos providos de vácuo e heparinizados. A amostra era colhida no dia da avaliação da égua candidata a receptora,

sendo 4 ou 8 dias após a ovulação (D4 ou D8) aproximadamente no mesmo horário do dia (9:00horas da manhã).

Após a colheita, as amostras eram centrifugadas, o plasma retirado e armazenado em tubos de microcentrifugação a -18º C para as avaliações hormonais.

As amostras foram quantificadas em suas concentrações plasmáticas de progesterona, através de procedimento de radioimunoensaio, utilizando-se kit comercial para progesterona fase sólida (Coat A-Count Diagnostics Products Corporation) no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu.

O erro intra **ensaio foi de 1,91%.**

4.8 Análise estatística

A comparação entre as taxas de prenhez das receptoras em diferentes dias pós ovulação no dia da TE foi realizada por qui-quadrado ao nível de significância de 5%.

Para a avaliação do efeito das características uterinas sobre as as taxas de gestação utilizou-se o teste Qui-quadrado ao nível de significância de 5% . Quando o número de observações era menor que cinco indivíduos aplicou-se o teste exato de Fisher.

A comparação entre as concentrações de progesterona entre o dia 4 e 8 pós ovulação foi realizada com o teste t.

A comparação das concentrações plasmáticas de progesterona entre as receptoras classificadas como marginal ou aceitável dentro do dia 4 e 8 pós ovulação foi feita utilizando ANOVA.

A análise das concentrações plasmáticas de progesterona para as características uterinas tônus e morfoecogenicidade nos dias 4 e 8 pós ovulação foi feita com o teste t.

5. RESULTADOS

As taxas de prenhez das receptoras de embrião transferidas entre os dias 3 a 8 pós ovulação não foram diferentes estatisticamente, como demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1. Taxa de prenhez no dia 15 do embrião em éguas receptoras nos dias 3 a 8 pós ovulação no dia da TE.

Dia do Ciclo	N	Taxa de Prenhez (%)
3	83	75,90[a]
4	198	71,72 [a]
5	228	71,49 [a]
6	173	69,36 [a]
7	147	76,87 [a]
8	76	68,42 [a]

p>0,05

Foi avaliada a influência das diferentes morfoecogenicidades uterinas no dia da TE das receptoras de embrião sobre a taxa de prenhez. As taxas de prenhez para as morfoecogenicidades uterinas 1 e 2 não apresentaram diferença estatística (p>0,05), porém foram significativamente menores para a morfoecogenicidade 3, quando comparado com 1 e 2, com p<0,05. A morfoecogenicidade 4 diferiu significativamente das outras 3, tendo sido a que apresentou a menor taxa de prenhez (p<0,05). As relações entre as diferentes

morfoecogenicidades uterinas e taxa de prenhez estão representadas na Tabela 2.

TABELA 2. Taxa de prenhez no dia 15 do embrião em receptoras com diferentes morfoecogenicidades uterinas (1 a 4) no dia da TE.

Morfoecogenicidade Uterina	n	Taxa de Prenhez (%)
1	49	81,63 [a]
2	384	80,21 [a]
3	213	59,62 [b]
4	20	10,00 [c]

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$)

A influência do tônus uterino da receptora de embrião no dia da TE sobre as taxas de prenhez foi analisada. As éguas que apresentavam tônus uterino 1 apresentaram a maior taxa de prenhez, diferindo dos tônus 2 e 3, com $p<0,05$. A taxa de prenhez das éguas receptoras com tônus uterino 2 no dia da TE foi menor do que as que apresentavam tônus 1 e maior estatisticamente do que a taxa de prenhez das receptoras com tônus uterino 3 ($p<0,05$), que resultaram nas menores taxas de prenhez (Tabela 3).

TABELA 3. Taxa de prenhez no dia 15 do embrião em receptoras com diferentes tônus uterinos no dia da TE.

Tônus Uterino	n	Taxa de Prenhez (%)
1	119	92,44[a]
2	342	81,58 [b]
3	205	42,93 [c]

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,001).

Foram comparadas as concentrações plasmáticas das éguas candidatas a receptora de embrião. No dia 4 pós ovulação a concentração plasmática de progesterona foi estatisticamente menor do que no dia 8 pós ovulação, com p<0,0002.

Quando comparadas as concentrações plasmáticas de progesterona das éguas candidatas a receptora no dia 4 pós ovulação classificadas como marginais e aceitáveis, não foi encontrada diferença estatística, com p=0,88. Assim como quando comparadas as éguas classificadas como marginais e aceitáveis no dia 8 pós ovulação, suas concentrações de progesterona também foram semelhantes estatisticamente, com p> 0,50 (Tabela 4).

TABELA 4. Média e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) em éguas candidatas a receptora de embrião classificadas como marginal ou aceitável nos dias 4 ou 8 pós ovulação.

Dia Pós Ovulação	**Classificação da Receptora**		
	Geral (n)	**Marginal (n)**	**Aceitável (n)**
D4	8,61 ± 0,456 (49)	9,11 ± 0,73 (15)	8,61 ± 0,57 (33)
D8	13,51 ± 1,315 (30)	15,07 ± 2,03 (18)	10,1 ± 1,10 (6)

d4 p=0,88 d8 p=0,50

TABELA 5. Média e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) em éguas candidatas a receptora de embrião com diferentes padrões de morfoecogenicidade uterina nos dias 4 ou 8 pós ovulação.

Dia Pós Ovulação	**Morfoecogenicidade Uterina**	
	2 (n)	**3 (n)**
D4	8,91 ± 0,836 (20)	8,83 ± 0,518 (27)
D8	13,10 ± 0,302 (2)	13,54 ± 1,41 (28)

d4 p=0,93 d8 p=0,77

As éguas candidatas a receptora de embrião no dia 4 pós ovulação, que apresentavam os padrões de morfoecogenicidade uterina 2 e 3 não apresentaram concentração plasmática de progesterona estatisticamenticamente diferente, com p=0,93. Da mesma forma, a concentração plasmática de progesterona das éguas candidatas à receptora de embrião no dia 8 pós ovulação com os padrões de morfoecogenicidade uterinos 2 e 3 foram estatisticamente similares, com p= 0,77 (Tabela 5).

Comparando-se a concentração plasmática de progesterona no dia 4 pós ovulação das éguas candidatas à receptora que apresentaram tônus uterino 1 e 2, não foi detectada diferença estatística, com p=0,87.

No dia 8 pós ovulação, as éguas candidatas a receptora de embrião com tônus uterino 2, 3 e 4 também não apresentaram diferença estatística na concentração plasmática de progesterona, com p= 0,33 (Tabela 6).

.

TABELA 6. Média e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) em éguas candidatas a receptora de embrião com diferentes tônus uterinos (1 a 4) nos dias 4 ou 8 pós ovulação.

	Tônus Uterino			
Dia pós Ovulação	**1 (n)**	**2 (n)**	**3 (n)**	**4 (n)**
D4	8,55 ± 0,41 (7)	8,48 ± 0,644 (30)	--	--
D8	--	10,1 ± 1,10 (6)	15,07 ± 2,03 (18)	12,27 ± 1,633 (6)

D4 p=0,87 D8 p=0,33

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho nao foi encontrada diferença nas taxas de prenhez de éguas receptoras de embrião entre os dias 3 e 8 do ciclo. Na literatura, encontram-se vários trabalhos realizados para avaliar o grau de sincronia da doadora e receptora de embrião e sua influência sobre as taxas de prenhez. McKinnon et al. (1988) obtiveram taxas de prenhez semelhantes quando transferiram embriões em receptoras que ovularam um dia antes a 3 dias depois da doadora. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo, pois as éguas receptoras nele utilizadas haviam ovulado 1 dia antes da doadora até 6 dias depois da doadora, e as taxas de prenhez não apresentaram diferença estatística entre os distintos graus de assincronia. Está também de acordo com os resultados de Fleury et al. (1989), no qual foram transferidos embriões para 6 éguas que ovularam 3 dias depois da doadora e 3 éguas que ovularam 4 dias depois da doadora sendo que a taxa de prenhez foi semelhante às de receptoras com menor grau de assincronia. Foss et al. (1999) utilizaram receptoras que haviam ovulado 5 dias depois da doadora e também obtiveram bons resultados de prenhez (5/6; 83,3%), entretanto com número pequeno de animais neste grupo. Por outro lado, as taxas de prenhez do presente estudo para receptoras com maior grau de assincronia diferiram do que Vogelsang et al. (1985) obtiveram. Este grupo reportou 60% de prenhez quando utilizadas receptoras que ovularam 3 dias depois da doadora, concordando com o presente resultado. Entretanto, resultados negativos foram alcançados quando foram utilizadas receptoras que ovularam 4 a 6 dias depois da doadora, discordando do que foi aqui encontrado. Esta discordância de resultados pode ser devido a seleção da receptora no dia da TE, que neste presente estudo foi baseada nas características uterinas de tônus e morfoecogenicidade e não somente na sincronia entre doadora e receptora.

De acordo com Caiado et al. (2005) é possível a utilização de receptoras 2 dias após a ovulação, desde que seja feita uma suplementação com progesterona no dia da ovulação. As taxas de prenhez destas éguas foram comparáveis àquelas utilizadas 5 dias pós ovulação, enquanto que a taxa de prenhez das éguas no dia 2 pós ovulação sem nenhuma suplementação foi de

apenas 30%. Com isso, pode-se concluir que o dia 3 pós ovulação, no qual as taxas de prenhez deste estudo foram semelhantes aos demais dias, é o tempo mínimo para a utilização de receptoras sem necessidade de suplementação com progesterona exógena. A sincronização de uma receptora com a doadora torna-se mais fácil quando fica demonstrada que a utilização de receptoras tão cedo quanto o dia 3 pós ovulação é possível e proporciona a obtenção de taxas de prenhez comparáveis aos demais dias. Vale ressaltar que as receptoras utilizadas no presente estudo eram selecionadas através da avaliação da morfoecogenicidade e tônus uterino. Os animais que apresentavam características consideradas indesejáveis no dia 3 pós ovulação não foram utilizados. Ou seja, esses resultados de prenhez no dia 3 pós ovulação foram atingidos utilizando-se receptoras escolhidas com base em uma criteriosa avaliação.

Carnevale et al. (2000) sugeriu que o tempo de ovulação e não a sincronia entre doadora e receptora pode ser mais importante para a escolha da receptora para a TE.

Não foram encontrados na literatura consultada, trabalhos relacionando os diferentes padrões de morfoecogenicidade uterinos durante o diestro e as taxas de prenhez. O único trabalho encontrado que avaliou da mesma forma e com a mesma classificação a morfoecogenicidade uterina no diestro foi o de Souza (2006). Nele, foi demonstrado que a aplicação de hCG na indução da ovulação e no dia 1 pós ovulação aumentou o número de éguas candidatas a receptora de embrião com morfoecogenicidade uterina 1 e 2, sendo esta considerada uma característica desejável, porém neste trabalho não se avaliou as taxas de gestação. Baseando-se nos resultados por nós encontrados, a avaliação da morfoecogenicidade uterina deve ser utilizada como critério de seleção de uma receptora adequada, uma vez que obteve-se melhor taxa de prenhez de embriões transferidos em receptoras apresentando morfoecogenicidades 1 e 2.

Os resultados encontrados neste trabalho com relação ao tônus uterino apresentado pelas receptoras no dia da TE e a taxa de gestação estão em concordância com os descritos por Carnevale et al. (2000) que observaram que as taxas de prenhez de receptoras avaliadas no dia 5 pós ovulação foram

superiores para as receptoras que apresentaram tônus uterino excelente ou bom (70,6%) diferindo estatisticamente das que apresentaram tônus ruim a pobre (63,6%). Corroboram também com os resultados de DUARTE & VIEIRA (2003), cujas taxas de prenhez dos grupos das receptoras com tônus uterino ausente ou fraco foram estatisticamente diferentes dos grupos com bom tônus.

Carnevale et al. (2000) sugeriram que um tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não totalmente compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário. Demonstraram também que éguas que são classificadas como marginais apresentaram taxas de prenhez estatisticamente inferiores às das éguas classificadas como aceitáveis (70,3% versus 56,2%). A diferença entre estas éguas se deve basicamente ao tônus uterino e cervical, sendo que as éguas marginais apresentavam tônus reduzido em relação as aceitáveis.

Griffin et al. (1992) detectaram um aumento transitório de tônus no dia 6 do ciclo em éguas cobertas e não cobertas. Sugerindo-se que este aumento possa ter sido resultado de um aumento de estrógenos no diestro, pois relações temporais entre o pico no tônus uterino e aumento na secreção de estrógeno foram detectadas, além dos efeitos conhecidos dos esteroides exógenos no tônus uterino. A variação no tônus uterino de éguas candidatas à receptora de embrião no diestro existe e é facilmente detectada através da palpação retal. Entretanto, os fatores determiantes das diferenças de tônus num mesmo dia pós ovulação não são conhecidos.

Daels et al. (1991) detectaram um pico de estrógenos conjugados no dia 5 (concentração plasmática) e no dia 7 (concentrações urinárias) após um nível mais baixo no dia 1. As associações temporais entre o aumento de estrógenos reportado no diestro, o aumento transitório nas dobras endomentriais durante o inicio do diestro, e o tônus uterino aumentado, juntamente com os efeitos dos esteróides exógenos sob o tônus uterino, sugerem uma relação de causa e efeito entre o tempo de exposição ao estrógeno e um aumento transitório de tônus no início do diestro. Talvez, o aumento de estrógenos sobreposto ao ambiente de progesterona luteal resultem neste pico de tônus uterino observado (GRIFFIN et al., 1992). Com isso, a possibilidade de um efeito dos

níveis de estrógeno nas características uterina morfoecogenicidade e tônus durante o diestro pode ser especulada.

As concentrações plasmáticas de progesterona no dia 4 ou 8 pós ovulação encontradas neste estudo estão de acordo com a literatura. Plotka et al. (1971) apresentaram o valor de 9,36 ng/ml no dia 8 pós ovulação. Souza (2006) encontrou 8,42 ng/ml no dia 4 pós ovulação, e 16,08 ng/ml no dia 8 pós ovulação.

McCue et al. (1999), avaliaram a concentração plasmática de progesterona em éguas que qualificaram como potenciais receptoras de embrião. A concentração foi significantemente maior ($p<0.05$) nas éguas aprovadas do que em éguas que não passaram no exame (n=13) por dminuido tônus uterino e cervical (10,0±4,2 e 6,5±4,3 ng/ml, respectivamente). Diferindo destes resultados, as éguas com tônus uterino reduzido no presente trabalho apresentaram concentração plasmática de progesterona comparável àquelas com tônus uterino bom e excelente (1 e 2). É plausível propor que um outro fator, que não a concentração plasmática de progesterona, seja responsável pelos diferentes graus de tônus uterino apresentados pelas éguas no diestro. Sua identificação teria uma grande importância, pois foi aqui demonstrado que éguas receptoras com tônus uterino 1 e 2 apresentam taxas de prenhez significativamente superiores às receptoras com tônus uterino 3 e 4.

No trabalho de Souza (2006) foi sugerido que nos grupos onde uma maior concentração de progesterona plasmática foi observada, houve um maior número de receptoras aptas a receber um embrião, e que isto seria explicado por uma maior influência da progesterona do que do estrógeno na classificação da receptora. Entretanto, de acordo com os dados encontrados neste trabalho, não houve diferença estatistica na concentração plasmática de progesterona nas éguas classificadas como aceitáveis e marginais, indicando uma provável influência de algum outro fator ainda não determinado, que não a concentração plasmática de progesterona, na classificação das receptoras.

Ainda no trabalho de McCue et al. (1999), as 9 éguas reprovadas como receptoras devido a baixo tônus uterino e/ou cervical, apresentaram concentração plasmática de progesterona menor do que 4ng/ml. Esta redução de tônus uterino e cervical poderia ser conseqüência da baixa concentração de

progesterona circulante. O presente estudo discorda destes resultados, pois as concentrações de progesterona nas éguas com diferentes tônus uterinos não foram diferentes estatisticamente. Além disso, as éguas candidatas a receptora de embrião que apresentavam morfoecogenicidades distintas apresentaram concentração plasmática de progesterona estatisticamente semelhante. Com isso fica excluída a possibilidade da concentração plasmática de progesterona de ser responsável pelas diferentes morfoecogenicidades observadas.

O útero é capaz de seqüestrar grandes quantidades de esteróides ovarianos circulantes devido à presença de receptores com alta afinidade. O estrógeno e a progesterona regulam as atividades do útero durante o ciclo estral e gestação. As concentrações circulantes destes hormônios regulam as concentrações de receptores no endométrio. As concentrações de sítios ligantes é maior no estro e início do diestro, diminuindo com o decorrer do diestro (WATSON et al., 1992). A partir desta afirmação, pode-se especular que exista uma relação entre as concentrações de receptor de progesterona no endométrio com as variações nas características uterinas no momento da TE, no caso a morfoecogenicidade e tônus, que foram encontradas no presente estudo e que apresentaram relação com as taxas de prenhez pós TE.

Em humanos, já é conhecida a necessidade de um priming endometrial de estrógeno para que os efeitos progestacionais ocorram. Este priming estrogênico provoca a indução de receptores de estrógeno e progesterona (GARCIA et al., 1988). Provavelmente, a concentração de estrógeno durante o estro também afete a expressão de receptores de progesterona no endométrio e com isso, tenha relação com as características uterinas durante o diestro.

Navot et al.(1991) estudaram as conseqüências da flexibilidade do priming de estrógeno analisando a duração variável de estrogeno em ciclos de receptoras de oócitos humanos. Eles observaram que a fase de estrógeno poderia durar de 5 dias a 6 semanas sem alterar a qualidade de receptividade endometrial ao embrião. O que pareceu contribuir para um priming adequado de receptores de estrógeno e progesterona nas glândulas endometriais e no estroma foi uma exposição longa a níveis suficientes de estrógeno.

Hinrichs et al. (1986) reportaram transferência de embrião com sucesso em receptoras que receberam apenas progestágenos. Contudo, os resultados

alcançados foram 1 prenhez de 6 embriões transferidos (16,7%) para receptoras que receberam 22mg de altrenogest oral diário, 2 prenhezes de 6 (33,3%) para as que receberam 66mg de altrenogest oral diário e 2 de 5 (40%) nas que receberam 300mg de progesterona em óleo intramuscular. Apenas o primeiro tratamento diferiu estatisticamente das éguas controle, para as quais a taxa de prenhez foi de 68%. Apesar de resultar em gestação, o primeiro tratamento resultou em éguas com tônus cervical e uterino ruins. No segundo tratamento, as éguas apresentavam tônus cervical fraco a bom e tônus uterino fraco a ruim no momento da transferência. Esses resultados podem indicar a importância do priming de estrógeno na resposta uterina à progesterona. Já Rocha Filho et al. (2004) utilizando éguas em anestro agregando ao protocolo um tratamento com 3 dias de estrógeno antes da aplicação da progesterona, atingiu taxas de prenhez semelhantes aquelas de éguas ciclantes, demonstrando desta forma que o estrógeno pode explicar a diferença entre estes dois estudos e fortalecer a idéia de que o estrógeno seja necessário para a ação da progesterona. Com isso, pode-se questionar se apenas a progesterona seria suficiente para preparar o endométrio para a gestação.

De acordo com Knowles et al. (1993), um nível plasmático de progesterona de 2,56ng/ml foi suficiente para manter a gestação em éguas. Ainda afirmaram que altas concentrações de progesterona (>20ng/ml) não aumentaram as taxas de prenhez, enfatizando desta forma, que a progesterona é necessária em quantidade mínima, mas que o aumento de concentração não apresenta efeitos benéficos na taxa de prenhez. Neste presente estudo, ficou claro que existe diferença entre as éguas candidatas a receptora de embrião no que diz respeito às suas características uterinas no dia da TE, e que provavelmente, estas diferenças não são causadas pelos níveis séricos de progesterona.

DeFranco (2002) afirmou que as ações dos hormônios esteróides são mediadas pelos receptores localizados no núcleo das células. Os hormônios esteróides se ligam a seus receptores, e este complexo receptor-ligante age como fatores de transcrição que interagem diretamente com o DNA para regular a expressao gênica (CLARK, 1987). Semelhante ao que acontece em ovinos, os resultados encontrados com cavalos sugerem que a expressão endometrial de receptores de estrógeno e progesterona sejam positiva e

negativamente regulados pelos níveis circulantes de estrógeno e progesterona, respectivamente (HARTT et al., 2005). A aplicação de estradiol (5mg) não afetou a concentração de receptor de estrógeno nas 0, 3, 6, 9 e 12 h após a administração, porém houve uma marcada indução de receptores de progesterona na 9h no tecido endometrial, da ordem de 9 vezes no DNA do receptor (PELEHACH et al., 2002).

Sabidamente, a progesterona influencia as secreções histiotróficas uterinas, presumidamente auxiliando a sobrevivência do embrião e na manutenção da gestação (SPENCER et al., 2004).

Com base nestas informações, é plausível hipotetizar sobre o envolvimento da expressão dos receptores de progesterona no endométrio, pois a ação da progesterona é mediada através deles. Onde uma maior concentração de receptores de progesterona no endométrio associada a níveis séricos suficientes de progesterona, poderia determinar uma melhor capacidade de secreção histiotrófica do endométrio, melhorando as condições nutricionais do embrião e com isso incrementaria as taxas de prenhez. O que poderia explicar as diferenças observadas nas taxas de prenhez de éguas receptoras de embrião.

Alguns dos efeitos do estrógeno e da progesterona parecem levar em conta um nível ótimo atingido para que seu efeito ocorra. Nesse caso, o aumento acima desses níveis não tem conseqüências práticas, sendo denomidado este efeito de controle permissivo (ZIEGLER et al., 1998). Esta seria uma alternativa para explicar o porquê de um nível alto de progesterona não provocar um aumento nas taxas de prenhez.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- O dia do ciclo das receptoras utilizadas não exerceu influência negativa sobre as taxas de prenhez;

- O tônus e morfoecogenicidade uterina da receptora no dia da TE exerceu efeito sobre as taxas de prenhez, onde os melhores indicem podem ser obtidos utilizando-se receptoras com endométrio homogêneo, ecogenicidade uniforme, útero tubular com bom tônus;

- A concentração plasmática de progesterona não interfere no padrão de tônus e morfoecogenidade uterino, não sendo portanto, um bom parâmetro para seleção da receptora.

8. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; IRVINE, C.H.G. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, Suppl, p.445-454, 1987.

AGUILAR, J.J.; LOSINNO, L.; KONCURAT, M.; MIRAGAYA, M.H. Nuclear, cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in young and aged mares. **Theriogenology**, v.58, p.689-692, 2002.

ALLEN, A.W. Blood progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant mares. **Equine Veterinary Journal**, v.6, n.2, p.87-93, 1974.

ALONSO, M.A.; FLEURY, P.D.C.; NEVES NETO, J.R.;MACHADO, M.S.Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÔES, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.33 (supl. 1), p.204, 2005.

ALVARENGA, M.A.; ALVARENGA, F.C.L.; MEIRA, C. Modifications in the technique used to recover equine embryos. **Equine Veterinary Journal,** suppl. 15, p.111-12, 1993

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. Existem relacoes entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science,** v.38, n.5, p.233-239, 2001.

BALL, B.A.; HILLMAN, R.B.; WOODS, G.L. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v.28, p.167-174, 1987.

BALL, B.A.; LITTLE T.V.; WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Survival of day-4 embryos from young mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.85, p. 187-194, 1989.

BALL, B.A. Embryonic death in mares. In: McKinnon, A.O. Voss, J.L. (eds), **Equine Reproduction,** Philadelphia, Lea & Febiger, p. 523-524, 1993.

BERGFELT, D.R.; WOODS, J.A.; GINTHER, O.J. Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. **Journal of Reproduction and Fertility** , v.95, p.339-347, 1992.

BONAFOS, L.D.; CARNEVALE, E.M.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. **Theriogenology,** v.42, p.1247-1255, 1994.

BRINSKO, S.P.; BALL, B.A.; MILLER, P.G.; THOMAS, P.G.; ELLINGTON, J.E. In vitro development of day 2 embryos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. **Journal of Reproduction and Fertility,** v.102, p.371-378, 1994.

BRUYAS, J.F.; BATTUT, I.; POL, J.M.; BOTREL, C.; FIENI, F.. TAINTURIER, D. Quantitative analysis of morphological modifications of 6,5 horse embryos after treatment with 4 cryoprotectants. **6th International Symposium on Animal Reproduction,** Caxambu-MG, Brasil, p. 83-84,1994.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A., SILVA, J.F.S., FONTES, R.S. Tratamento de éguas de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. Comparison of Ham´s F-10 with CO2 or Hepes buffer for the 24 hr storage of equine embryos at 5o C. **Journal of AnimL Science,** v.65, p.1775-1781, 1987.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v.37, p. 1101-1115, 1992.

CARNEVALE, E.M.; GRIFFIN, P.G; , O.J. Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus in mares. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.15, p.31-35, 1993.

CARNEVALE, E.M.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; SCHMITT, S.J.; GATES, H.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. **Theriogenology,** v.51, issue1, p.299, 1999.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

CARNEVALE, E.M.; ELRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V. How to collect and vitrify equine embryos for direct transfer. **Proceedings of American Association of Equine Practioners**, v.50, 2004.

CARNEY, N.J.; SQUIRES, E.L.; COOK, V.M.; SEIDEL, G.E.; JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v.36, no1, p.23-32, 1991.

CLARK, K.E.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O., SEIDEL, G.E. Viability of stored equine embryos. **Journal of Animal Science**, v.65, p.534-542, 1987.

DAELS, P.F.; AMMON, D.C.; STABENFELDT, G.H.; LIU, I.K.M., HUGHES, J.P.; LASLEY, B.L. Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in non pregnant and early pregnant mares. **Theriogenology,** v.35**,** 1001-1017, 1991.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The Normal Estrous Cycle. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 14, p. 121-132.

DE FRANCO, D.B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. **Molecular Endocrinology,** v.16, p.1449-1455, 2002.

DOUGLAS, R.H. Some aspects pf equine embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertlity Supplement**, v.32, p.405-408, 1982.

DOUGLAS, R.H.; BURNS, P.J.; HERSHMAN, L. Physiological and commercial parameters for producing progeny from subfertile mares by embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Supplement 3**, p.111-114, 1985.

DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C. Efeito da fenilbutazona sobre as taxas de prenhez em éguas receptoras de embrioes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.322, 2003.

ELRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V.; SEIDEL, G.E.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1308-1319, 2005.

FLEURY, J.J.; COSTA NETO, J.B.F.; ALVARENGA, M.A. Results from an embryo transfer programme in Brazil. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.8, p.73-79, 1989.

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

FLEURY, JJ; FLEURY, P.D.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham´s F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18 º C-preliminary results. **Theriogenology**, v.58, p.749-750, 2002.

FLEURY, P.D.C. **Taxa de prenhez e concentrações plasmáticas de progesterona em éguas receptoras de embrião submetidas a diferentes tratamentos hormonais no dia da inovulação.** Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

FLEURY, P.D.C.; NEVES NETO, J.R.; ALONSO, M.A.; SQUIRES, E.L. Taxa de gestação após transferencia não cirurgica de embrioes equinos mantidos em meio Emcare ou Vigro por 18hs entre 15 e 20º C. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÔES, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.33 (supl. 1), p.205, 2005.

FLEURY, P.D.C..; ALONSO, M.A.;BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.34 (supl. 1), p.502, 2006.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; SOUZA, F.A.C.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Uso da gonadotrofina corionica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Ver Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v.31, n.1, p.27-31, 2007.

FOSS, R.; WIRTH, N.; SCHILTZ, P.; JONES, J. Nonsurgical embryo transfer in a private practice. **Proceedings of the American Association of Equine Practioners**, v.45, p.210-212, 1999.

FOSS, R.; CRANE, A. Serum progesterone changes in embryo transfer recipients. **Proceedings of the American Association of Equine Practioners**, Colorado, www.ivis.org , 2004.

GARCIA, E.; BOUCHARD, P.; DE BRUX, J. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrail dating. **Journal of Endocrinology Metabolism,** v.67, p.80-87, 1988.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects** (2nd ed). EquiServices, Cross Plains, WI, p.299-300, p. 499-545, 1992.

GRIFFIN, P.G.; HERMENET, M.J.; GINTHER, O.J. A transient increase in uterine tone during early diestrus in mares. **Theriogenology,** v.37, p.1185-1190, 1992.

HARTT, L.S.; CARLING, S.J.; JOHNSON, G.A.; VANDERWALL, D.K.; OTT, T.L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction,** v.130, p.241-250, 2005.

HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology,** v.25, n.4, p.581-590, 1986.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; CUMMINGS, M.R. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: s preliminary study. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.3, p.74-75, 1985.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; KENNEY, R.M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. **Theriogenology,** v. 26, n.4, p.455-460, 1986.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; PALMER,E. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.80, p.395-401, 1987.

HINRICHS, K.; KENNEY, R.M.; SHARP, D.C. Differences in protein content of uterine fluid related to duration of progesterone treatment in ovariectomized mares used as embryo transfer recipients. **Equine Veterinary Journal,** Suppl. 8, p.49-55, 1989.

HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. **Animal Reproduction Science,** v.33, p.227-240, 1993.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice,** p.210-218, 2005.

HOLTAN, D. W.; SQUIRES, E. L.; LAPIN, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, v. 27, p. 457-463, 1979.

HUDSON, J.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M., WELCH, S., SQUIRES, E.L. The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, no2, 2006.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practioners,** p.119-52, 1972.

IMEL, K.J.; SQUIRES, E.L.; ELSDEN, R.P.; SHIDELER, R.K. Collection and transfer of equine embryos. **Journal of American Veterinary Medicine Ass** v.179, p.987-991, 1981.

IULIANO, M.F.; SQUIRES, E.L.;COOK, V.M. Effect of age of equine embyos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science,** v.60, p.258-263, 1985.

IRVINE, C.H.G.; SUTTON, P.; TURNER, J.E.; MENNICK, P.E. Changes in plasma progesterone concentrations from Days 17 to 42 of gestation in mares maintaining or losing pregnancy. **Equine Veterinary Journal,** v.22, p.104-106, 1990.

JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. **Theriogenology,** v.58, p.713-715, 2002.

KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon – tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 703-714, 1997.

KNOWLES, J.E.; SQUIRES, E.L.; SHIDELER, R.K.; TARR, S.F.; NETT, T.M. Relationship pf progesterone to early pregnancy loss in mares. **Journal of Equine Veterinary Science,** v.13, n.9, p.528-533, 1993.

LASCOMBES, F.A.; PASHEN, R.L. Results from an embryo freezing and oist-ovulation breeding in a commercial embryo transfer program. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v.3, p95-96, 2000.

LEAL, L.S. **Avaliações ovarianas, níveis hormonais e aspectos quantitativos e qualitativos da transferencia de embrioes em bovinos**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Botucatu- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

LEGRAND, E.; KRAWIECKI, J.M.; TAINTURIER, D.; CORNIÈRE, P.; DELAJARRAUD, H.; BRUYAS, J.F. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? **5th International Symposium on Equine Embryo Transfer.** Saari, Finland.p.34, 2000.

LEGRAND, E.; BENCHARIF, D.; BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; BRUYAS, J-F. Comparison of pregnancy rates of days 7-8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule. **Theriogenology**, v.58, p.721-723, 2002.

LOSINNO, L.; ALONSO, C.; CASTANEIRA, C. Escore na biópsia endometrial e aptidão reprodutiva em éguas receptoras de embrião - resultados parciais. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÔES, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.33 (supl. 1), p.201, 2005

LOSINNO,L. & ALVARENGA, M.A. Fatores criticos em programas de transderencia de embrioes em equinos no Brasil e Argentina. . In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÔES, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 34, p.39-49, 2006.

MARTIN, J.M.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; CARNEY, N.J. Effect of storage of equine embryos at 5o C for 18 and 36 hours. **Theriogenology**, v.35, n.1, p-238, 1991.

MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; KEITH, S.L.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology**, v.51. issue1, p. 267,1999.

MCCUE, P.M. SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C.; SQUIRES, E.L. Pregnacny rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham´s F-10 versus Emcare ™ embryo holdind solution. In: **Proccedings of the Annual Conference of Society of Theriogenology**; 2000, p.147.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Morphological assessment of the equine embryo. **Journal of American Veterinary Medicine Association,** v.192, p.406-416, 1988.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Journal of American Veterinary Medicine Association,** v.192, p.305-333, 1988.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; HERMENET, M.J. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology,** v.29, n.5, p.1055-1063, 1988.

MEIRA, C.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; OBA, E.; LANDIM E ALVARENGA, F.C. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. **Equine Veterinary Journal Supplement.**, v.15, p.64-66, 1993.

MORTENSEN, C.; CHOI, Y.H.; HINRICHS, K.; ONG, N.; KRAEMER, D.; VOGELSANG, S.; VOGELSANG, M. Effects of exercise on embryo recovery rates and embryo quality in the horse. **Animal Reproduction Science,** v.94, p.395-397, 2006.

NAVOT, D.; BERGH, P.A.; WILLIAMS, M.; GARRISI, G.J.; GUZMAN, I.; SANDLER, B.; FOX, J.; SCHREINER-ENGEL, P.; HOFMANN, G.E.; GRUNFELD, L. An insight into early reproductive processes through the in vivo model of ovum donation. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.72, p.408-414, 1991.

NEELY, D.P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E.; HUGHES, J.P. Prostaglandin release patterns in the mare. Physiological, pathophysiological and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility,** p.181-9, suppl 27, 1979.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical egg transfer in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, p.313-320, 1974.

OGURI N., TSUTSUMI Y. Non-surgical transfer of equine embryo.**Archive Andrology***,* v.5, p.108, 1980.

PAPA, F.O.; LOPES, M.D; ALVARENGA, M.A.; MEIRA, C.; LUVIZOTTI, M.C.R.; LANGONI, H.; RIBEIRO, E.F.; AZEVEDO, A.E.; BONFIN, A.C. Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects. **6th International Symposium on Equine Reproduction,** Caxambu, 1994.

PARRY-WEEKS, L.C.; HOLTAN, D.W. Effect of altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronized equine embryo recipients. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.35, p.433-438, 1987.

PASCOE, D.R.; LIU, K.M.; SPENSLEY, M.S.; HUGHES, J.P. Effect of endometrial pathology on the success of non-surgical embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 3, p.108-111, 1985.

PELEHACH, L.M.; GREAVES, H.E.; PORTER, M.B.; DESVOUSGES, A.; SHARP, D.C. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. **Theriogenology**, v.58, p.441-444, 2002.

PFAFF, R.T.; SEIDEL, G.E.; SQUIERS, E.L. Effects of glycerol and ethylene glycol on survival on survival of equine embryos. **Journal of Animal Science** v.72, Suppl1, 82, 1993.

PLOTKA, E.D. WHITERSPOON, D.M.; FOLEY, C.W. Luteal function in the mare as reflected by progesterone concentrations in peripheral blood plasma. **American Journal Veterinary Research**, v.35, n.5, p.917-920, 1972.

PLOTKA, E. D.; FOLEY, C. W.; WITHERSPOON, D. M.; SCHMOLLER, G. C.; GOESTSCH, D. D. Periovulatory changes in peripheral plasma progesterone and oestrogen concentrations in the mare. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 1359-1362, 1975.

POOL, K.F., WILSON, J.M., WEBB., G.W., KRAEMER., D.C., POTTER, G.D., EVANS, J.W. Exogenous hormone regimens to utilize successfully mares in dioestrus (days 2-14 after ovulation) as embryo transfer recipients. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.35, p.429-432, 1987.

RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal,** v.23, p.189-192, 1991.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSOA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A.Uso de progesterona de longa ação na preparação de éguas não ciclantes como receptoras de embrião. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÔES, Barra Bonita, **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.89, 2004.

SEIDEL, G.E. Cryopreservation of equine embryos. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1., p.85-99, 1996.

SHIDELER, R.K.. SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; Progestogen therapy of ovariectomized pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.** v.32, p.459-464, 1982.

SLADE, N.P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E.L. Cryopreservation of the equine embryo. **Equine Veterinary Journal Suppl.** v.3, p.40, 1985.

SMITH, I.D.; BASSETT, J.M.; WILLAMS, T. Progesterone concentrations in the peripheral plasma of the mare during the oestrus cycle. **Journal of Endocrinology,** v.47, p.523-524, 1970.

SOUZA, F.A.C.S. **Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas eqüinas canditadas a receptoras de embriões.** Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterina´ria e Zootecnia- Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAZER, F.W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus : insights from domestic animals. **Biology of Reproduction,** v.71, p.2-10, 2004.

SQUIRES, E.L.; IULIANO, M.F.; SHIDELER, R.K. Factors affecting success of surgical and non-surgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.17, p.35-41, 1982.

SQUIRES, E.L.; IMEL, K.J.; IULIANO, M.F. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.32, p.409-414, 1982.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J. Factors affecting success of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.3, p.92-95, 1985.

SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; SHIDELER, R.K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology,** v.29,n.1, p.55-70, 1988.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; MCKINNON, A.O. Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomized mares. **Equine Veterinary Journal Suppl** v.8, p.89-91, 1989.

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

SQUIRES, E.L. & SEIDEL, G.E. Collection and transfer of equine embryos. Animal Reproduction and biotechnology laboratory, **Colorado State University, Bulletin no.8**, 1995.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Cryopreservation of equine embryos. **Society for theriogenology proceedings for annual meeting,** Canada, p.152-155, 1997.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K. The current status of equine embryo transfer **Theriogenology,** v.51, p.91-104,1999.

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

SQUIRES, E.L. Perspectives on the use of biotechnologies in equine reproduction. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (suplemento 1), p.69-82, 2005.

SQUIRES, E.L. Factors affecting embryo recovery and pregnancy rates after embryo transfer. **Societá Italiana Veterinari per Equini- SIVE- XII Congresso Multisala, Bologna, I**taly, www.ivis.org , 2006

STOUT, T.A.E.; THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B. Effect of freeze-thawing on the cellular integrity of equine embryos. **Havemeyer Foundation Monograph series n.13,** p.51-53, 2003.

STANTON, M.B.; STEINER, J.B.; PUGH, D.G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, no.1, p,14-19, 2004.

STOUT, T.A.E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal,** v. 38. n.5, p.467-478, 2006.

TOWNSON, D. H.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Characterization of plasma progesterone concentrations for two distint luteal morphologie in mares. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 197-204, 1989.

VANDERWALL, D.K. Current equine embryo transfer techniques. In: Recent Advances in Equine **Theriogenology**, B.A.Ball, www.ivis.org, 2000.

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

VOGELSANG, S.G.; VOGELSANG, M.M. Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.8, p.71, 1989.

WILSHER , S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal,** v.38, n.5, p.428-432, 2006.

WOODS, G.L.; HILLMAN, R.B.; SCHLAFER, D.H. Recovery and evaluation of embryos from normal and infertile mares. **Cornell Veterinary**, v.76, p.386-394, 1986.

YAMAMOTO, Y.; OGURI, N.; TSUTSUMI, Y.; HACHINOHE, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl. ,**v.32, p.399-403, 1982.

ZAVY, M.T. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. J Reprod Fert Suppl 27, p.403-11, 1979.

ZIEGLER, D.; FANCHIN, R.; MOUSTIER, B.; BULETTI, C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. **Journal of Reproductive Immunology,** v.39, p.149-166, 1998.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os **artigos científicos**, **revisões** e **notas** devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 28 linhas em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações**. Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página. Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, quando for necessário o uso deve aparecer antes das referências. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas. (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes das referências. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas. (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, caso existam devem aparecer antes das referências. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas. (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista (www.scielo.br/cr).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. **Evitar abreviaturas e nomes científicos no título**. O nome científico só deve ser

empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:
AUDE, M.I.S. et al. (Mais de 2 autores) Época de plantio e seus efeitos na produtividade e teor de sólidos solúveis no caldo de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.2, p.131-137, 1992.

9.5. Resumos:
RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:
COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:
ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:
Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:
MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Artroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Capturado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: http://www.zh.com.br/especial/index.htm

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadros. As figuras devem ser enviadas à parte, cada uma sendo considerada uma página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 800 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Nos casos onde a concordância de todos autores não possa ser realizada por via eletrônica usando o cadastro (afiliação) completo dos autores, pode ser realizada via fax, carta normal ou documento atachado. Usar esses dois últimos somente em casos excepcionais. O encaminhamento poderá então ser realizado usando (modelo .pdf ou .doc).

13. Lista de verificação (Checklist .pdf ou .doc).

14. A **taxa de tramitação** é de US$ 15,00 e a de **publicação** de US$ 20,00 por página impressa. **Os pagamentos deverão ser feitos em reais (R$), de acordo com a taxa de câmbio comercial do dia**. Essas taxas deverão ser pagas no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 250945-8 em nome da FATEC - Projeto 96945. Os pagamentos poderão ser por cartão de crédito VISA (.pdf ou .doc) ou ainda por solicitação de fatura (.pdf ou .doc). **A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação**, podendo ser enviada via fax (55 32208695), ou anexando o comprovante de depósito bancário escaneado ou ainda enviado por email (cienciarural@mail.ufsm.br) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da

fatura). A taxa de tramitação é obrigatória para todos os trabalhos, independentemente do autor ser assinante da Revista. **A taxa de publicação somente deverá ser paga (e o comprovante anexado) após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores**. Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de US$ 120,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página. Este pagamento também deverá ser realizado até a publicação do artigo rubricado obedecendo uma das formas previamente mencionadas.

15. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

16. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

17. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Artigo a ser enviado para a Revista Ciencia Rural

Utilização de éguas receptora de embrião no dia 3 pós ovulação

Use of day 3 postovulation embryo transfer recipient mares

ALONSO, MARIA AUGUSTA[I]; FLEURY, PERLA DAGHER CASSOLI [I].; ALVARENGA, MARCO ANTONIO [II]. [I] Fleury Reprodução Equina, Rua Campos Salles, 1152, apto 52 CEP 13 720-000 São José do Rio Pardo, SP, Brasil **gutalonso65@hotmail.com,**[II] Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, UNESP- Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Para se alcançar bons resultados em um programa comercial de transferência de embrião, a seleção adequada da égua receptora tem um caráter fundamental. Essa seleção é baseada na sincronia em relação à égua doadora, na ausência de dobra endometrial e fluido uterino, na presença de um corpo lúteo e no tônus cervical e uterino. Normalmente uma janela de sincronia +1 (ovulação da receptora uma dia antes da doadora) a -3 (ovulação da receptora 3 dias após a doadora) é aceita e boas taxas de prenhez são alcançadas. Em alguns casos, esse grau de sincronia não é possível, e deve-se encontrar outra alternativa. A utilização de receptoras mais cedo após a ovulação permite uma sincronização mais flexível entre doadora e receptora. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de receptoras de embrião no 3º dia pós ovulação para a transferência de embrião. As doadoras eram de diferentes raças, de idade entre 3 e 26 anos, mantidas em diferentes haras.ou na Fleury Reprodução Eqüina.. Os embriões foram coletados de forma não cirúrgica nos dias 7, 8 ou 9 pós ovulação.. Após a identificação, os embriões eram mensurados e seu estagio de desenvolvimento e grau de qualidade determinados. Apenas embriões de grau I foram utilizados no estudo. Os embriões foram

transferidos pelo método não cirúrgico em receptoras sincronizadas, entre o dia 3 e 8 pós ovulação. A seleção das receptoras foi feita baseada no tônus e morfoecogenicidade uterina Um total de 905 transferências de embriões foi utilizado. As receptoras eram de diferentes raças, entre 3 e 14 anos de idade. Todas eram mantidas na Fleury Reprodução Eqüina. O diagnostico de gestação foi realizado 5 a 7 dias após a transferência. Os dados foram analisados pelo teste Qui-Quadrado. As taxas de prenhez foram similares entre as éguas nos dias 3 a 8 pós ovulação. (d3, 75,90% (83); d4, 71,72% (198); d5, 71,49% (228); d6, 69,36% (173); d7, 76,87% (147), d8, 68,42% (76)). Pode-se concluir, portanto, que éguas receptoras de embrião podem ser utilizadas tão cedo quanto 3 dias pós a ovulação, com boas taxas de prenhez, sem a utilização de suplementação de progesterona exógena, sendo uma possibilidade interessante quando uma sincronia mais próxima não é possível. Entretanto, uma seleção adequada com base em tônus e morfoecogenicidade uterina são necessárias para a obtenção destes resultados.

Palavras-Chave: égua, equino, receptora, transferência de embrião, taxa de prenhez

ABSTRACT

In order to have a successful embryo transfer programme, proper selection of the recipient mare is mandatory. This selection is based on synchrony in relation to the donor, absence of uterine folds and fluid, presence of a corpus luteum and uterine and cervical tone. Normally a window of synchrony of +1 (recipient ovulation one day after donor) to – 3 (recipient ovulation 3 days after donor) is accepted and good pregnancy rates are achieved. In some cases, this degree of synchrony is not possible, and one must find another alternative. The use of recipients earlier after ovulation allows a more flexible synchronization between donor and recipient. The objective of this study was to evaluate the use of recipient mares 3 days after

ovulation for embryo transfer. Donor mares were of different breeds, age between 3 to 26 years old, maintained in different breeding farms and in Fleury Reprodução Equina Center. Embryos were recovered nonsurgically 7, 8 or 9 days after ovulation. Upon identification, embryos were assessed for size, grade and developmental stage. Only grade I embryos were used in this experiment. The embryos were transferred nonsurgically into synchronized recipients, from 3 to 8 days after ovulation. The selection of recipients was done based on uterine tone and echogenicity on day of transfer, being chosen the mares presenting a homogenous and tubular uterus, with good tone. A total of 905 embryo transfers were used. Recipients were of different breeds from 3 to 14 years of age.. All of them were at Fleury Reprodução Equina Center. Pregnancy test was performed 5 to 7 days after transfer. Data was analyzed by Chi-square test. Pregnancy rates were similar among mares on all different days after ovulation (d3, 75,90% (83); d4, 71,72% (198); d5, 71,49% (228); d6, 69,36% (173); d7, 76,87% (147), d8, 68,42% (76)). In conclusion, recipient mares can be successfully used as early as day 3 post ovulation, with adequate pregnancy rate, without exogenous progesterone supplementation, being an interesting possibility when closer synchrony is not possible. However, an appropriate selection based on uterine tone and echogenicity is needed to obtain these results.

Keywords: mare, equine, recipient, embryo transfer, pregnancy rate

INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) se tornou uma importante ferramenta em vários programas de melhoramento de eqüinos por todo o mundo, por ela possibilitar a produção de múltiplos potros de éguas de alto potencial genético ou aquelas incapacitadas de levar uma

gestação a termo ou ainda de potras muito jovens para conceber e de éguas idosas, além de permitir armazenamento de material genético.

A eficiência do programa de TE será determinada pelos índices de recuperação embrionária e taxa de prenhez, que são dependentes de vários fatores. Portanto, para haver um incremento dos resultados, com conseqüente redução de custos, as taxas de prenhez e recuperação embrionária devem ser maximizadas. Diversos estudos acerca de cada um dos fatores relacionados à taxa de prenhez têm sido realizados, havendo consenso em relação ao papel primordial desempenhado pela receptora na TE.

Um entrave ao desenvolvimento da TE em cavalos tem sido a sincronização de ovulação entre éguas doadoras e receptoras. Devido a uma grande variabilidade da duração do estro entre éguas, terapias hormonais para sincronização da ovulação nem sempre alcançam uma sincronia próxima (GINTHER, 1992).

A sincronia de ovulação entre doadora e receptora afeta as taxas de prenhez em transferência cirúrgica e não cirúrgica (SQUIRES, 1993).Porém, resultados do estudo de CARNEVALE et al. (2000), mostraram que o tempo de ovulação, e não a sincronia entre doadora e receptora, pode ser mais importante quando é feita a escolha da receptora para a transferência do embrião.

A sincronia entre embrião e ambiente uterino é essencial para o estabelecimento da gestação. O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, sendo que um embrião em um útero não sincronizado pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes a fase na qual ele se encontra. Eqüídeos permitem que uma maior janela de assincronia seja utilizada comparando-se com bovinos (WILSHER et al., 2006).

IMEL et al. (1981) reportaram taxas de prenhez semelhantes entre éguas que ovularam 1 dia antes ou 1 dia depois da doadora ($p>0,05$). Outros pesquisadores relataram taxas de prenhez maiores em éguas que ovularam depois da doadora comparadas com as que ovularam antes (DOUGLAS et al., 1982; SQUIRES et al., 1985). MCKINNON et al. (1988) obtiveram taxas de prenhez semelhantes quando transferiram embriões em receptoras +1 (ovulação 1 dia antes da doadora) a -3 (ovulação 3 dias após a doadora) de sincronia. Corroborando com este estudo, VOGELSANG et al. (1985) obtiveram 60% de prenhez quando utilizaram receptoras que estavam com -3 (ovularam 3 dias depois) de assincronia com a doadora, mas obtiveram resultados negativos quando utilizaram éguas com -4 a -6 dias de assincronia (ovularam 4 a 6 dias depois da doadora). FLEURY et al. (1989), transferiram embriões para 6 éguas que ovularam 3 dias depois da doadora e 3 éguas que ovularam 4 dias depois da doadora, obtendo taxa de prenhez semelhante à das receptoras com menor grau de assincronia. FOSS et al. (1999) propuseram a utilização de uma janela de assincronia de ovulação maior do que as antes utilizadas, sendo que éguas receptoras -5 (ovulação 5 dias depois da doadora) apresentaram resultados satisfatórios (5/6; 83,3%). A flexibilidade resultante desta maior janela de sincronia tornou a seleção de uma receptora apropriada mais fácil.

Aumentar o período útil de utilização da receptora é sempre um desafio que possibilita recompensas na redução do custo da TE em eqüinos (JASKO, 2002).

CAIADO et al. (2007) verificaram que o tratamento diário com progesterona iniciado no dia da ovulação da receptora permitiu seu uso já no segundo dia pós ovulação, tendo sido obtidas taxas de prenhez próximas a 70% quando utilizada a progesterona e de 30% quando não utilizada a suplementação.

FLEURY et al. (2006) observaram ser possível a utilização de receptoras no dia 3 pós ovulação, desde que estas apresentem bom tônus uterino na avaliação ginecológica.

Em um esforço para eliminar a necessidade de sincronização entre doadoras e receptoras, éguas ovariectomizadas foram usadas como receptoras de embrião (HINRICHS et al., 1985; HINRICHS et al., 1987; MCKINNON & SQUIRES, 1988b), porém o resultado da utilização foi variável e não muito difundido (VANDERWALL, 2000).

Outra possibilidade é a utilização de receptoras com ciclo artificial. Esses animais são utilizados aplicando-se estrógeno e progesterona para mimetizar um ciclo natural em éguas em período de transição ou em anestro. As taxas de prenhez alcançadas utilizando-se este tipo de receptora foram semelhantes às de éguas ciclantes (10/18, 55,6% vs 400/590 67,8%) (CARNEVALE et al., 2000). Em um estudo realizado em um programa comercial, a preparação das receptoras consistiu em aplicação dois dias de cipionato de estradiol (10mg/dia) e no dia seguinte, aplicação de progesterona. No experimento, 4 diferentes tratamentos com progesterona foram realizados: 200mg/dia, 400mg a cada 2 dias, 1500mg de progesterona de longa ação a cada 7 dias, ou a cada 6 dias. As taxas de prenhez alcançadas foram semelhantes entre os tratamentos e as éguas controle (75,0, 75,9, 76,9, 76,6, 73,3%, respectivamente) (ROCHA FILHO et al., 2004).

Por estes motivos acima citados, o estudo teve por objetivo avaliar a possibilidade da utilização de receptoras no 3º dia pós ovulação sem a utilizacao de suplementação com progesterona.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Fleury Reprodução Equina, em São José do Rio Pardo, SP, nos anos de 2003 a 2007. Para avaliar o efeito do dia do ciclo da receptora sobre as taxas de prenhez pós TE foram utilizados 905 embriões de 597 doadoras de embrião. Para serem

incluídos no levantamento de dados, os animais deveriam apresentar ciclicidade normal, útero, ovários, conformação perineal sem alterações.

As doadoras, quando apresentavam folículo com diâmetro igual ou maior do que 35 mm, com presença de dobras endometriais recebiam a aplicação de hCG (gonadotrofina coriônica humana) e eram inseminadas no dia seguinte.

As receptoras eram submetidas à palpação diariamente até o dia da ovulação. Os animais entre 3 a 8 dias pós ovulação eram avaliados. Esta avaliação, que era realizada sempre pelo mesmo técnico, consistia na palpação retal com a avaliação do tônus uterino Ee morfoecogenicidade, e os animais com melhor tônus e maior homogeneidade uteria eram escolhidos. O diagnóstico de prenhez era feito 5 a 7 dias após a transferência.

O método de colheita utilizado foi o não cirúrgico, aberto, adaptado da metodologia descrita por SQUIRES et al. (1985). As colheitas eram realizadas no dia 7, 8 ou 9 pós ovulação da égua doadora. A transferência foi realizada de forma não cirúrgica. Para receptoras que estavam entre o 3º e 8º dia pós ovulação. A análise estatística das taxas de prenhez nos diferentes dias pós ovulação no dia da TE foi realizada por qui-quadrado ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de prenhez das receptoras transferidas entre os dias 3 a 8 pós ovulação não foram diferentes estatisticamente (D3, 75,90%; D4, 71,72%; D5, 71,49%. D6, 69,36%; D7, 76,86%, D8, 68,42%). Na literatura, encontram-se vários trabalhos realizados para avaliar o grau de sincronia da doadora e receptora de embrião e sua influência sobre as taxas de prenhez. O presente estudo está de acordo com o trabalho de MCKINNON et al. (1988), que obtiveram

taxas de prenhez semelhantes quando transferiram embriões em receptoras que ovularam um dia antes a 3 dias depois da doadora. As éguas receptoras utilizadas haviam ovulado 1 dia antes da doadora até 6 dias depois da doadora, e as taxas de prenhez não apresentaram diferença estatística entre os distintos graus de assincronia. Está também de acordo com os resultados de FLEURY et al. (1989), no qual foram transferidos embriões para 6 éguas que ovularam 3 dias depois da doadora e 3 éguas que ovularam 4 dias depois da doadora sendo que a taxa de prenhez foi semelhante às de receptoras com menor grau de assincronia. FOSS et al. (1999) utilizaram receptoras que haviam ovulado 5 dias depois da doadora e também obtiveram bons resultados de prenhez (5/6; 83,3%), entretanto com número pequeno de animais neste grupo. Por outro lado, as taxas de prenhez do presente estudo para receptoras com maior grau de assincronia diferiram do que VOGELSANG et al. (1985) obtiveram. Este grupo reportou 60% de prenhez quando utilizadas receptoras que ovularam 3 dias depois da doadora, concordando com o presente resultado. Entretanto, resultados negativos foram alcançados quando foram utilizadas receptoras que ovularam 4 a 6 dias depois da doadora, discordando do que foi aqui encontrado. Esta discordância de resultados pode ser devido à seleção da receptora no dia da TE, que neste presente estudo foi baseada nas características uterinas de tônus e morfoecogenicidade e não somente na sincronia entre doadora e receptora.

De acordo com CAIADO et al. (2007), é possível a utilização de receptoras 2 dias após a ovulação, desde que seja feita uma suplementação com progesterona no dia da ovulação. As taxas de prenhez destas éguas foram comparáveis àquelas utilizadas 5 dias pós ovulação, enquanto que a taxa de prenhez das éguas no dia 2 pós ovulação sem nenhuma suplementação foi de apenas 30%. Analisando este resultado, ficou claro que a utilizacao de receptoras no 2º dia pós ovulação é detrimental para as taxas de prenhez. Entretanto, a taxa de prenhez nas éguas 3 dias pós ovulação foi semelhante às demais, ou seja, este é o tempo mínimo para a

utilização de receptoras sem necessidade de suplementação com progesterona exógena. A sincronização de uma receptora com a doadora torna-se mais fácil quando fica demonstrada que a utilização de receptoras tão cedo quanto o dia 3 pós ovulação é possível e proporciona a obtenção de taxas de prenhez comparáveis aos demais dias (até o 8º dia pós ovulação).. Vale ressaltar que as receptoras utilizadas no presente estudo eram selecionadas através da avaliação da morfoecogenicidade e tônus uterino. Os animais que apresentavam características consideradas indesejáveis no dia 3 pós ovulação não foram utilizados. Ou seja, esses resultados de prenhez no dia 3 pós ovulação foram atingidos utilizando-se receptoras escolhidas com base em uma criteriosa avaliação.

CONCLUSÕES

Conclui-se, desta forma que receptoras no dia 3 pós ovulação podem ser utilizadas como receptoras de embrião sem a utilização de nenhuma suplementação exógena de progesterona, apresentando taxas de prenhez comparáveis às das éguas no 4 ao 8 dia pós ovulação.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

REFERÊNCIAS

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A., SILVA, J.F.S., FONTES, R.S. Tratamento de éguas de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

DOUGLAS, R.H. Some aspects pf equine embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertlity Supplement**, v.32, p.405-408, 1982.

FLEURY, J.J.; COSTA NETO, J.B.F.; ALVARENGA, M.A. Results from an embryo transfer programme in Brazil. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.8, p.73-79, 1989.

FLEURY, P.D.C..;ALONSO, M.A.;BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.34 (supl. 1), p.502, 2006.

FOSS, R.; WIRTH, N.; SCHILTZ, P.; JONES, J. Nonsurgical embryo transfer in a private practice. **Proceedings of the American Association of Equine Practioners**, v.45, p.210-212, 1999.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects** (2nd ed). EquiServices, Cross Plains, WI, p.299-300, p. 49HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; CUMMINGS, M.R. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: s preliminary study. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.3, p.74-75, 1985.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; KENNEY, R.M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. **Theriogenology,** v. 26, n.4, p.455-460, 1986.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; PALMER,E. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.80, p.395-401, 1987.

IMEL, K.J.; SQUIRES, E.L.; ELSDEN, R.P.; SHIDELER, R.K. Collection and transfer of equine embryos. **Journal of American Veterinary Medicine Ass** v.179, p.987-991, 1981.

JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. **Theriogenology,** v.58, p.713-715, 2002.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Journal of American Veterinary Medicine Association,** v.192, p.305-333, 1988.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSOA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A.Uso de progesterona de longa ação na preparação de eguas não ciclantes como receptoras de embrião. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Barra Bonita, **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.89, 2004.

SQUIRES, E.L.; GARCIA, R.H.; GINTHER, O.J. Factors affecting success of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.3, p.92-95, 1985.

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

VANDERWALL, D.K. Current equine embryo transfer techniques. In: Recent Advances in Equine **Theriogenology**, B.A.Ball, www.ivis.org, 2000.

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

WILSHER , S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal,** v.38, n.5, p.428-432, 2006.