

## TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO EM EQUINOS: REVISÃO

[Embryo transfer in equine species: review]

Rodrigo Araújo Lira<sup>1</sup>, Gislayne Christianne Xavier Peixoto<sup>1</sup>, Alexandre Rodrigues Silva<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Médicos Veterinários autônomos.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN.

**RESUMO** - A transferência de embrião na espécie equina é uma biotécnica de suma importância para a indústria do cavalo. Uma vez que a versatilidade desta espécie é o principal fator responsável pelo crescimento mundial da equideocultura, esta biotecnologia possibilita o maior desenvolvimento do setor através do ganho na eficiência reprodutiva e no incremento do melhoramento genético, favorecendo o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. Numerosos estudos possibilitaram o avanço desta ferramenta nas últimas décadas. Pesquisas voltadas a protocolos superovulatórios e criopreservação de embriões tem alcançado resultados ainda mais encorajadores, resultando no maior desenvolvimento da técnica, difusão da mesma e gerando perspectivas futuras em diminuir seus custos de implementação. Vários fatores devem ser levados em conta antes do início de um programa de transferência de embrião na espécie equina, pois organização e coordenação dos componentes podem afetar o sucesso do mesmo. Assim, torna-se importante realizar uma revisão sobre a seleção e manejo das éguas, os protocolos de sincronização de estro, indução da ovulação, e demais aspectos relacionados à aplicação desta biotecnologia.

**Palavras-Chave:** Transferência de embrião, sincronização de estro, superovulação, equino.

**ABSTRACT** - The embryo transfer in the equine species is a highly important biotechnique for the horse industry. The versatility of this species is the main factor for the worldwide growth of the horse breeding. Thus, this biotechnology makes possible a largest development of this activity through the earnings in the reproductive efficiency and in the increment of the genetic improvement, which leads to the improvement of the breeding. In the last decades, numerous studies made possible the progress of this tool. Researches on superovulation protocols and embryo cryopreservation has reached more encouraging results, leading to a largest development of the technique, diffusion of the same and generating future perspectives at lower implementation costs. Several factors should be quite analyzed before the beginning of an embryo transfer program in equine species, because the organization and coordination of the components can affect the success of the technique. Therefore, it is important to accomplish a revision about the selection and mares handling, the oestrus synchronization protocols, the ovulation induction, and other matters related to the application of this biotechnology.

**Keywords:** Embryo transfer, oestrus synchronization, superovulation, horse.

### INTRODUÇÃO

A criação de cavalos destinados ao segmento esportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas (Vianna, 2000). Devido à importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer, e não mais apenas no transporte ou tração animal, é incontestável o crescimento mundial da equideocultura (Mariz, 2008).

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (Ginther, 1992). Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos, sendo a transferência de

\* Autor para correspondência. E-mail: legio2000@yahoo.com.

embrião (TE) a ferramenta mais promissora para essa finalidade (Arruda et al., 2001), tornando-se assim, cada vez mais comum no mundo equino para obtenção de potros (Kumar et al, 2008).

Foi na década de 70 o primeiro relato com sucesso da TE na espécie eqüina, descrita no Japão por Oguri e Tsutsumi (1972). No Brasil, esta técnica em equinos foi primeiramente descrita em 1987 por Fleury et al. adaptando a metodologia relatada por Douglas (1979) às condições brasileiras. Nas ultimas décadas, houve um grande avanço desta biotécnica aplicada a referida espécie, melhorando consideravelmente as taxas de prenhez de 12,5% a 74,55% (Vogelsang et al., 1979; Oguri & Tsutsumi 1980; Fleury & Alvarenga, 1999; Peres et al., 2002; Rocha., et al., 2004).

Esta biotécnica tem sido utilizada como uma gestão de procedimentos para a produção de múltiplos potros por égua durante o ano, o melhor aproveitamento de éguas que possuam alto valor zootécnico e sejam idosas ou que estejam em atividade esportiva (Hurtgen, 2008; Arruda et al., 2001; Daels, 2007). Ainda, é capaz de gerar potros de éguas subférteis por problemas adquiridos, as quais ficam impedidas de exercer uma gestação a termo devido a uma variedade de razões, tais como idade, infecção uterina crônica, danos cervicais, etc. Algumas razões incomuns para usar a TE para preservar a égua na produção de potros podem incluir a laminite crônica, severa artrite, cólicas não resolvidas ou perigosos problemas comportamentais da fêmea para os tratadores, outros cavalos ou ao potro da mesma (Hurtgen, 2008). Além disso, esta biotécnica favorece o maior controle de doenças quando da transferência de material genético entre estados ou países, bem como a obtenção de divisas através de exportações de embriões congelados (Arruda et al., 2001).

A complexidade da TE é relativamente baixa quando comparada com técnicas mais avançadas. A dificuldade de um programa de TE está na organização e coordenação de componentes separados que afetam o sucesso da taxa, como o manejo da égua doadora, qualidade da égua receptora e da sincronização e habilidade/técnica na transferência (Hinrichs, 2005).

Diante deste contexto, o presente trabalho se propõe a apresentar uma revisão de literatura acerca dos principais aspectos relacionados à aplicação da transferência de embrião na espécie equina.

## **SELEÇÃO E MANEJO DA ÉGUA DOADORA E RECEPTORA**

Para seleção da égua doadora deve ser considerado o seu histórico reprodutivo, a fertilidade e genitores, as diretrizes do registro da raça, o valor potencial do potro resultante, e o número de gestações desejadas (SQUIRES et al., 1999). O manejo consiste em monitorar o comportamento reprodutivo, emprego da palpação transretal e ultrassonografia para monitorar a atividade folicular e ovulação, e o uso de hormônios exógenos para sincronizar o estro e ovulação. Quando em cio, a égua doadora é examinada diariamente para monitorar o crescimento folicular, permitindo o ótimo momento para inseminação com sêmen fresco, refrigerado ou congelado (Vanderwall & Woods, 2007).

A própria seleção e manejo das éguas receptoras pode ser o fator mais importante que afeta o sucesso do programa de TE (Vanderwall & Woods, 2007; McKinnon & Squires, 2007), já que esta irá reconhecer o embrião e terá que fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento (Fleury et al., 2007). Critérios de seleção incluem ótimo peso (400 a 550 kg), idade de 3 a 10 anos, boa índole e bom desenvolvimento mamário (Squires et al., 1999), ciclos estrais normais e livres de anormalidades uterinas e ovarianas (Vanderwall & Woods, 2007).

As receptoras também devem ser examinadas diariamente quando em cio para monitoramento do crescimento folicular e ovulação (Vanderwall & Woods, 2007). É preferível que pelo menos duas receptoras estejam disponíveis para cada doadora (McKinnon & Squires, 2007), permitindo assim, no momento da inovulação, escolher a que apresenta as melhores condições reprodutivas para receber o embrião. Carnevale et al., (2000) classificou-as por palpação e ultrassonografia transretal em: aceitáveis, quando apresentaram corpo lúteo bem definido, tônus uterino e cervical variando de bom a excelente, e nenhuma outra alteração no útero; e marginalmente aceitáveis, quando imagem do corpo lúteo pobre ou pouca tonicidade uterina e cervical.

## **SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E INDUÇÃO DA OVULAÇÃO**

Várias combinações de esteróides reprodutivos (progestágenos e estrógenos), prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF e análogos), gonadotrofina coriônica humana

(hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH e análogos) tem sido usadas no controle do desenvolvimento folicular e tempo de ovulação, aplicados em propósitos básicos durante a transição da primavera, ciclo estral e período pós parto em éguas. (McKinnon & Voss, 1993; Bergfelt, 1999; Pinto & Meyers, 2007).

Um dos protocolos mais recomendados consiste na administração de progesterona de curta ação (150 mg) e de 17- $\beta$  Estradiol (10 mg), por 10 dias consecutivos, com uma aplicação de PGF2 $\alpha$  no 10º dia e uma de hCG (2500 UI) quando um folículo de 35 mm for detectado. Com este protocolo, 70% das éguas ovulam entre 10 a 12 dias após a última injeção do esteróide (Bradecamp, 2007).

A janela de sincronização entre a ovulação da receptora e da doadora é entre +1 (ovulação um dia antes da doadora) a -3 (ovulação três dias após a doadora), não sendo as taxas de gestação entre elas diferentes neste intervalo (Imel et al., 1981; Iuliano et al., 1985; Squires et al., 1985; Squires & Seidel, 1995; McKinnon & Squires, 2007).

Atualmente, a sincronização entre doadora e receptora é uma técnica realizada de maneira relativamente simples em éguas cíclicas. Geralmente, administra-se uma única injeção intramuscular de PGF2- $\alpha$  ou análogo na égua doadora 1 ou 2 dias a frente da mesma terapia aplicada nas receptoras, quando sabe-se que ambas estão entre o 6º e 14º dias do diestro e o exame ultrassonográfico dos ovários revela a ausência de um grande folículo pré-ovulatório que pode ovular rapidamente (Allen, 2001). Ou alternativamente, as doadoras e receptoras são ambas tratadas durante curso de 9 ou 10 dias com progesterona injetável ou sintéticos orais, novamente começando as doadoras 1 ou 2 dias à frente das receptoras. No último dia da terapia, em todas as éguas, aplica-se uma injeção de prostaglandina ou análogo para induzir a luteólise de qualquer corpo lúteo que pode estar presente neste momento (Driancourt & Palmer 1982). Removendo-se a progesterona e aplicando-se a PGF2 $\alpha$ , as éguas exibirão estros em torno de 3 dias (Bergfelt, 2000).

Em todos os protocolos de sincronização empregados, monitora-se o crescimento folicular por ultrassonografia e utiliza-se hCG, GnRH ou EPE (Duchamp et al., 1987) para induzir ovulação nas éguas receptoras dentro de 48 h depois que a doadora for inseminada. Salienta-se que sucessivas aplicações de hCG induzem a formação de anticorpos, reduzindo a sua eficiência na reposta ovulatoria (Duchamp et al., 1987).

Com o objetivo de eliminar a necessidade da sincronização, têm sido utilizadas éguas ovariectomizadas tratadas com progestágenos como receptoras (Hinrichs et al., 1986; McKinnon et al., 1988). No entanto, devido a variação do êxito obtido, este método não tem sido amplamente difundido (Vanderwall, 2000).

## SUPEROVULAÇÃO

O tratamento superovulatório aumenta significativamente a eficiência e diminui potencialmente o custo de um programa de TE. No entanto, a indução de múltiplas ovulações na espécie equina não é um procedimento tão eficaz quando comparado a outras espécies domésticas. De acordo com Scherzer et al. (2008), a superovulação em éguas se encontra com limitado sucesso atualmente, na qual as taxas de recuperação embrionária são inconsistentes e abaixo das expectativas (Alvarenga et al., 2001, Niswender et al., 2003). De fato, a anatomia do ovário e a ausência de um produto que induza múltiplas ovulações confiantemente são as duas principais razões para que a superovulação não seja uma técnica comumente utilizada na reprodução de equinos (Squires, 2006).

Vários hormônios têm sido estudados a fim de melhorar os índices de coleta de embriões, tais como: fatores liberadores de gonadotrofinas (GnRH), FSH suíno (FSH-p) e equino (FSH-e), gonadotrofina coriônica equina (ECG), imunização contra inibina, extrato de pituitária equina (E.P.E.) (Squires, 1986; McCue et al., 1992; Ginther & Bergfelt, 1993; Niswender et al., 2003; Squires & McCue 2007). Dentre estes, o FSH-e e o EPE são os que apresentam resultados mais consistentes. Contudo, a baixa taxa de recuperação embrionária ainda é o maior entrave na superovulação em éguas.

A partir de 2003, um purificado FSH-e (Bioniche Animal Health Canada) tornou-se disponível comercialmente, conseqüentemente poucos e recentes experimentos foram conduzidos usando este produto na superovulação em éguas (Alvarenga., et al 2008). Além disso, este produto não é encontrado no mercado brasileiro, sendo então de elevado custo para aquisição, o que torna incomum seu uso a campo.

Os protocolos usualmente utilizados são baseados na administração de 12 mg de FSH-e duas vezes ao dia, resultando em taxas de 3,4 a 5,2 ovulações por égua (Niswender et al., 2003; Logan et al., 2007; Raz et

al., 2009). De 170 éguas tratadas com EPE, foi obtida uma média de 3.2 ovulações e foram recuperados 1.96 embriões por égua, contrastando com o grupo não tratado que recuperou apenas 0.65 embrião por égua (Squires & McCue 2007). Alvarenga et al. (2001) utilizando 25 mg de EPE, duas vezes ao dia, demonstraram uma melhora no percentual de ovulações, apresentando uma média de 4 a 7 ovulações por égua, porém com baixa taxa de recuperação embrionária.

Em busca de desenvolver uma terapia que permita uma maior taxa de embriões recuperados por ovulação têm sido proposto baixas doses de EPE (6 mg) ou de FSH-e (5mg), ambos com uma única injeção ao dia, demonstrando eficácia de tal procedimento (Farinasso et al. 2005; Araujo et al., 2009).

A observação que a taxa de recuperação embrionária por ovulação é mais alta em éguas com 3 ou menos ovulações indica que a utilização de uma baixa dose de EPE ou de FSH-e, aponta ter uma resposta ovariana menor, o que parece ser o melhor modo para progredir o número de embriões produzidos em programas de TE (Alvarenga et al., 2008). Para Araújo et al., (2009) realizando um leve ajuste na dose e na frequência de administração do FSH-e, juntamente com a seleção de animais, baseando-se na população folicular, será constantemente possível induzir duplas e triplos ovulações, com recuperação de embrião satisfatória, a um custo inferior aos protocolos superovulatórios convencionais.

### COLHEITA DE EMBRIÕES

Embriões equinos são seletivamente transportados da tuba uterina para o útero entre os dias 5 e 6 pós ovulação, os quais estão na fase de mórula compacta para desenvolvimento inicial de blastocisto. Após entrar no lúmen uterino, o tamanho do embrião aumenta dramaticamente, desenvolvendo-se para blastocisto expandido. Embora embriões possam ser recuperados nos dias 6 a 9, o período ideal para sua colheita é nos dias 7 ou 8 após a fertilização. A indicação primária para recuperação embrionária no dia 6 é para congelamento de embrião (Squires & Seidel, 1995). Embriões não são rotineiramente colhidos no dia 9, porque o sucesso destes nas taxas de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando da recuperação entre os dias 7 ou 8 (Squires & Seidel, 1995).

Estudos recentes têm sugerido que quando as éguas são inseminadas pós-ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada que o esperado

(Lisa & Meadows, 2008). Assim, foi observado um retardo no desenvolvimento embrionário, no qual vesículas embrionárias foram estimadas menores, equivalentes a 1 dia de crescimento, para éguas inseminadas neste período, em relação a éguas inseminadas antes da ovulação. Desta maneira, o lavado uterino não deve ser realizado menos que no dia 7,5 – 8 (Cuervo-Arango et al., 2009).

Os procedimentos para recuperação de embrião permaneceram essencialmente inalterados durante as últimas duas décadas (Squires et al., 2003). A colheita dos embriões é realizada pelo procedimento não cirúrgico transvaginal, descrito primeiramente em equinos por Oguri e Tsutsumi (1972), que utilizaram um cateter de três vias. O lavado era então realizado no corno ipsilateral à ovulação, inflando o balão do cateter na base desse corno. Atualmente, o balão é inflado, aproximadamente com 60 mL de ar, no corpo do útero, tracionando o cateter caudalmente para se ajustar no óstio cranial da cérvix, lavando-se os dois cornos simultaneamente (Fleury et al., 2001; Squires et al., 2003; Silva, 2003).

A colheita de embrião é executada utilizando-se a lavagem uterina transcervical. Atualmente, usa-se um cateter de silicone com balão (VEUF-80, Bivona, Inc., Gary, IN 46406) com diâmetro de 8,0 mm; porém, outros estilos de cateter estão disponíveis. Uma vez o cateter inserido no corpo do útero, o órgão é lavado três ou quatro vezes com solução salina acrescida com fosfato puro modificado (DPBS), previamente aquecida (30 - 35° C), contendo 1% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml - Vanderwall, 2000). Outra opção para o lavado uterino tem sido o uso de Ringer Lactato, obtendo taxas de prenhez de 64% quando comparadas a 57% obtidas pelo DPBS em embriões coletados por estas soluções, conforme Alvarenga et al., (1992). Atualmente, o Ringer com lactato é a solução de lavado mais utilizada no Brasil.

O útero é infundido com 1 ou 2 litros em cada lavado, realizando-se este procedimento em média 3 vezes. Então, 3 a 6 litros são usados durante todo o processo de recuperação (Daels, 2007), o qual dependerá do tamanho do útero da égua doadora. A sonda ou cateter é acoplada ao circuito e, esse sistema montado, poderá ter o fluxo de recuperação constante, sendo o fluido recuperado em grandes recipientes, ou ter o fluxo de recuperação interrompido com utilização de pinça e filtro milipore (Reira & McDonough, 1993; Reira, 2000). O volume recuperado representa normalmente de 95% a 98% do volume infundido (Imel, 1981; Carvalho, 2000; Silva, 2003). Recentemente, foi

proposto um quarto lavado adicional, onde logo antes do procedimento é administrada a ocitocina, devendo-se permitir que o meio permaneça no útero da égua por aproximadamente 3 minutos, seguido de massagem uterina pelo reto. Isto resulta em um incremento da taxa de recuperação embrionária em torno de 10% (Hudson & McCue, 2004).

Squires et al. (1982b) observaram uma distribuição equitativa dos embriões recuperados entre os diferentes lavados uterinos 31,3%, 36,3% e 32,5%. Porém em outro estudo, Meira & Henry (1991) encontraram 53,5%, 23,3%, 16,3% e 7% do primeiro ao quarto lavado uterino, respectivamente. Fleury et al. (2001) recuperou 50% dos embriões no primeiro lavado e reporta que não houve diferença na taxa de prenhez após inováções de embriões oriundos dos três lavados.

Em estudos recentes, são reportados avanços no percentual da recuperação embrionária, com taxas de 63% (22/35) e 81,19% (95/117), por Mortensen et al. (2009) e Kumar et al., (2008), respectivamente. Infelizmente, o mesmo ainda não é observado para éguas superovuladas. Raz (2009) obteve apenas 36% (14/39) de embriões recuperados por ovulação em éguas tratadas com FHS-e.

### MANIPULAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EMBRIÃO

A avaliação do embrião é subjetiva, e relativamente simples, não necessitando de equipamentos sofisticados. O rastreamento dos embriões é realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10X e a classificação embrionária é realizada utilizando-se aumento de 40X. A placa de petri deve estar

previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 mL, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção TQC®, Ham F10, Encare®, dentre outros.

A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society), descritas por McKinnon & Squires (1988). Em coletas realizadas entre 6 e 8 dias após ovulação, geralmente são encontrados mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e/ou blastocisto expandido (Bx). A avaliação da qualidade embrionária leva em consideração a morfologia relacionando-a com sua viabilidade. É atribuído um escore de 1 a 5, avaliando-o quanto ao formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida (Tabela 1; McKinnon & Squires 1988).

A qualidade do embrião apresenta o principal efeito sobre as taxas de prenhez. Embriões com escores de qualidade pobres ( $\geq 3$ ) resultam em baixa taxa de prenhez (Squires & Seidel, 1995). Embriões que são menores que o normal para a idade deles, ou têm anormalidades morfológicas, também resultam em taxas de prenhez reduzidas (Squires et al., 2003). Os mesmos autores reportam taxas de 70–75% de prenhez, com transferência de embriões de Grau 1, diagnosticado ao exame ultrassonográfico aos 12 dias.

Após avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção (Fleury et al., 2001; Camilo et al., 2003;

**Tabela 1** - Critério de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.

Classificação	Qualidade
<b>Grau 1</b>	<b>Excelente</b> - Ideais, esféricos, com tamanho, cor e textura uniformes
<b>Grau 2</b>	<b>Bom</b> - Pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação de trofoblasto
<b>Grau 3</b>	<b>Razoável</b> - Problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocelo colapsada
<b>Grau 4</b>	<b>Pobre</b> - Blastocelo colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária
<b>Grau 5</b>	<b>Degenerado</b> - Oócito não fertilizado ou embrião totalmente degenerado

Fonte: McKinnon & Squires, 1988

Daels, 2007). O objetivo desse procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida antes aspirá-lo na palheta de inovulação. Neste momento, o embrião está pronto para ser transferido em uma égua receptora ou ser condicionado ao resfriamento para o transporte (Daels, 2007). Cuidados devem ser tomados quanto ao tempo de armazenamento no meio de manutenção, uma vez que sua viabilidade diminui após três horas em meio DPBS (Douglas, 1982). Além disso, toleram temperaturas entre 25 °C a 37 °C, porém deve ser dada importância às mudanças de temperatura extremas (Vanderwall, 2000).

### **TÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO**

A TE em equino pode ser realizada pela técnica cirúrgica, por incisão ao flanco, ou pela técnica não cirúrgica por via cervical. Historicamente, a primeira apresentava os resultados mais consistentes, resultando nas maiores taxas de prenhez que variavam entre 70% a 75% uma semana após a transferência (Squires et al., 1999). Com o advento de novos estudos com resultados positivos, a metodologia atualmente utilizada é a transferência não cirúrgica coberta, associada a avaliação e seleção da égua receptora (Fleury et al., 2007). Ainda, esta é uma técnica muito menos invasiva, rápida e de alto percentual de prenhez, na qual consiste em depositar o embrião no corpo do útero com o uso de uma pipeta de inseminação que atravessa a cérvix.

A complexidade da TE é relativamente baixa quando comparada com técnicas mais avançadas, desde que os embriões sejam transferidos por técnica não cirúrgica no útero de éguas receptoras, permitindo ao clínico executar facilmente tal procedimento na fazenda, uma vez que este seja proficiente no manejo reprodutivo equino (Hinrichs, 2005).

#### **Inovulação**

O embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (Silva, 2003). O equipamento para inovulação mais amplamente utilizado pelos pesquisadores de embriões equinos é a pipeta de inseminação artificial. Contudo, vários outros aplicadores também tem sido descritos, como o modelo Hannover de transferência de embriões bovinos, o aplicador

modelo Francês e uma adaptação de tubo de aço + tubo de polietileno. Peres et al. (2002) testando esses quatro equipamentos, não observaram diferença significativa, muito embora, o modelo Hannover tenha sido o menos eficiente.

Empregando uma bainha plástica sobre o equipamento de transferência, denominada assim, técnica coberta, com objetivo de proteger o embrião da contaminação vaginal, foi relatado 54% de prenhez, comparado com 23% sem o uso da mesma (Squires, 1982a). Com o emprego desta mesma técnica, Wilson et al., (1987) e Pastorello et al., (1996) obtiveram 77 % e 80% de gestação, respectivamente.

A avaliação das receptoras, anteriormente ao ato da transferência, é de suma importância. Devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular). Além disso, não pode haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (Carnevale et al, 2000).

Caiado et al., (2007) administrando progesterona em receptoras equinas no período de D0 (dia da ovulação) a D5, possibilitaram a inovulação destas receptoras no D2, obtendo taxa de prenhez estatisticamente similar as éguas consideradas excelentes a boas para inovulação no D5.

### **PERDA EMBRIONÁRIA PRECOCE**

Considerando que o início da manutenção embrionária requer vários processos combinados intrinsecamente, algumas éguas não podem sustentar a gestação além da fase embrionária. Isto pode resultar em enorme perda econômica na indústria de cavalos, em que 30-40% das gestações terminam dentro das duas primeiras semanas da concepção (Betteridge, 2000).

As taxas de gestação após transferência de embrião são influenciadas pela variabilidade do método de transferência, o técnico, tamanho e idade do embrião, morfologia embrionária, estação do ano, sincronização entre doadoras e receptoras, procedimentos para cultura e armazenagem de embriões, e idade e histórico reprodutivo de

doadoras de embrião (Carney, et al., 1991; McKinnon & Squires, 1988; Vanderwall, 1996; Squires & Seidel, 1995).

Provavelmente, o aspecto mais importante do manejo clínico da perda embrionária precoce é reconhecer que esta ocorrerá inevitavelmente em algumas éguas, e o curso mais apropriado seria diagnosticar sua ocorrência assim que possível para prover uma oportunidade de aproveitar novamente a égua durante a mesma estação de monta. A descoberta da perda embrionária precoce pode ser realizada através de exames ultrassonográficos a cada 10 dias ou duas semanas durante o início da gestação (Vanderwall, 2008).

Vários fatores podem contribuir para a morte embrionária precoce. Vanderwall (2008) classificou esses fatores em intrínsecos, extrínsecos e embrionários. Os quais são 1) intrínsecos: idade materna, lactação, tempo de inseminação relativo a ovulação, local de fixação de intrauterino da vesícula embrionária e anormalidades de cromossomas maternas; 2) extrínsecos: tensão, nutrição, estação, palpação /ultrasonografia transretal; manipulação do gameta; 3) embrionários: incluem anomalias de cromossomas ou outras características inerentes do embrião.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência das incessantes pesquisas em biotecnologias aplicadas a reprodução equina, a TE tem se destacado nas ultimas décadas pelo seu avanço científico e comercial, o qual é refletido pelo incremento da eficiência da técnica, tornando assim, a relação custo benefício cada vez mais atraente para o criador. Seguindo esse preceito, a TE torna-se cada vez mais comum na indústria do cavalo, sendo então, uma ferramenta bastante promissora para os técnicos que trabalham na área.

## REFERÊNCIAS

Allen W.R. 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* 121:513-527.

Alvarenga M.A., Alvarenga F.C.L. & Meira C. 1992. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. *Resumos 13<sup>rd</sup> Internaional Symposium on Equine Embryo Transfer*, Buenos Aires, Argentina. p. 34-35.

Alvarenga M.A., McCue P.M. & Bruemmer J. 2001. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 56:879-887.

Alvarenga M.A., Carmo M.T. & Landim-Alvarenga F.C. 2008. Superovulation in mares: limitations and perspectives. *Pferdeheilkunde* 24:88-91.

Araujo G.H.M., Rocha Filho A.N., Lopes E.P., Moya C.F. & Alvarenga M.A. 2009. Use of a low dose to equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. *Reprod. Dom. Anim.* 44:380-383.

Arruda R.P., Visintin J.A., Fleury J.J., Garcia A.R., Madureira E.H., Celeghini E.C.C. & Neves Neto J.R. 2001. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos? *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:233-239.

Bergefelt D.R. 1999. Estrous synchronization, p.229-246. In: Samper J.C. (Ed) *Equine breeding management and artificial insemination*. Saunders Comp., Pennsylvania.

Betteridge K.J. 2000. Comparative aspects of equine embryonic development. *An. Rep. Sci.* 60:691-702.

Bradecamp E.A. 2007. Estrous synchronization, p.22-25. In: Samper J.C., Pycook J.F. & McKinnon A.O. (Eds) *Current therapy in equine reproduction*. Elsevier, St. Louis.

Camevale E.M., Ramirez R.J., Squires E.L., Alvarenga M.A., Vanderwall D.K. & McCue P.E. 2000. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 54:965-979.

Carney N.J., Squires E.L., Cook V.M., Seidel G.E. & Jakson D.J. 1991. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology* 36:23-32.

Carvalho G.R. 2000. Estudos de alguns aspectos da transferência de embriões equinos. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG. 102p.

Camilo F., Vannozzi I., Luzio B.D., Romangnoli S., Aria G. & Allen W.R. 2003. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. *Reprod. Dom. Anim.* 38:380-385.

Cuervo-Arango J., Aguilar J. & Newcombe J.R. 2009. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology* 71:1267-1275.

Daels P. 2007. Embryo transfer tips and tricks. *Proceedings 5<sup>th</sup> European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen*, Amsterdam, p.213-215.

Douglas R.H. 1979. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. *Theriogenology* 11:33-36.

Douglas R.H. 1982. Some aspects of equine embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.* 32:405-408.

Driancourt M.A. & Palmer E. 1982. Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges. *J. Reprod. Fertil.* 32:283-291.

Duchamp G., Bour B., Combarnous Y. & Palmer E. 1987. Alternative solutions to hCG induction of the ovulation in the mare. *J. Reprod. Fertil.* 35(suppl.):221-228.

Farinasso A., Branquinho J.A., Rumpf & Alvarenga M.A. 2005. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina (EPE)

- para indução de ovulações múltiplas em éguas. *Acta Scientiae Veterinariae* 33(Suppl. 1):135-138.
- Fleury J.J., Alvarenga M.A., Costa Neto J.B.F. & Papa F.O. 1987. Transferência de embriões em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39:485-487.
- Fleury J.J. & Alvarenga M.A. 1999. Effects collection day on embryo recovery and pregnancy rates in nonsurgical equine embryo transfer program. *Theriogenology* 51:261.
- Fleury J.J., Pinto A.J., Marques A., Lima C.G. & Arruda R.P. 2001. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:29-33.
- Fleury P.D.C., Alonso M.A., Sousa F.A.C., Andrade A.F.C. & Arruda R.P. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31:27-31.
- Ginther O.J. 1992. *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects.* 2th ed. Equiservices Publishing, Cross Plains. 642p.
- Ginther O.J. & Bergfelt D.R. 1993. Growth of animal follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. *J. Reprod. Fertil.* 99:105-111.
- Hinrichs K., Sertich P.L. & Kenney R.M. 1986. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology* 26:455-460.
- Hinrichs K. & Choi Y.H. 2005. Assisted reproductive techniques in the horse. *Clin. Tech. Equine Pract.* 4:210-218.
- Hudson J.J. & McCue P.M. 2004. How to increase embryo recovery rates and transfer success. *Proceedings 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, Colorado.* P1473.1204.
- Hurtgen J.P. 2008. Management of embryo donor mares with chronic infertility. *Proceedings 54<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Diego, California.* P.414-417.
- Imel K.J. 1981. Recovery, culture and transfer of equine embryos. MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA.
- Iuliano M.F., Squires E.L. & Cook V.M. 1985. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J. An. Sci.* 60:258-263.
- Kumar D., Jhamb D., Kumar N. & Badial D. 2008. Foals born through fresh embryo transfer in India. *Proceedings 10<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow, Russia.* p.567-568.
- Lisa H.M. & Meadows S. 2008. Essential management practices in commercial equine embryo transfer. *Proceedings 7<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge, UK.* p.101-102.
- Logan N.L., McCue P.M., Alonso M.A. & Squires E.L. 2007. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 102:48-55.
- Mariz T.M.A., Anjos A.G., Flor J.M., Flor L.M.A.M., Lima C.B., Givisiez P.E.N. & Azevedo P.S. 2008. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. *Acta Veterinaria Brasilica* 2:39-43.
- McCue P.M., Carney N.J., Hugues J.P., Rivier J., Vale W. & Lasley B.L. 1992. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against inhibin alpha-subunit fragment. *Theriogenology* 38:823-831.
- McKinnon A.O., Squires E.L. & Carnevale E.M. 1988. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology* 29:1055-1063.
- McKinnon A.O. & Voss J.L. 1993. *Equine reproduction.* Lea & Febiger, Philadelphia. 763p.
- McKinnon A.O. & Squires E.L. 2007. Embryo transfer and related technologies, p.319-334. In: *Current Therapy Equine Reproduction.* Saunders, Missouri.
- Meira C. & Henry M. 1991. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. *J. Reprod. Fertil.* 44(suppl.):712-713.
- Niswender K.D., Alvarenga M.A., McCue P.M., Ardy Q.P. & Squires E.L. 2003. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *J. Eq. Vet. Sci.* 23:497-500.
- Oberstein N., O'Donovan M.K., Bruemmer J.E., Seidel Jr. G.E., Carnevale E.M. & Squires E.L. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 55:607-613.
- Oguri N. & Tsutsumi Y. 1972. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fertil.* 31:187-195.
- Oguri N. & Tsutsumi Y. 1980. Non-surgical transfer of equine embryos. *Arch. Androl.* 5:108.
- Pastorello M., Meira C., Fleury J.J. & Duarte M.C.G. 1996. Transferência não cirúrgica de embriões em equinos de hipismo. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 24:212.
- Peres K.R., Trinke C.L.N., Lima M.M., Duarte M.C. & Meira C. 2002. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. *Theriogenology* 57:558-558.
- Pinto C.R.F. & Meyers P.J. 2007. Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation, p.91-98. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Ed.) *Current therapy in large animal theriogenology.* Elsevier Science, St. Louis.
- Riera F.L. & McDonough J. 1993. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Vet. J.* 15:116-119.
- Riera F.L. 2000. Equine embryo transfer, p.229-246. In: Samper J.C. (Ed.) *Equine breeding and management and artificial insemination.* Saunders Company, Pennsylvania.
- Rocha Filho A.N., Pessôa M.A., Gioso M.M. & Alvarenga M.A. 2004. Transfer embryos into anovulatory recipients supplement with short or long acting progesterone. *Animal Reprod.* 1:91-95.
- Samper J.C. 2008. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not? *Theriogenology* 70:445-447.
- Scherzer J., Fayrer-Hosken R.A., Ray L., Hurley D.J. & Heusner G.L. 2008. Advancements in Large Animal Embryo Transfer and Related Biotechnologies. *Reprod. Dom. Anim.* 43:371-376.
- Silva L.A. 2003. Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões em equinos. Tese (Pós-graduação em Medicina Veterinária), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, Brasil, 145 p.

Squires E.L., Imel K.L., Iuliano M.F. & Shideler R.K. 1982a. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. *J. Reprod. Fertil.* 32:409-414.

Squires E.L., Iuliano M.F. & Shideler R.K. 1982b. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. *Theriogenology* 17:35-41.

Squires E.L., Cook V.M. & Voss J.L. 1985. Collection and transfer of equine embryo. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory*. Colorado State University, Fort Collins. 37p.

Squires E.L., Garcia R.H., Ginther O.J., Voss J.L. & Seidel G.E. 1986. Comparison of equine pituitary extract follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology* 2:661.

Squires E.L. & Seidel G.E. 1995. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin*. Colorado State University, Fort Collins. p.397.

Squires E.L., McCue P.M. & Vanderwall D.K. 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 51:91-104.

Squires E.L., Carnevale E.M., McCue P.M. & Bruemmer J.E. 2003. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 59:151-170.

Squires E.L. 2006. Superovulation in Mares. *Vet. Clin. Equine* 22:819-830.

Squires E.L. & McCue P.M. 2007. Superovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 99:1-8.

Raz T., Carley S. & Card C. 2009. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. *Theriogenology* 71:1358-1366.

Vanderwall D.K. 2000. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: Ball B.A. (Ed.) *Recent Advances in Equine Theriogenology*. International Veterinary Information Service. Disponível na Internet <http://www.ivis.org>.

Vanderwall D.K. & Woods G.L. 2007. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, Missouri.

Vanderwall D.K. 2008. Early embryonic loss in the mare. *J. Eq. Vet. Sci.* 28:691-702.

Vianna B.C. 2000. Inseminação artificial em éguas com sêmen congelado, "in natura" e diluído. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Paraná, PR, 82p.

Vogelsang S.G., Sorensen A.M., Potter G.D., Burns S.J. & Kraemer D.C. 1979. Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos. *J. Reprod. Fertil.* 27:383-386.

Wilson J.M., Rowley W.K., Smith H.A., Webb R.L. & Tolleson D.R. 1987. Successful non-surgical transfer of equine embryos to post-partum lactating mares. *Theriogenology* 27:295.