

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
Campus ROLIM DE MOURA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LORRAYNE DE OLIVEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES EQUINOS E SUA CORRELAÇÃO
COM A TAXA DE PREENHEZ NO MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA - RO**

ROLIM DE MOURA – RO

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR

Campus **ROLIM DE MOURA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LORRAYNE DE OLIVEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES EQUINOS E SUA CORRELAÇÃO
COM A TAXA DE PRENHEZ NO MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA - RO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Federal de Rondônia – UNIR, Campus de Rolim de Moura, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador (a): Profa Dra Evelyn Rabelo Andrade Oliveira

ROLIM DE MOURA – RO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

R696a Rodrigues, Lorryne de Oliveira.

Avaliação morfológica de embriões equinos e sua correlação com a taxa de prenhez no município de Rolim de Moura - RO: Pesquisa científica / Lorryne de Oliveira Rodrigues. -- Rolim de Moura, RO, 2019.

60 f. : il.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Evelyn Rabelo Andrade Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) -
Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Equinos. 2.TE. 3.IA. 4.Graduação embrião. 5.Formato embrião. I.
Oliveira, Evelyn Rabelo Andrade. II. Título.

CDU 636.082

Bibliotecário(a) Nágila N. Chaves

CRB 6/363

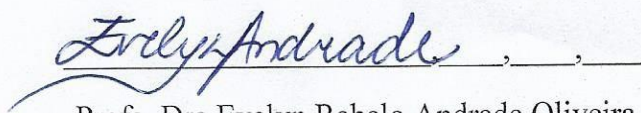
LORRAYNE DE OLIVEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES EQUINOS E SUA CORRELAÇÃO
COM A TAXA DE PREENHEZ NO MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA - RO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como exigência em graduação no curso de Bacharel em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Rondônia.

Rolim de Moura, 01 de Julho de 2019

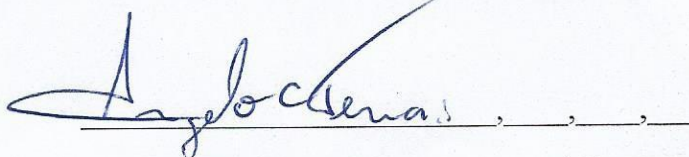
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra Evelyn Rabelo Andrade Oliveira

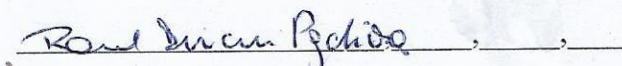
Orientadora

Universidade Federal de Rondônia



Prof. Dr. Angelo Laurence Covatti Terra

Universidade Federal de Rondônia



Prof. Dr. Raul Dirceu Pazdiora

Universidade Federal de Rondônia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, sabedoria e força para concluir esta etapa de cinco anos da minha vida, pois sem Ele nada disso seria possível. Em todos os momentos de dificuldades sempre esteve comigo e me dando a direção certa para realizar esse sonho que trago comigo desde criança de ser uma médica veterinária.

Agradeço a minha família por ter depositado toda confiança em mim, em especial minha tia Cida Ramos, minha mãe Maria Oliveira, meu Tio Eugênio e aos meus primos e irmãos, por terem me ajudado em todos os sentidos e de todas as formas possíveis, através de conselhos, orientações e orações durante toda essa trajetória difícil.

Agradeço ao meu namorado Mário Júnior e minhas amigas Ana Claudia Xavier, Ingrid Leticia Freitas, Maxsiele Vieira, Leidiane Maxmiano, Fernanda Cândido e meu amigo Anderson Soffa por sempre acreditar e me incentivar a não desistir dessa profissão e ao meu querido cachorro Toretto que aqui representa todo o meu amor pelos animais.

A todos os meus professores pelos conhecimentos ministrados que contribuíram para minha formação, em especial a minha orientadora Dra Evelyn Andrade Rabelo pelas orientações nesse trabalho e por sempre me motivar a ser uma ótima profissional.

Aos Médicos Veterinários e proprietário da Fazenda Haras pela disponibilidade nesse período de aprendizado.

Enfim, agradeço a todos aqueles que me ajudaram e me apoiaram de forma direta ou indiretamente e que vieram a contribuir para concluir este trabalho, finalizar essa etapa e realizar esse sonho.

Muito obrigada.

RESUMO

O Brasil é um país de referência nos estudos e na utilização de biotecnologias empregadas na reprodução como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE). Com relação à TE, as técnicas empregadas para se obter uma taxa de prenhez satisfatória está na seleção e preparação da égua receptora, a sincronização da ovulação entre éguas doadoras e receptoras, a realização da cobertura ou inseminação artificial da doadora, coleta de embrião da doadora e finalmente, a transferência do embrião para a receptora. O objetivo deste estudo consistiu em correlacionar a qualidade embrionária com a taxa de prenhez das éguas receptoras em uma Fazenda Haras, no município de Rolim de Moura-RO, durante a estação de monta (2018/19). Para isso, foram aplicados questionários individuais para avaliação da influência da idade das doadoras, morfologia embrionária e tipo de sêmen utilizados (IA ou monta natural) na taxa de prenhez desses animais. A taxa de prenhez observada na estação 2018/2019 foi 79,41%. O formato embrionário não foi influenciado pela idade das doadoras ($P=0,249$), mas o formato esférico (94,87%; 37/39) foi superior ao oval (5,13%; 2/39; $P<0,0001$). A graduação do embrião sofreu influência tanto da idade das doadoras ($P=0,036$) como do tipo de sêmen ($P=0,039$). A taxa de prenhez não sofreu influência da idade das receptoras ($P=0,399$), da idade das doadoras ($P=0,776$) e nem da qualidade embrionária ($P=0,111$), porém, o tipo de sêmen influenciou na taxa de prenhez ($P=0,018$). Estes resultados permitem concluir que em éguas submetidas a TE no município de Rolim de Moura-RO, a graduação embrionária foi influenciada pelo tipo de sêmen utilizado e da idade das doadoras e que a taxa de prenhez foi superior quando a IA foi realizada com sêmen congelado e sêmen fresco/monta natural em relação ao sêmen refrigerado.

Palavras-chaves: morfologia embrionária; transferência de embrião; inseminação artificial; reprodução equina.

ABSTRACT

The Brazil is a reference country in the studies and use of biotechnologies used in reproduction such as artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET). With respect to ET, the techniques employed to obtain a satisfactory pregnancy rate are in the selection and preparation of the recipient mare, the synchronization of ovulation between donor and recipient mares, artificial donor coverage or insemination, donor embryo collection and finally, the transference of the embryo to the recipient. The objective of this study was to correlate the embryonic quality with the pregnancy rate of recipient mares in a Fazenda Haras in the municipality of Rolim de Moura-RO during the mating season (2018/19). For this, individual questionnaires were used to evaluate the influence of donor age, embryo morphology and semen type (AI or monta natural) on the pregnancy rate of these animals. The pregnancy rate observed in the 2018/2019 season was 79,41%. The embryonic shape was not influenced by the donor age ($P = 0,249$), but the spherical shape (94,87%, 37/39) was superior to oval (5,13%, 2/39, $P < 0,0001$). The embryo graduation was influenced both by the age of the donors ($P = 0,036$) and the semen type ($P = 0,039$). The pregnancy rate was not influenced by the age of the recipients ($P = 0,399$), donor age ($P = 0,766$) or embryo quality ($P = 0,111$). However, the semen type influenced the pregnancy rate ($P = 0,018$). These results allow to conclude that in mares submitted to ET in the municipality of Rolim de Moura-RO, the embryonic graduation was influenced by the type of semen used and the age of the donors and that the pregnancy rate was higher when the artificial insemination was performed with semen frozen semen and fresh semen/monta natural in relation to refrigerated semen.

Keywords: embryonic morphology; embryo transfer; artificial insemination; equine reproduction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estágios de Desenvolvimento do Embrião Equino.	30
Tabela 2. Porcentagem de embriões esféricos e ovais de acordo com o número de embriões.	47
Tabela 3. Idade das doadoras em relação a graduação do embrião.	47
Tabela 4. Graduação embrionária com os tipos de sêmen utilizado.	48
Tabela 5. Análise do tipo de sêmen sobre a taxa de prenhez da receptora.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da V.A. (1) Tubo Rígido, (2) Mucosa de Látex, (3) Mucosa Plástica, (4) Anéis de Látex, (5) Camisa interna, (6) Copo coletor e (7) tampa. (A) V.A. (B) montada.	21
Figura 2. Ilustração da técnica Intracornual profunda.	23
Figura 3. Figura esquemática do procedimento de recuperação embrionária.	29
Figura 4. Embrião equino no estágio de mórula - Grau 1.	31
Figura 5. Embrião equino no estágio de blastocisto inicial - Grau 1.	32
Figura 6. Embrião equino no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível - Grau 1	32
Figura 7. Embrião equino no estágio de blastocisto expandido - Grau 1.	32
Figura 8. Embrião no estágio de blastocisto inicial; presença de blastômeros extrusados (setas) - Grau 2.	33
Figura 9. Embrião no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas) - Grau 3.	33
Figura 10. Par de ovócitos não fertilizados.	33
Figura 11. Procedimento de inseminação artificial.	41
Figura 12. Procedimento de contenção e higienização do animal no tronco.	41
Figura 13. Procedimento de recuperação do embrião pelo copo coletor.	42
Figura 14. Figura esquemática mostrando o embrião entre as colunas de ar, meio de dentro de uma palheta.	43
Figura 15. Avaliação de um embrião D8.	44
Figura 16. Realização da Transferência de embrião.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BI – Blastocisto Inicial

BL – Blastocisto

BX – Blastocisto Expandido

CL – Corpo lúteo

D – Dia

DPBS – Dulbecco's Phosphate – Buffered Saline

EHV – Herpesvírus

E2 – Estrógeno

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GAP – Estruturas de comunicação entre células

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

IA – Inseminação Artificial

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IETS – Sociedade Internacional de Transferência Embrião

IM – Intramuscular

LH – Hormônio Luteinizante

MCI – Massa Celular Interna

Mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MO – Mórula

Ng – Nanograma

P4 – Progesterona

PGF2 α – Prostaglandina

SRD – Sem raça definida

TE – Transferência Embrião

UFO – Ovócito não Fertilizado

VA – Vagina Artificial

X - Vezes

ZP – Zona Pelúcida

μ g – Micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

º - Número ordinal

°C - Graus Celsius

> - Maior

< - Menor

≥ - Maior ou igual

≤ - Menor ou igual

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Fisiologia reprodutiva da égua	15
2.1.1. Hormônios relacionados à reprodução equina	16
2.1.1.1. Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH).....	16
2.1.1.2. Prostaglandinas	16
2.1.1.3. Estrógenos (E2).....	17
2.1.1.4. Progesterona (P4) ou Progestágenos.....	17
2.1.1.5. Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).....	18
2.1.1.6. Ocitocina	18
2.2. Seleção e manejo de éguas doadoras e receptoras	18
2.3. Sincronização e ovulação entre doadoras e receptoras	19
2.4. Coleta de sêmen	20
2.5. Inseminação Artificial.....	21
2.6. Fecundação.....	23
2.7. Clivagem.....	24
2.8. Compactação	25
2.9. Transporte do embrião no oviduto	25
2.10. Blastocisto	26
2.11. Surgimento da cápsula e de desprendimento da zona pelúcida	27
2.12. Coleta do embrião	28
2.13. Manipulação e avaliação do embrião.....	29
2.14. Técnica de transferência de embrião.....	34
2.15. Confirmação da gestação com o uso da ultrassonografia	34
2.16. Importância Sanitária e Nutricional	35
3. OBJETIVOS	37

3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivo específico	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Local de estudo e coleta de dados	38
4.2. Animais	38
4.3. Manejo e sanidade das éguas doadoras e receptoras.....	38
4.4. Questionário	39
4.5. Palpação e ultrassonografia transretal.....	39
4.6. Monta Natural e Inseminação Artificial.....	39
4.7. Coleta e avaliação do embrião	41
4.8. Transferência do Embrião	44
4.9. Diagnóstico de Gestação	45
4.10. Análise Estatística	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS	52
8. APÊNDICE I.....	59

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos ocorreu um crescimento significativo no mercado equino, o que aliado ao desenvolvimento de biotecnologias aplicadas a reprodução, possibilitou um melhor rendimento dos animais e uma aceleração no aperfeiçoamento das raças e seus cruzamentos (TOMAZELLA, 2013). De acordo com dados do IBGE, (2017) o rebanho nacional de equinos é o quarto maior do mundo; no Brasil existem aproximadamente 5.501.872 cabeças, onde destas 883.059 se encontram na região Norte.

A geração de cavalos destinados as atividades esportivas sofreu um grande progresso na economia mundial como fonte geradora de empregos, sendo um mercado de constante crescimento nas últimas décadas (MONTECHIESI, 2015). Devido à importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer, não sendo mais apenas utilizado para o transporte ou tração animal, é indiscutível o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008).

A transferência de embriões (TE) e a inseminação artificial (IA) na espécie equina são biotécnicas de importância na indústria de cavalos, pois a partir dessas técnicas pode ser gerado um acelerado progresso genético no plantel existente (BORTOT, 2013). Especificamente em relação à TE, essa biotecnologia possibilita a obtenção de descendentes de animais que se tornaram subférteis por algum problema adquirido, melhor utilização de éguas que possuem um alto valor zootécnico e sejam idosas ou que estejam em atividades esportivas (LIRA, 2009). Além disso, permite maior controle de doenças quando da transferência de material genético que seja entre os estados ou países, através de exportações de embriões congelados (ARRUDA, et al., 2001).

Os profissionais Médicos Veterinários especializados na TE devem ser capazes de identificar e avaliar adequadamente os embriões obtidos. A avaliação do estágio de desenvolvimento, a graduação, o formato dos embriões e a capacidade de diferenciar embriões de ovócitos não fertilizados (UFOs) e estruturas não embrionárias que possam vir a ser coletadas durante o procedimento de lavagem uterina também são habilidades importantes (MCCUE, 2011).

A taxa de prenhez pode ser considerada um dos parâmetros mais importantes na avaliação da eficiência de um programa de TE. Essa taxa pode ser influenciada pelas variáveis dentro de alguns componentes, tais como: método de transferência, equipe técnica, tamanho e idade dos embriões, morfologia embrionária, sincronia entre doadora e receptora, idade e histórico das éguas, estação do ano e manejo da receptora (CARNEVALE et al., 2000).

Este estudo tem como objetivo correlacionar a classificação do grau de qualidade embrionária, o formato embrionário dos embriões das éguas doadoras e comparar com a taxa de prenhez das éguas receptoras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia reprodutiva da égua

Com a seleção evolutiva que decorreu durante milhares de anos, o cérebro das éguas foi programado para reconhecer o comprimento do dia, e ser capaz de iniciar o seu período reprodutivo (estral) apenas quando os dias forem suficientemente longos, ou seja, quando estiver chegando a primavera (MARIZ, 2008). A exposição dessas espécies a fotoperíodos curtos, como dias mais curtos e noites longas provoca a inibição do sistema reprodutivo e anestro das fêmeas (ROCHA et al., 2011). A duração do dia também é um fator determinado pela latitude; éguas que se encontram em regiões mais ao norte ou ao sul da linha do Equador irão iniciar a sua ciclicidade mais tarde do que aquelas próximas a linha do Equador, sendo esses animais os que sofrem pouca variação estacional, quanto a extensão do ciclo estral (ARISTIZÁBAL, 2017).

Éguas são poliéstricas estacionais e apresentam váriosaios somente em uma época do ano, na primavera/verão. Nessas estações, onde os dias se tornam mais longos, com a temperatura mais elevada e pastagens mais abundante, que as éguas saem do anestro e iniciam os ciclos estrais (TEZZA; DITTRICH, 2006). Existe um período do ano caracterizado pela passagem das éguas que estão em anestro para o período cíclico, denominado de período transicional, em que as fêmeas demonstram comportamentos de cio, porém não desenvolvem estruturas foliculares capazes de ovular (LEY, 2013).

Na fêmea equina o aumento da luminosidade diária atua sobre o eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal para que haja a diminuição da produção de melatonina. Quando liberada pela glândula pineal, inibe a produção de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo. A frequência da liberação de GnRH pelo hipotálamo afeta a produção hipofisária e libera os hormônios foliculos estimulantes (FSH) e luteinizante (LH) (TEZZA; DITTRICH, 2006). O FSH é o hormônio responsável pelo crescimento dos foliculos ovarianos, os quais, na presença do LH estimula a produção de estrógeno. E o LH, por sua vez, é responsável pela ruptura da parede do foliculo levando a ovulação. E os receptores presentes nos ovários respondem ao FSH e ao LH induzindo ao recrutamento, ocorre uma seleção e uma dominância folicular (LEY, 2006).

O ciclo estral é definido como o intervalo entre duas ovulações, em que o início da ovulação equivale ao (dia 0) e término no dia anterior próximo da ovulação e sua duração é de aproximadamente 21 dias em éguas. O ciclo estral é dividido em duas fases: estro ou fase folicular e diestro ou fase luteal (ARISTIZÁBAL, 2017).

A progesterona durante o período de estro é tipicamente inferior a 1ng/mL no sangue periférico. O diâmetro folicular na ovulação varia de 30 a 70mm, sendo mais comum ao redor de 40 a 45mm (MEIRA, 2007). A égua ovula 24 a 48 horas antes dos sinais de cio aparecerem. É um evento fisiológico importante de ser observado, pois na maioria das vezes as éguas são cobertas ou inseminadas após a ovulação simplesmente porque ainda apresentam demonstração de sinais de cio. Se essa cobertura ou inseminação ocorrer depois da 12 a 14 horas da ovulação, o óvulo será muito velho para ser fertilizado, levando a uma falha de desenvolvimento embrionário (LEY, 2006).

Em um animal que falha em engravidar, que não foi coberto ou exposto a um garanhão ou que já sofreu a morte embrionária precoce (antes de 12 a 14 dias), o endométrio secreta a prostaglandina, pela circulação sistêmica, afetando o corpo lúteo (CL) e induzindo a sua regressão (luteólise). A produção de progesterona declina entre 4 a 40 horas seguintes e a égua começa a mostrar sinais de receptividade, levando a seu próximo ciclo estral (MEIRA, 2007).

2.1.1. Hormônios relacionados à reprodução equina

2.1.1.1. Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)

O hipotálamo é considerado o ponto chave do comando reprodutivo e produz o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), liberado no sistema porta hipotalâmico-hipofisário a fim de estimular a síntese e a liberação de gonadotrofinas, ou seja, (FSH) e (LH), responsáveis pela maturação folicular, produção de estrógeno, ovulação e luteinização do (CL) (ALJARRAH, 2004).

O GnRH pode ser utilizado para iniciar um crescimento folicular ou uma indução da ovulação. Na maioria das éguas tratadas com esse hormônio ocorre a ovulação 36 a 42 horas pós tratamento. Há uma diferença entre o tempo de ovulação, que varia segundo a droga utilizada, sendo, em média de 24 a 48 horas para o acetato de busrelina e de 36 a 48 horas para a deslorelina. A eficiência da deslorelina em reduzir o número de coberturas torna-se de grande auxílio para os programas de transferência de embriões (TE) e inseminação artificial (IA) (FARIA; GRADELA, 2010).

2.1.1.2. Prostaglandinas

A grande parte dos tecidos do organismo secreta prostaglandinas. Essas são classificadas como ácido graxo insaturado com um anel de ciclopentano. O ácido araquidônico é o precursor das prostaglandinas PGF₂ α e PGE₂, seus análogos são os hormônios mais

utilizados na reprodução de equinos, sendo administrados preferencialmente por via intramuscular (IM) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Estas estão intimamente ligados a reprodução, sendo liberados no trato reprodutivo em função de estímulos endócrinos, neurais e físicos (MELO, 2006).

Após aplicação, a égua retorna ao estro de dois a cinco dias e a ovulação em sete a doze dias. Para sincronização e indução de estro, recomenda-se a aplicação PGF2 α duas vezes em qualquer fase do ciclo estral, com intervalo de 14 dias entre as aplicações, ou aplicado em dose única após a detecção de um CL. A PGF2 α também é eficaz no tratamento de endometrite, pois aumenta a intensidade das contrações uterinas auxiliando no processo de limpeza do útero (FARIA; GRADELA, 2010).

2.1.1.3. Estrógenos

Os estrógenos (E2) são hormônios esteroides associados aos sinais de estro e sua síntese se dá principalmente pelos folículos ovarianos. A concentração de E2 folicular atinge o pico de um ou dois dias antes da ovulação (SILVA, 2014). Quando a progesterona está em baixa concentração (<1ng/mL), o E2 secretado induz a receptividade sexual da fêmea, ocorrendo o relaxamento da cervix e vulva, estimulando a produção de secreções do trato genital, permitindo a passagem e o transporte espermático (MELO, 2006). O E2 aumenta significativamente o fluxo sanguíneo ao útero melhorando a condição de defesa do órgão (LOPES, 2015).

A administração de uma pequena dose de estradiol em éguas, tem capacidade de induzir sinais de estro em animais que se encontram em anestro dentro de 3 a 6 horas, sendo interessante quando se deseja utilizar uma égua como “manequim” para a coleta de sêmen (FARIA; GRADELA, 2010).

2.1.1.4. Progesterona ou Progestágenos

A progesterona (P4) é o progestágeno natural secretado pelas células luteínicas do CL, pela placenta e pelas glândulas adrenais (LOPES, 2015). Sua secreção é estimulada primariamente pelo LH, tendo a função de promover o encerramento dos sinais de estro, inibir a receptividade ao macho, preparar o útero para a recepção do embrião e manter a gestação inicial aumentando a atividade secretora das glândulas endometriais e a tonicidade uterina. Além disso, inibe a liberação episódica de LH quando em níveis elevados, sendo, portanto, um importante regulador do ciclo estral (SILVA, 2014).

As principais indicações do uso da P4 incluem a inibição do comportamento de estro, manutenção da gestação, melhora do tônus uterino, sincronização do estro e da ovulação em

éguas cíclicas, melhoramento do aproveitamento de éguas como receptoras de embriões (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.1.1.5. Gonadotrofina Coriônica Humana

O hCG é uma grande molécula glicoproteica que quando utilizada em repetidas aplicações promove o desenvolvimento de anticorpos, tornando-a ineficiente como promotora da ovulação. Das diversas possibilidades para sincronizar a ovulação da égua, o uso de análogos da prostaglandina associados a aplicação de hCG provoca a ovulação em até 48 horas (MELO et al., 2005).

2.1.1.6. Ocitocina

É um hormônio responsável pela contração da musculatura lisa do útero e oviduto, assim como das células mioepiteliais da glândula mamária. É um estimulante miometrial de eleição no tratamento de endometrite, pois auxilia na limpeza uterina em éguas e também na indução de parto, tratamento de retenção de placenta e como estimulante para liberação do leite (FARIA; GRADELA, 2010).

2.2. Seleção e manejo de éguas doadoras e receptoras

Devido ao alto custo da TE, sua utilização é normalmente restrita a éguas doadoras de qualidade superior, e principalmente de alto valor zootécnico. Na seleção da doadora devem ser considerados o seu histórico reprodutivo, a fertilidade, os genitores, as diretrizes do registro da raça, o valor potencial do potro resultante, a idade, conformação da vulva, condição uterina e o número de gestações desejadas (SQUIRES et al., 1999).

O manejo reprodutivo consiste em monitorar, com emprego da palpação transretal e ultrassonografia, a atividade folicular e ovulação, além de observar o momento certo do 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, congelado ou monta natural (SILVA, 2014).

Em geral as éguas velhas apresentam baixa fertilidade e quando em programas de TE, os índices de recuperação embrionária também são baixos, refletindo a dificuldade durante o processo de fecundação ou desenvolvimento e manutenção embrionária intrauterina. As éguas velhas com histórico de obtenção de prenhez e perda embrionária tardia são melhores doadoras que aquelas repetidoras de cio (SQUIRES; SEIDEL, 1995), pois as últimas normalmente apresentam endometrite crônica degenerativa, o que dificulta a manutenção e desenvolvimento embrionário adequado, resultando em perda embrionária (MEIRA, 2007). Vale ressaltar

também que uma receptora agitada e não manejável, representa um risco para os profissionais e pode levar a perdas embrionárias, devendo ser escolhidos para a reprodução animais fáceis de serem manejados e cabresteados (MCKINNON; SQUIRES, 2007).

A ultrassonografia transretal é um procedimento recomendado no momento da seleção das receptoras, bem como no ato da transferência, pois permite a avaliação das características uterinas e ovarianas, especialmente do CL. Este exame permite a observação de anormalidades como endometrite ou cistos foliculares e o possível descarte da receptora, já que esta irá reconhecer o embrião e terá que fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento. Um ponto a ser levado em consideração é a habilidade reprodutiva da receptora para o sucesso da técnica de TE, podendo atingir altos índices de prenhez pós inovulação (MEIRA, 2007).

As receptoras também devem ser examinadas frequentemente quando em cio para o monitoramento do crescimento folicular e a ovulação (VANDERWALL; WOODS, 2007). Esses animais devem ser escolhidos com base na saúde reprodutiva, ausência de alterações músculo esquelético, boa saúde dentária e visão, boa qualidade de úbere e bom comportamento. Também devem ser considerados para escolha da receptora o tamanho e o padrão semelhante ao da doadora e possuir boa habilidade materna. Todas devem ser adequadamente identificadas para evitar confusões no momento dos registros dos potros (ALONSO, 2008).

É indicado que pelo menos duas receptoras estejam sempre disponíveis para cada doadora (MCKINNON; SQUIRES, 2007), permitindo assim que no momento da inovulação, possa ser selecionada a que apresenta as melhores condições reprodutivas para receber o embrião. As receptoras podem ser classificadas por palpação e ultrassonografia transretal como: aceitáveis, quando apresentaram CL bem definido, tônus uterino e cervical variando de bom a excelente e nenhuma outra alteração no útero ou; marginalmente aceitáveis, quando observado na imagem ultrassonográfica o CL trabeculado ou ainda com pouca tonicidade uterina e cervical (CARNEVALE et al., 2000). Sobre a parte de sanidade das éguas receptoras, é recomendado que quando introduzidas no rebanho, devem apresentar atestado negativo para as seguintes doenças: anemia infecciosa equina e também para o mormo, além de controle parasitário, fatores que constituem uma ameaça a saúde das éguas em gestação (FUTINO, 2005).

2.3. Sincronização e ovulação entre doadoras e receptoras

A sincronização dos ciclos estrais de éguas receptoras e doadoras é uma das atividades que consomem mais tempo dentro da TE. A sincronização do estro e da ovulação permite um controle de quando as éguas irão ser cobertas ou inseminadas em um período pré-estabelecido, com ou sem a detecção do cio. A principal aplicação da sincronização do cio e da ovulação em

égua é na TE e as receptoras devem sofrer ovulação um dia antes a dois dias depois da ovulação da doadora (EVANGELISTA, 2012).

O momento de sincronia entre o embrião e o ambiente uterino da receptora é de suma importância para o estabelecimento da gestação; o ambiente uterino se modifica com a influência da P4, sendo assim um embrião em um útero que não esteja sincronizado está sujeito a variações hormonais e fatores de crescimento que não correspondem a fase a qual ele se encontra (NETO, 2017).

O estro e a ovulação podem ser sincronizados e os hormônios mais utilizados nesse processo são os progestágenos e estrógenos, (PGF2 α) e análogos, (hCG) e (GnRH) e análogos (EVANGELISTA, 2012). Quando utilizado a PGF2 α em uma receptora ovulada, acontece a antecipação do próximo ciclo permitindo que a égua possa estar rapidamente disponível para outro embrião (LOPES, 2015).

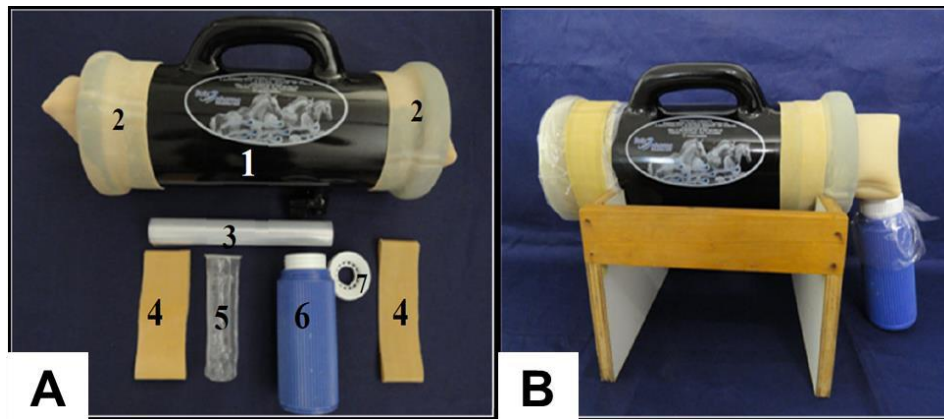
Um estudo realizado por Rodrigues et al., (2012), testou a administração de P4 de longa ação (P4^{LA}) em receptoras no D0 com a realização de ovulações no D2 e comparou as receptoras ovuladas entre o D4 e D8 sem a administração de (P4^{LA}), tendo um resultado satisfatório e comprovando que a utilização de P4^{LA} no momento da ovulação da receptora antecipa a utilização da mesma para o D2.

2.4. Coleta de sêmen

Essa coleta é realizada após o exame reprodutivo externo do garanhão. Neste procedimento, avalia-se o estado geral do animal, os órgãos genitais, a textura e circunferência testicular, os aprumos, a temperatura e sensibilidade. Se o animal estiver apto a realizar a cobertura, procede-se a montagem da vagina artificial (VA) (SILVA, 2018).

Realiza-se a montagem da VA aquecendo aproximadamente cinco litros de água a 55°C, onde uma parte será utilizada dentro do VA e o restante para aquecer o diluidor de sêmen. São acoplados uma mucosa descartável, um copo coletor revestido com um saco plástico transparente; o sêmen obtido é represado em um filtro de nylon para separar a fração gel (SILVA, 2018).

Figura 1. Componentes da Vagina Artificial (1) Tubo Rígido, (2) Mucosa de Látex, (3) Mucosa Plástica, (4) Anéis de Látex, (5) Camisa interna, (6) Copo coletor e (7) tampa. (A) V.A. (B) montada.



Fonte: Adaptado de SILVA, 2018.

A técnica mais usada e correta é a utilização de um manequim para realizar a colheita. O garanhão irá subir no manequim em vez de realizar a monta na égua, sendo uma técnica mais segura para o médico veterinário, garanhão e égua (BOCHIO, 2006). Porém nem todas as propriedades que trabalham com reprodução equina possuem manequim para que possam realizar a colheita de sêmen, então se utiliza uma fêmea que se apresenta no cio, é devidamente contida para servir de manequim. O garanhão é colocado próximo a fêmea para estimulá-lo á cópula. Neste momento, ele expõe o pênis fazendo o reflexo de Flehmen (erguimento do lábio superior) (SILVA, 2018). A utilização de sêmen, fresco, resfriado, possui maior flexibilidade de controle folicular, momento e local de deposição do sêmen. Ao contrário, o sêmen congelado exige um manejo mais rígido, as palpações retais são mais frequentes e, quanto ao local de deposição o mais profundo no corno uterino á ovulação (SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007).

2.5. Inseminação Artificial

A IA em equinos é amplamente praticada em todo o mundo. A maneira mais comumente utilizada nessa espécie é mediante o resfriamento e transporte de sêmen (BORTOR, 2013).

Antes de realizar qualquer procedimento reprodutivo em éguas é necessário fazer uma avaliação externa, observando o escore corporal do animal, a presença de ectoparasitas, lesões em algumas extremidades do corpo; sistema reprodutor, examinar a região do períneo e sua integridade. Já a realização dos exames dos órgãos reprodutivos é feita pela palpação retal avaliando-se os tónus e o tamanho do útero e com auxílio da ultrassonografia visualiza-se a presença de cistos e conteúdos intrauterinos e nos ovários são observados o tamanho e a atividade (SILVA, 2018).

O acompanhamento da dinâmica folicular é fundamental em um programa de TE e deve ser realizado diariamente através de ultrassonografia para se detectar folículo com diâmetro maior de 35mm para depois observar a ovulação e realizar a IA. Sempre que for possível, deve-se utilizar indutores de ovulação, pois desta forma apenas uma IA é necessária (RIERA et al., 2009).

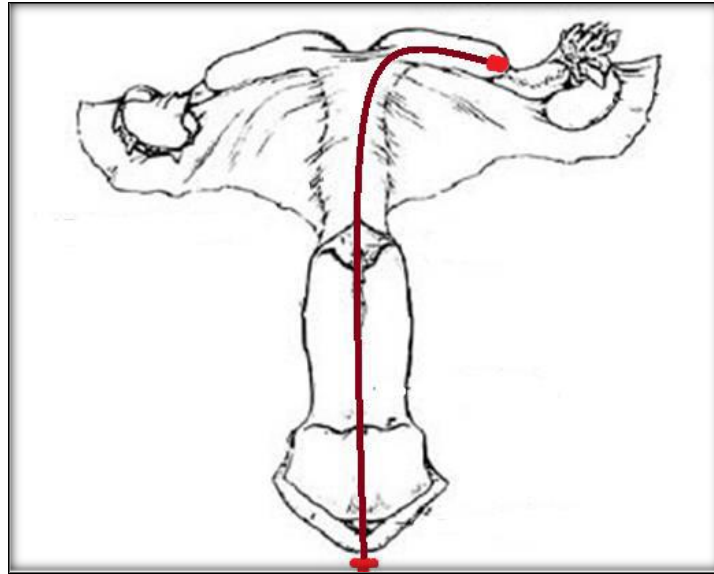
O procedimento de escolha do garanhão, na maioria das vezes, é baseado na avaliação das características morfológicas, aprumos, órgãos genitais, além de textura, temperatura, sensibilidade e circunferência testicular (SILVA, 2018).

Quando se usa o sêmen fresco ou refrigerado, as IAs são realizadas 24 horas após a indução da ovulação. Esses tipos de sêmen tem uma melhor qualidade por não sofrerem alterações de temperatura e possuem maior concentração espermática na dose inseminante. Após 24 horas da indução, faz-se a IA, onde a égua é contida adequadamente, tem a cauda levantada e enfaixada e são higienizadas na região de períneo e vulva. A inseminação convencional em éguas é por via vaginal, na qual o inseminador possui a mão enluvada, direciona uma pipeta até a passagem da cérvix e o sêmen é depositado no corpo do útero (MIES, 1987). No dia posterior a IA, realiza-se exame ultrassonográfico para a confirmação da ovulação, caso não tenha ocorrido, a fêmea é induzida novamente e inseminada (SILVA, 2018).

O sêmen congelado possui menor habilidade em interagir com as células do oviduto, mantendo sua viabilidade por menos tempo (SQUIRES et al., 1999). O acompanhamento ultrassonográfico é realizado a cada 2 horas e são avaliadas as mudanças nas imagens relacionadas a diminuição do edema uterino, as células da granulosa hiperecoicas, o formato irregular do folículo pré-ovulatório e maior flutuação, além da sensibilidade ao ser tocado. Para detectar a ovulação na égua se observa a formação de uma massa homogênea, hiperecoica (corpo hemorrágico) no lugar do folículo (SILVA, 2018).

O procedimento de higienização da égua é da mesma forma que realiza no sêmen fresco ou refrigerado. No entanto, o material e a técnica são diferentes; é utilizada uma pipeta flexível específica para a palheta de 0,5mL e a técnica intracornual profunda (Figura 2), que direciona a pipeta de inseminação pelo corno uterino ipsilateral ao ovário desejado e permite a deposição do sêmen o mais próximo possível do final do corno uterino (SILVA, 2018).

Figura 2. Ilustração da técnica Intracornual profunda.



Fonte: Adaptado de SILVA, 2018.

O sucesso da IA em grande parte é decorrente da habilidade do técnico em realizar o procedimento (SAMPER, 2009). A inseminação traz diversas vantagens para se obter um índice de prenhez, entre elas pode-se destacar: a eliminação dos riscos de lesões ao garanhão e a égua; uma coleta de sêmen de um garanhão pode ser dividida em várias doses; ocorre a diminuição dos riscos de transmissão de doenças venéreas; reprodução a longa distância devido a possibilidade de enviar o sêmen e; crescimento cada vez mais de mercados expandidos nacionais e internacionais (LEY, 2006; COSTA, 2014).

2.6. Fecundação

No momento da ovulação ocorre a liberação do ovócito maturado, o qual foi submetido a várias transformações durante o seu desenvolvimento folicular, como a formação da zona pelúcida e a retomada e finalização da primeira divisão meiótica, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, em preparo para a fecundação. A placa metafásica marca o início da segunda divisão meiótica, porém a meiose não pode continuar até que ocorra a penetração do espermatozoide no ovócito (GINTHER, 1992).

Para atingir a capacidade de fecundação, os espermatozoides passam por várias modificações incluindo a maturação, capacitação e a reação do acrossomo. Os componentes de sua superfície são modificados ou removidos pelas secreções do trato genital feminino, desestabilizando a bicamada fosfolipídica e permitindo a ativação do acrossomo. Essa capacitação desencadeia a reação acrossomal que envolve a fusão da membrana plasmática do

espermatozoide com a membrana externa do acrossomo, seguida por uma extensa vesiculação sobre o segmento anterior do acrossomo. Com isso, essa reação promove a liberação de enzimas hidrolíticas, como as hialuronidase e acrosina que são enzimas necessárias para a penetração no ovócito (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A ligação da cabeça espermática à zona pelúcida é regida por receptores espermáticos específicos na sua superfície. Essa zona pelúcida é sintetizada por ovócitos em maturação, sendo que sua matriz extracelular é constituída por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, presentes em todas as espécies de mamíferos. A ZP1 e ZP2 são glicoproteínas estruturais, enquanto que a ZP3 age como receptor espermático (HERRLER; BEIER, 2000; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Apenas espermatozoides com acrossomos intactos podem se ligar à glicoproteína ZP3. A ligação da cabeça espermática à ZP3 permite interações com outras zonas competentes que estimulam a ativação do acrossomo, ocorrendo a liberação de enzimas que digerem uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica e estimula a segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar. Os dois pró-núcleos presentes, masculino e feminino, migram para o centro do ovócito, os envelopes nucleares se rompem e então se fundem, formando um núcleo diplóide e forma a primeira célula do conceito, chamada zigoto. A singamia, é finalizada e ocorre a fecundação e o estímulo do zigoto a iniciar o seu desenvolvimento (GINTHER, 1992; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Após a fecundação, ocorrem modificações na estrutura de superfície do ovócito para impedir a penetração de outro espermatozoide, ou seja, a polispermia (HERRLER; BEIER, 2000). O início do bloqueio a polispermia ocorre com a penetração do espermatozoide no ovócito, quando os grânulos corticais são liberados dentro do espaço perivitelínico. A liberação do conteúdo desses grânulos provoca uma reorganização extensa da zona pelúcida ou reação cortical da superfície vitelina, resultando na liberação de enzimas que provocam endurecimento da zona pelúcida e inativação dos receptores espermáticos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.7. Clivagem

Depois do estágio de zigoto, os embriões sofrem uma série de divisões mitóticas denominadas clivagens. A primeira clivagem do embrião acontece 24 horas após a fecundação (HERRLER; BEIER, 2000). Nessas divisões celulares o diâmetro do zigoto e posterior embrião

clivado não se altera, até a formação de um blastocisto, que ocorre geralmente após o embrião adentrar o útero (GINTHER, 1992; BETTERIDGE, 2000).

As divisões iniciais ocorrem simultaneamente em todos os blastômeros, ou seja, após algum tempo essa sincronização é perdida. Entretanto, na espécie equina ocorre um excessivo processo de deutoplasmólise através da qual se observa a extrusão do material embrionário para o espaço perivitelínico, desde os primeiros estágios de desenvolvimento. A partir do estágio de 16 blastômeros, o material extrusado vai diminuindo e desaparece. O processo de deutoplasmólise parece estar associado à quantidade de lipídeos presente no ovócito. Em ovócitos particularmente ricos em lipídeos, como os de equino, bastante material é eliminado durante a segmentação (GINTHER, 1992).

2.8. Compactação

Os blastômeros até o estágio de 8 células, formam um arranjo frouxo, com espaço abundante entre eles. Em seguida ocorre à terceira clivagem com grande alteração no comportamento dos blastômeros. Eles se agrupam maximizando o contato entre si, formando uma massa esférica compacta de células. Este arranjo compacto é estabilizado por junções que se formam entre as células externas da massa celular. As células internas da esfera formam junções do tipo "gap", permitindo deste modo, o transporte de pequenas moléculas e íons entre as células (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Aproximadamente de 4 a 5 dias após a fecundação, o embrião apresenta-se com 16 a 32 células (GINTHER, 1992). Uma vez que o embrião tenha formado 16 blastômeros, ele é denominado mórula (HERRLER; BEIER, 2000). Durante esta fase, o embrião é transportado do local da fecundação, para a região da ampola do oviduto, seguindo em direção ao útero, onde deve acontecer o desenvolvimento da gestação (BETTERIDGE, 2000).

2.9. Transporte do embrião no oviduto

Segundo Allen (2000), existem diferenças importantes no transporte de ovócitos e embriões no oviduto equino quando comparado às outras espécies de mamíferos. Um fenômeno exclusivo que acontece é a retenção de ovócitos não fecundados ou embriões não viáveis no oviduto, sendo que estes podem ser retidos por até 7 meses ou mais e são eventualmente degenerados pelo próprio organismo. Essa retenção ocorre nas dobras tortuosas da mucosa do oviduto, podendo o ovócito se alojar no terço médio do oviduto ou na região da junção ístimoampola (GINTHER, 1992; ALLEN, 2000; BETTERIDGE, 2000; ALLEN, 2001). Por

outro lado, se o ovócito é fecundado, resultando em um embrião, eles atravessam a junção útero-tubária, entrando no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação (D6), no estágio de desenvolvimento de mórula tardia ou blastocisto inicial (BETTERIDGE et al., 1982; ALLEN, 2000; BETTERIDGE, 2000; ALLEN, 2001).

Alguns autores relatam que o embrião viável começa a secretar grande quantidade de PGE2 quando atinge o estágio de mórula compacta, no quinto dia após a ovulação (GINTHER, 1992; ALLEN, 2000; BETTERIDGE, 2000; SHARP, 2000; ALLEN, 2001; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005). Essa PGE2 tem a capacidade de provocar contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, atuando na parede do oviduto, permitindo assim que esse embrião se mova progressivamente com o auxílio do batimento ciliar rítmico, entrando no útero aproximadamente após 24 horas (GASTAL et al., 1998). Desta forma, este estágio de desenvolvimento depende da capacidade que o embrião tem de liberar a PGE2 (ALLEN, 2000).

2.10. Blastocisto

Com as várias fases de desenvolvimento das junções intercelulares compactas da mórula, ocorre o acúmulo de fluido no interior da cavidade central formando um blastocele, quando é detectado, é denominado blastocisto inicial (GINTHER, 1992). A relação do tempo entre o surgimento do blastocele e a entrada no útero não está completamente determinada, sendo possível chegar no útero um embrião no estágio de mórula tardia ou blastocisto inicial. O conceito entra no útero no dia 6, quando tem aproximadamente 0,2 mm de tamanho (BETTERIDGE et al., 1982; SHARP, 2000).

Segundo Ginther (1992), as células do embrião nessa fase se diferenciam em dois grupos, o trofoblasto e o embrioblasto. O trofoblasto é gerado a partir das células da massa celular externa, sendo compostos por células colunares recobertas por densas microvilosidades e que tem funções de captação de nutrientes seletivos. Este grupo de células forma o córion, a porção embrionária da placenta, que permite ao feto receber oxigênio e alimento a partir da mãe. Estas células do trofoblasto são necessárias para a implantação do embrião na parede uterina. Já as células embrioblasto, que se projetam para o interior do blastocele é formado a partir da massa celular interna (MCI) e originará o embrião propriamente dito. As células do interior da MCI são unidas por junções do tipo "gap" e interconectadas por uma elaborada cadeia de microvilos longos e sintetizam proteínas diferentes em relação ao trofoblasto. O embrioblasto se desenvolve em três camadas germinativas primárias do embrião (ectoderme, mesoderme e endoderme) durante o processo de gastrulação. O diâmetro da vesícula

embrionária nos próximos dias varia bastante e o estágio de desenvolvimento parece mais relacionado com o diâmetro e morfologia do que com a idade (GINTHER, 1992).

2.11. Surgimento da cápsula e de desprendimento da zona pelúcida

O desenvolvimento inicial do embrião equino é caracterizado pela formação de uma cápsula que envolve completamente o concepto. A cápsula é uma fina camada celular e transparente depositada entre a zona pelúcida e o trofoblasto no momento da formação do blastocisto intra-uterino no dia 6 ou 7 após a ovulação, sendo composta por glicoproteínas semelhantes à mucina produzidas pelo trofoblasto (BETTERIDGE et al., 1982; GINTHER, 1992; ORIOL et al., 1993; CHU et al., 1997; ALLEN, 2001). A zona pelúcida provavelmente não é necessária na formação da cápsula, uma vez que blastocistos sem zona pelúcida transferidos no dia 7 têm a cápsula aparentemente normal quando examinados uma semana depois (GINTHER, 1992).

O blastocisto se desenvolve rapidamente após sua entrada no útero, ocorrendo uma diminuição na espessura da zona pelúcida. Desta forma ela se desprende da cápsula em poucos dias (D8), a cápsula então permanece no exterior, revestindo completamente o embrião (GINTHER, 1992; CROSSETT et al., 1998; BETTERIDGE, 2000; STOUT et al., 2005). A presença da cápsula contribui para esse afrouxamento e perda da zona pelúcida (STOUT et al., 2005).

Supõe-se que a função da cápsula seja semelhante à da zona pelúcida, substituindo-a após a sua perda (GINTHER, 1992). Ela tem uma grande responsabilidade na manutenção da forma esférica do concepto durante o período do reconhecimento materno da gestação. Embora, a cápsula é bastante resistente e elástica, funcionando como uma proteção física ao concepto durante a fase de migração, permitindo que ele migre de uma extremidade à outra no lúmen uterino (ORIOL et al., 1993; BETTERIDGE, 2000; SHARP, 2000; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007). Além disso, a cápsula atua fornecendo proteção contra o estresse mecânico das contrações miométriais e também no funcionamento como uma defesa biológica contra ataques virais e bacterianos ou ataques imunológicos materno (STOUT et al., 2005).

Com a remoção da cápsula e posterior a TE para éguas receptoras foi demonstrado que nenhum embrião desprovido da cápsula desenvolveu a gestação, enquanto que os embriões que não tiveram a cápsula removida desenvolveram perfeitamente a gestação, comprovando que a cápsula é essencial na viabilidade dos embriões equinos (CAIXETA et al., 2008).

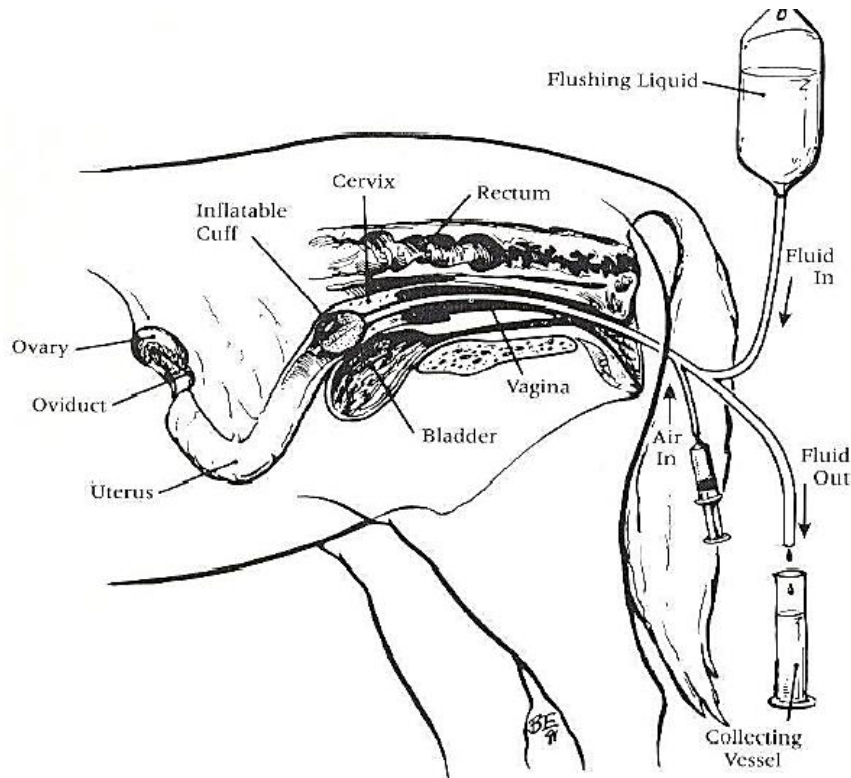
2.12. Coleta do embrião

Ocorrida a ovulação, recomenda-se que a colheita de embriões seja realizada nos dias 7 (D7) ou 8 (D8) após a ovulação (D0). Quando o objetivo da coleta é o congelamento de embrião, o controle de desenvolvimento folicular deve ser realizado com intervalos menores que 24 horas e o lavado uterino é realizado no dia 6 (D6) pós ovulação. Os embriões não são rotineiramente colhidos no dia 9 (D9) porque o sucesso destes nas taxas de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando da recuperação entre os dias D7 ou D8 (FLEURY, 2007).

O primeiro relato sobre a técnica de (TE) em equinos foi realizado por Allen e Rowson (1972); os embriões eram coletados e transferidos por métodos cirúrgicos, via laparotomia, pelo flanco ou linha média. O método não cirúrgico em éguas foi realizado pela primeira vez no Japão por Oguri e Tsutsumi (1980). A partir de então tem sido difundido em diversos países, sendo considerada uma das biotécnicas mais utilizadas na reprodução assistida de equinos. No Brasil, a primeira descrição dessa técnica foi feita por Fleury e equipe em 1987.

No método transcervical, o embrião é recolhido através de uma lavagem uterina (*flushing*) da égua doadora, utilizando para tal de 2 a 3 litros de uma solução de Ringer com Lactato previamente aquecida a 37- 40°C (MC KINNON et al., 1988). Utiliza-se um cateter do tipo Foley, semirrígido, que passa através da cérvix até ao corpo uterino. Este cateter possui um balão inflável na porção anterior que, quando cheio de ar, impede que o meio de lavagem reflua através da cérvix para a vagina. Esse balão é inflado com 40 a 80mL de ar, sendo que a quantidade de ar irá variar de égua para égua. O extremo posterior é ligado a duas vias, em que uma extremidade corresponde ao recipiente com o meio de lavagem e a outra ao filtro. Quando o cateter se encontra bem posicionado procede-se à introdução do meio de lavagem e sua posterior recolha (LENZI, 2008). Para facilitar este procedimento, pode-se colocar uma mão pelo reto, de modo a ser possível massagear e elevar os corpos uterinos tendo isto impacto positivo na saída do fluido. O filtro deve estar protegido da luz solar, por exemplo com papel prata, para reduzir os riscos de dano ao embrião. Quando se termina o procedimento, separa-se o filtro do circuito, já no laboratório, transferem-se os 20 a 30mL de meio de lavagem que ficaram residuais no filtro para placas de Petri estéreis com marcações (MC KINNON et al., 1988).

Figura 3. Figura esquemática do procedimento de recuperação embrionária.



Fonte: FUTINO (2005) apud SQUIRES (1993).

2.13. Manipulação e avaliação do embrião

A avaliação do rastreamento dos embriões é realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10x e para a classificação embrionária utiliza-se um aumento de 40x (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009). A placa de Petri deve estar previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de congelamento de sêmen de 0,25 ou 0,5mL acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de Petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção holding, dentre outros. Sob condições de higiene ambiental e operacional, quando esse embrião é encontrado, deve-se examinar sobretudo a sua qualidade e estado de desenvolvimento que se encontra (MC KINNON et al., 1988). A maioria dos embriões encontra-se em fase de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, devido a data da coleta, entre os dias D7 á D9, após a ovulação da doadora (LENZI, 2008).

A classificação dos embriões ocorre através da sua avaliação morfológica e se baseia na forma, cor, tamanho, uniformidade, extrusões e degenerações de blastômeros. A fase de avaliação é muito importante na classificação do embrião, pois a qualidade do embrião equino

é o fator que mais influencia as taxas de prenhes nos programas de transferências de embriões (FUTINO, 2005).

A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões, conforme as recomendações da IETS (Sociedade Internacional de Transferência Embrião) e descrito na Tabela 1. Em coletas realizadas entre D6 e D8 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 com sua viabilidade (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009).

Tabela 1. Estágios de Desenvolvimento do Embrião Equino.

ESTÁGIO	TAMANHO (µM)	DESCRIÇÃO
Mórula	150 a 200 µm	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores, borda externa dos blastômeros de aparência “serrilhada”; possibilidade de identificação do espaço perivitelinico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento á manipulação (Figura 4).
Blastocisto Inicial	150 a 250 µm	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros ; mínimo espaço perivitelinico, tamanho semelhante ao da mórula (Figura 5).
Blastocisto	150 a 300 µm	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina (Figura 6).
Blastocisto expandido	300 to > 1,000 µm	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade (Figura 7).
Ovócito não fertilizado (UFO)	125 a 150 µm	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola á manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados (Figura 8).

Fonte: Adaptado de MCCUE, 2011.

As características empregadas na determinação do escore de qualidade ou grau são (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009):

1. Formato do embrião (esférico, oval, colapsado etc.);
2. Espessura da zona pelúcida;
3. Uniformidade dos blastômeros (tamanho, cor, estrutura);
4. Presença/ausência de blastômeros extrusados ou degenerados;
5. Compactação dos blastômeros;
6. Grau de granulação ou fragmentação citoplasmática;

7. Presença/ausência e tamanho do espaço perivitelínico;
8. Sinais de desidratação ou enrugamento do embrião;
9. Presença/ausência de anomalias do blastocele;
10. Presença/ausência de lesão da zona pelúcida ou cápsula.

Com base nestas características, Mccue (2011) relata que embriões grau 1 (excelentes), tem que apresentar-se sem anomalias visíveis, com formato esférico, células de tamanho normal, cor e textura uniformes, tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós ovulação (Figuras 4, 5, 6, 7). Embriões grau 2 (bons) apresentam imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados, pequenas irregularidades de formato, tamanho, textura ou cor, pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula (Figura 8). Embriões grau 3 (ruins) demonstram nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados, afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula (Figura 9). UFO – Ovócito não fertilizado (Figura 10).

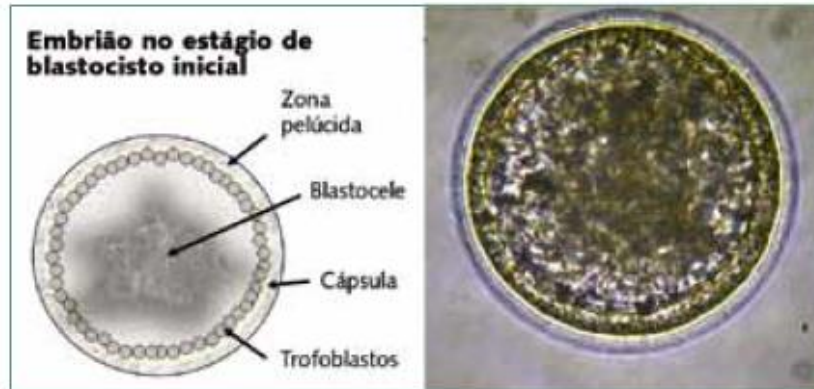
As melhores taxas de prenhez são obtidas com embriões no estágio de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido de grau 1 e grau 2 (TESKE, 2017).

Figura 4. Embrião equino no estágio de mórula - Grau 1.



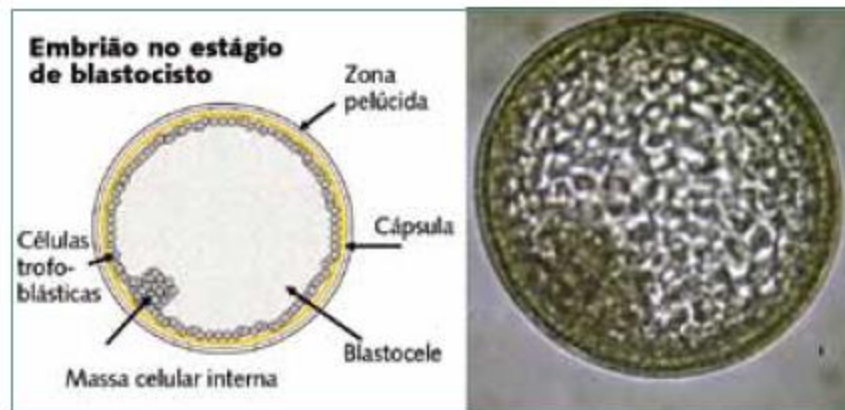
Fonte: MCCUE, 2011.

Figura 5. Embrião equino no estágio de blastocisto inicial - Grau 1.



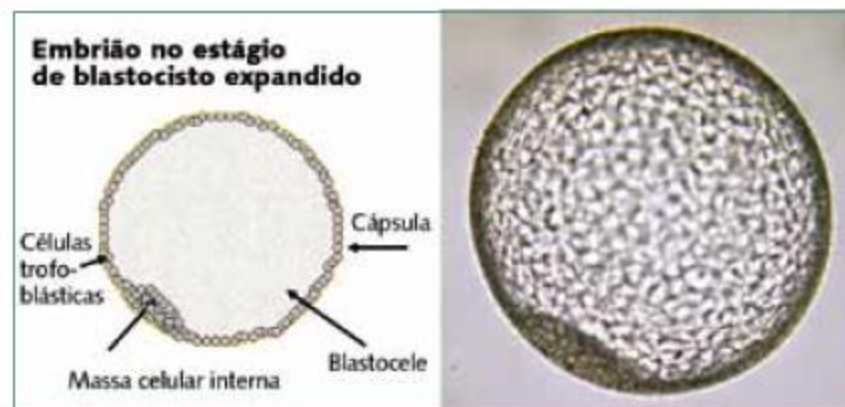
Fonte: MCCUE, 2011.

Figura 6. Embrião equino no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível - Grau 1



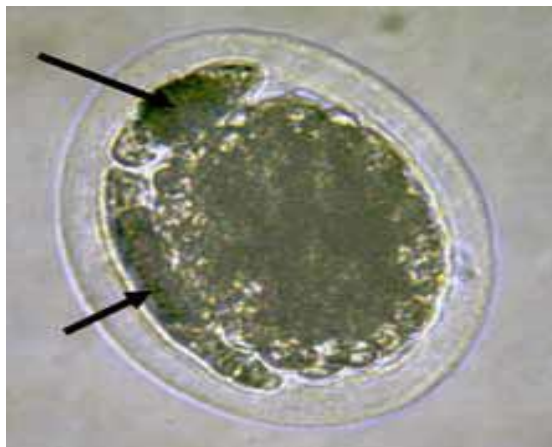
Fonte: MCCUE, 2011.

Figura 7. Embrião equino no estágio de blastocisto expandido - Grau 1.



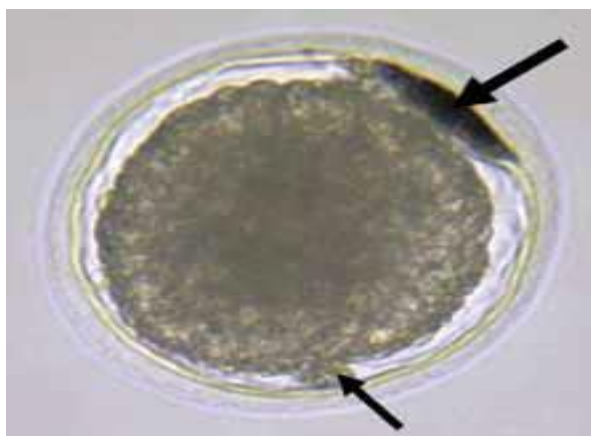
Fonte: MCCUE, 2011.

Figura 8. Embrião no estágio de blastocisto inicial; presença de blastômeros extrusados (setas) - Grau 2.



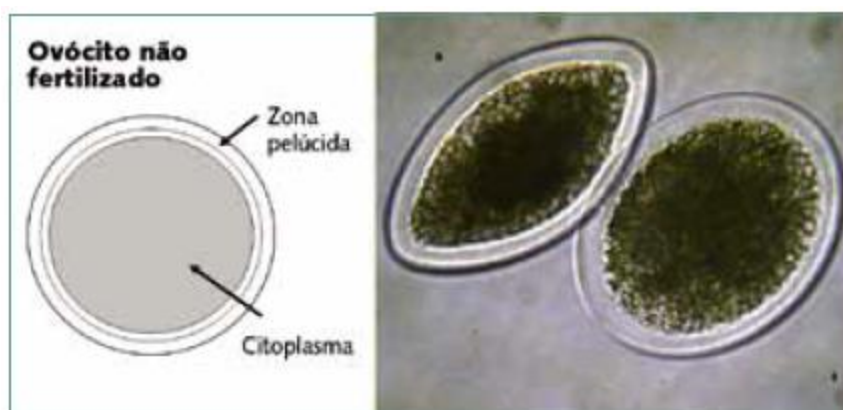
Fonte: MCCUE, 2011.

Figura 9. Embrião no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas) - Grau 3.



Fonte: MCCUE, 2011.

Figura 10. Par de ovócitos não fertilizados.



Fonte: MCCUE, 2011.

2.14. Técnica de transferência de embrião

Na década de 60 ocorreu a primeira TE em equinos realizada por um grupo de cientistas e pesquisadores do Japão. Após alguns aperfeiçoamentos, os procedimentos começaram a ter um sucesso maior na década de 70, Allen e Rowson, conseguiram fazer a primeira transferência entre equinos e muas, em que os embriões eram coletados e transferidos através de cirurgia via cavidade abdominal (SILVA, 2014).

No Brasil no ano de 1987, a biotécnica teve seu início na espécie equina, onde grandes resultados alcançados foram pelo Médico Veterinário João Junqueira Fleury, Cezinande Meira e Marc Henry, através dos métodos cirúrgicos e não-cirúrgico, permitindo um grande avanço nas taxas de prenhez de 12,5% para 74,5% (CARMO, 2003).

A TE em equinos também pode ser realizada pela técnica não cirúrgica via cervical (SQUIRES et al., 1999). A técnica é realizada através de um lavado uterino transcervical, de 6 a 9 dias após a ovulação da doadora e transferido de maneira não cirúrgica a uma receptora previamente sincronizada e selecionada (CARNEVALE et al., 2000).

Segundo Silva (2018), a recuperação do embrião inicia-se com a contenção da cauda, limpeza do reto da doadora e higienização da região do perianal. Uma sonda de silicone é inserida no canal vaginal, a cérvix localizada e então transpassada pela sonda. A sonda possui um balão que é inflado com 40 a 50mL, permitindo que ela permaneça fixada entre o útero e a cérvix; na extremidade externa da sonda é adaptado um extensor de mangueira de silicone e uma trava para controlar o fluxo durante a lavagem uterina (MC KINNON et al., 1988). Ao realizar a lavagem uterina, a sonda é conectada no soro ringer com lactato, a trava é aberta injetando o soro para o interior do útero, em seguida, introduz a mão no reto e se realizam massagens no útero para o meio se espalhar pelos cornos. Posteriormente, fecha-se a trava, conecta-se a sonda na tampa do copo coletor de embrião, liberando o fluxo da lavagem. Ao visualizar o embrião no copo coletor, a lavagem uterina é finalizada; quando não se obtém o embrião, realiza-se o procedimento no máximo por três vezes. Após a lavagem e análise, o embrião é colocado em uma palheta de sêmen ou pipeta de inseminação e inoculado no útero da égua receptora, sendo obrigatório o uso da camisa sanitária para assegurar a não contaminação uterina e boas taxas de prenhes (SILVA, 2018).

2.15. Confirmação da gestação com o uso da ultrassonografia

O uso da ultrassonografia transretal para confirmação de gestação é uma prática padrão normalmente realizada entre o 13º e 15º dia pós-ovulação, pois a vesícula embrionária no

período entre 13° ao 19° dia parece uma estrutura anecóica (preta) dentro do lúmen do corno uterino (LEY, 2013). A vesícula embrionária do 18° ao 21° dia perde parte de seus tónus e formato, apresentando-se triangular. O embrião pode ser visualizado nos 20° a 21° dias e os batimentos cardíacos podem ser observados em tempo real. Por volta do 24° dia o embrião tem uma ascendência de sua posição ventral e perto do 28° ao 30° dia pode ser visualizado no centro da vesícula e voltar ao topo por 35° dia. Entre os 45° e 48° dias o embrião já está suspenso pelo cordão umbilical e então desce para o espaço ventral do comprimento alantóico (LEY, 2006).

Para a descoberta de perdas embrionárias precoces o exame ultrassonográfico deve ser feito a cada 10 dias (LIRA et al., 2009). Alguns fatores contribuem para morte embrionária precoce podendo ser fatores intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos estão relacionados as doenças reprodutivas do endométrio, função lútea insuficiente, idade da égua, o cio do potro, a lactação e tempo de ovulação. Como fator extrínsecos podem ser citados o estado fisiológico do animal como o estresse, a nutrição, o clima, a palpação transretal e a morfologia do embrião (CARVALHO, 2012).

2.16. Importância Sanitária e Nutricional

Sempre que for possível deve-se evitar a introdução de novas receptoras no plantel durante a estação de monta. O ideal é sempre trabalhar com éguas mansas e já adaptadas ao local e manejo da propriedade, pois esses animais são gregários e sempre criam uma hierarquia entre componentes de um mesmo grupo, por isso a introdução de um animal em um grupo fechado provoca uma reorganização que pode ser estressante (LOPES, 2015).

Para manter a sanidade geral do rebanho, sugere-se que tenha um planejamento de controle e prevenção de doenças, com o intuito de eliminar qualquer doença que afeta negativamente a fertilização, gestação e o desenvolvimento embrionário desse potro (SILVA, 2014). Em relação a algumas doenças que tem como causas infecciosas o herpesvírus tipo I (EHV-1) e a leptospirose, a profilaxia é uma estratégia de prevenção principalmente em éguas receptoras. Para prevenir o EHV-1, é recomendado vacinar as éguas no quinto, sétimo e nono mês de gestação. A vacinação contra a leptospirose deve ser feita com a aplicação de duas doses, no intervalo de 30 dias, e reforço semestral, além de ter um controle de roedores e animais silvestres. Caso ocorra abortos, restos placentários e o feto deverão ser eliminados (LEY, 2013).

Uma das principais causas de infertilidades das éguas reprodutoras é o desequilíbrio nutricional empregados nesses animais. Uma alimentação equilibrada permite que a égua

apresente um ótimo estado corporal, o que permitirá que a égua manifeste um ciclo estral regular, uma boa formação de CL e conseqüentemente uma gestação com bons suprimento fetal. Um dos maiores riscos da TE está na alimentação de éguas receptoras, pois por se tratar de um animal de baixo valor zootécnico, muitas vezes a alimentação desses animais é diferenciada por apresentar menos valor nutritivo, não atingindo as necessidades diárias mínimas para que essa égua possa ciclar adequadamente e levar uma gestação. Portanto, o fornecimento adequado de proteínas, energias, vitaminas e minerais é fundamental (CINTRA, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Correlacionar a qualidade embrionária com a taxa de prenhez das éguas receptoras em uma Fazenda Haras no município de Rolim de Moura-RO.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o escore de graduação embrionária;
- Avaliar o formato do embrião;
- Acompanhar quantos embriões foram efetivados;
- Descrever a taxa de prenhez;
- Correlacionar a graduação embrionária com a idade das doadoras e os tipos de sêmen;
- Correlacionar a taxa de prenhez com os tipos de sêmens utilizados.

4. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) da Universidade Federal de Rondônia, campus de Rolim de Moura, sob o protocolo nº 018/2019.

4.1. Local de estudo e coleta de dados

A pesquisa foi realizada em uma fazenda localizada no município de Rolim de Moura – RO, durante o período de estação de monta que teve início em outubro de 2018 e término em abril de 2019. Foram feitos acompanhamentos dos lavados uterinos, da classificação dos embriões de éguas doadoras e da transferência de embriões; todos os dados obtidos foram compilados em uma ficha de acompanhamento individual de cada doadora e receptora (APÊNDICE 1).

4.2. Animais

Como doadoras de embriões foram utilizadas fêmeas puras (n=19) da raça Quarto de Milha, com idade entre 2 a 12 anos, vacinadas anualmente com a vacina Lexington-8 (encefalomielite, rinopneumonite, influenza e tétano) e vermifugadas. As éguas doadoras foram separadas em dois grupos de idades de 2 a 6 anos e > de 6 anos. Como receptoras de embriões (n=34) foram utilizadas éguas criadas a campo sem raça definida (SRD); foi levantado o histórico desses animais, com informações acerca do manejo, alimentação e sanidade.

4.3. Manejo e sanidade das éguas doadoras e receptoras

As éguas doadoras de embriões que eram submetidas a participação em competições ou à reprodução permaneciam em baias individuais; já as éguas receptoras que eram utilizados para o trabalho ou que apresentavam algum problema, permaneciam em piquetes gramados (capim Tifton). Todos animais tinham acesso à água e sal mineral a vontade.

Éguas doadoras que ficavam nas baias individuais era fornecido a ração duas vezes ao dia, no período da manhã, das 7:00 às 7:30, e a tarde, das 14:00 às 14:30, totalizando 4 kg de ração ao dia. A fonte de volumoso oferecida para esses animais era o capim Tifton e Tangola triturado ou feno, produzido na propriedade, fornecidos duas vezes ao dia das 9:00 às 9:30 e das 16:00 às 16:30. As doadoras eram examinadas com frequência tendo o intuito de verificar a atividade folicular, o melhor momento para realizar a IA ou a Monta Natural e determinar o dia da ovulação.

Já as éguas receptoras de embriões eram mantidas a pastejo em *Brachiaria humidicula*, recebiam sal mineral no cocho e tinham acesso livre à água. Esses animais eram examinados

rotineiramente, dependendo dos requisitos de sincronização a fim de determinar a atividade folicular e dia da ovulação.

O sistema de vermifugação dos animais aplicado na propriedade é de quatro em quatro meses. A limpeza das baias dos animais era feita diariamente e dos ganhões eram limpas duas vezes na semana.

4.4. Questionário

Foi aplicado um questionário individualmente para cada égua doadora e abrangia informações relacionadas aos dados da propriedade, nome ou código do animal, pelagem, idade, raça, tipo de criação, data da inseminação ou cobertura da doadora, data da ovulação, data da coleta do lavado uterino, quantidade de embriões, formato do embrião e o grau de qualidade do embrião. O questionário também foi realizado para éguas receptoras e continha a identificação do animal, pelagem, idade, raça, tipo de criação e ocorrência ou não de prenhez (APÊNDICE 1).

4.5. Palpação e ultrassonografia transretal

Para a realização destes procedimentos os animais eram levados ao tronco de contenção; a frequência dependia da fase do ciclo estral que esses animais se encontravam, normalmente eram feitos em intervalos de dois a três dias, mas na presença de um folículo maior que 30 mm de diâmetro o animal era acompanhado diariamente.

Na palpação era identificada a condição uterina, ou seja, se o útero se apresentava em tamanho e textura normais e a localização dos ovários. No acompanhamento pela ultrassonografia transretal eram registrados presença de edema uterino, diâmetro dos folículos, se o animal havia ovulado, presença ou não de CL (bom= ecogênico ou ruim= trabeculado) e presença de fluido no útero. Como a presença de fluido no útero pode indicar endometrite, eram realizadas lavagens uterinas com solução fisiológica e antibiótica (Enrofloxacina) por 5 dias ou até que o líquido de lavagem saísse transparente e aplicação de ocitocina para ajudar nas contrações uterinas.

4.6. Monta Natural e Inseminação Artificial

Quando um animal era avaliado e detectado através do exame ultrassonográfico um folículo ≥ 35 mm, se aplicava uma dose de acetato de deslorelina (Sincrorrelin®), um análogo do GnRH, para a indução da ovulação. As éguas doadoras eram submetidas a monta natural ou inseminadas a cada 24 horas, até que fosse identificado a ovulação nesse animal.

Para a realização da monta natural, às éguas tinham as regiões de vulva e períneo higienizadas com água e sabão e então levadas ao ar livre para que o garanhão realizasse a

cobrição. A inseminação era realizada com sêmen a fresco, refrigerado ou sêmen congelado; quando se tratava de sêmen fresco o mesmo era coletado do garanhão no haras com auxílio de uma égua em cio e uma vagina artificial.

A preparação da vagina artificial era feita com o revestimento da mucosa de látex com uma mucosa plástica descartável, um copo coletor do ejaculado e um filtro de nylon acoplado ao copo coletor, que separa a fração em gel do sêmen. Posteriormente se preenchia a vagina artificial com água a 52°C e a superfície interna era lubrificada. Após a coleta do sêmen o copo coletor era retirado separando o filtro que continha o gel, o sêmen era aspirado com uma seringa e então era diluído com Max-Sêmen® (leite em pó, açúcares, conservantes e excipientes); a diluição era feita na proporção de 1 dose de sêmen para 1 ou 2 doses de diluente, após isso o sêmen era colocado em uma seringa de 60mL acoplada a uma pipeta de inseminação artificial própria para éguas (Provar®).

A égua que iria receber a inseminação era contida no tronco. A cauda era erguida e enfaixada, a região de vulva e períneo higienizadas com água e sabão e então era realizada a IA (Figura 11). Quando se tratava de inseminação com sêmen congelado essa era realizada até 6 horas pós ovulação, as éguas eram preparadas da mesma forma daquelas inseminadas com sêmen fresco ou refrigerados, depois de prontas era feito a IA, com uma pipeta flexível onde o sêmen era depositado na ponta do corno uterino que sofreu ovulação.

Figura 11. Procedimento de inseminação artificial.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2019.

4.7. Coleta e avaliação do embrião

Para a realização da coleta de embrião a égua doadora era colocada em um tronco de contenção localizado ao lado do laboratório, tinha a cauda levantada e enfaixada, a região vulvar e perivulvar eram higienizadas com água e sabão neutro e então os lábios e comissura vulvares eram limpos com algodão embebido em solução fisiológica (Figura 12). Após a ovulação (D0) aguardava-se de sete a nove dias (D7 a D9) para realizar a coleta, sendo a maioria realizada no D8. Para a coleta do embrião o método utilizado era o transcervical não cirúrgico. **Figura 12.** Procedimento de contenção e higienização do animal no tronco.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2018.

No laboratório, em condições higiênicas, prepara-se os materiais, isto é, a sonda de silicone com balonete estéril, o cateter tipo Foley e o filtro, e então levados para o exterior onde se encontra a égua. A sonda era direcionada através da vagina passando a cérvix e chegando ao corpo do útero, com o auxílio de uma seringa de 60mL o balonete era inflado com 30 a 50mL de ar que variava de acordo com o animal; após isso a sonda era tracionada para trás, garantindo a oclusão total da cérvix. O embrião era recolhido através de uma lavagem da égua doadora, utilizando um circuito em forma de “Y” onde em uma das extremidades posterior da sonda acoplava-se a solução corresponde ao recipiente com o meio de lavagem e ao filtro coletor próprio para embrião que foi utilizado para realizar a lavagem uterina.

O meio utilizado para o lavado uterino era o ringer com lactato onde este era infundido através da sonda até o preenchimento total do útero aproximadamente 2 a 3 litros era utilizado para cada lavagem. Para facilitar este procedimento, pode-se introduzir uma mão pelo reto, de modo a ser possível massagear e elevar os corpos uterinos tendo isto impacto positivo na saída do fluido, após injetado a via da solução era fechada e era aberto a via que dava acesso ao filtro coletor, enquanto o médico veterinário realizava a massagem uterina pela via retal a outra mão ficava com o filtro coletor afim de visualizar o embrião e garantir que o filtro coletor não esvaziasse (Figura 13).

Figura 13. Procedimento de recuperação do embrião pelo copo coletor.



Quando o embrião era visualizado, no filtro o restante do fluido era drenado e a coleta encerrada. Quando o embrião não era visualizado ocorria esse mesmo processo e era repetido até terem sido realizados pelo menos três lavados. Após o término do lavado, o balonete era esvaziado, a sonda retirada da égua e o tubo desacoplado do filtro coletor. Terminado o lavado uterino para a coleta do embrião a égua doadora recebia uma injeção intramuscular de prostaglandina-F2 α (1ml), que tem como objetivo diminuir o diestro fazendo com que a égua retorne ao cio rapidamente. Já no laboratório, os 20 a 30mL de meio de lavagem e os debris celulares que ficaram no filtro são depositados na placa de Petri descartável estéril de 100 x 200mm com o intuito de procura do embrião com auxílio de através de um microscópio estereoscópio (lupa) sob aumento de 10 vezes.

Uma vez localizado o embrião, este era removido por aspiração, mantido em meio próprio para embrião (Holding Plus Embriolife) e então envasado em palheta francesa de 0,25mL onde era realizado o seguinte procedimento: coluna de meio + coluna de ar + coluna de meio contendo o embrião + coluna de ar + coluna de meio (Figura 14), prevenindo movimentações do embrião dentro da palheta. Os embriões de tamanho grande eram acondicionados em pipetas de inseminação artificial recobertas com uma camisa sanitária e então inovulados nas receptoras.

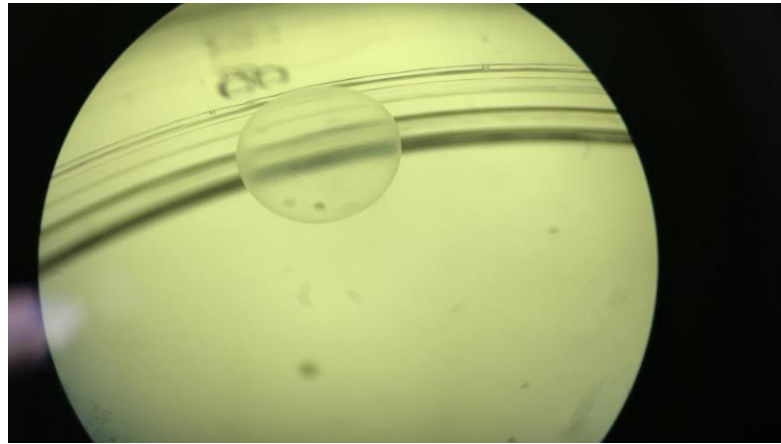
Figura 14. Figura esquemática mostrando o embrião entre as colunas de ar, meio de dentro de uma palheta.



Fonte: LOPES, 2004.

A avaliação embrionária deve englobar o estágio de desenvolvimento, o escore de qualidade (grau) e o tamanho. As características avaliadas foram o formato do embrião (esférico, oval, colapsado) e a graduação embrionária (excelente, bom, ruim, degenerado ou morto, ovócito não fertilizado). A avaliação desses embriões foi realizada no sistema de quatro pontos, conforme descrito McKinnon e Squires (1988): graduação 1 - embrião excelente; graduação 2 - embrião bom com pequenas imperfeições; graduação 3 - embrião ruim com problemas não muito severos, graduação 4 - embrião degenerado e; graduação 5 - embrião não fertilizado ou morto.

Figura 15. Avaliação de um embrião D8.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2018.

4.8. Transferência do Embrião

Para a realização da TE nas receptoras, elas eram conduzidas ao tronco, as caudas eram enfaixadas e as regiões de períneo e vulva higienizadas. Um auxiliar abria os lábios vulvares da receptora e o médico veterinário com as mãos enluvadas e equipado com os aparatos da transferência direcionava através da vagina (Figura 16), passando a região de cérvix e chegando ao corpo uterino onde o embrião era depositado. Após este procedimento, em alguns animais era necessária a aplicação de uma dose de P4 (1.500 mg) para manutenção da gestação, pois essas não apresentavam um bom CL, sendo repetida a aplicação a cada 7 dias.

As receptoras utilizadas no programa de transferência de embriões eram éguas SRD com idades que variavam de 4 a 12 anos. Sendo utilizadas aquelas que se encontravam 3° e o 8° dia pós ovulação, onde era identificado a égua mais apta a receber o embrião, e que apresentasse um bom CL, bom tônus uterino e cérvix fechada, mas na maioria das vezes não era possível ter esses padrões nas receptoras.

Figura 16. Realização da Transferência de embrião.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2019.

4.9. Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação das receptoras era realizado através do exame ultrassonográfico aos 13 ou 15 dias após a ovulação da doadora; confirmada a prenhez este procedimento era repetido aos 60 dias a fim de confirmar a gestação. As éguas receptoras diagnosticadas prenhas eram mantidas em piquetes separados com capim Tifton.

4.10. Análise Estatística

As informações coletadas dos animais através das fichas de controles de lavagens de embriões foram reunidas em uma planilha do Excel e submetidas a análise estatística do efeito das variáveis categóricas sobre o formato do embrião, a graduação embrionária e a taxa de prenhez por um modelo de regressão logística, incluindo os efeitos principais da idade da doadora e tipo de sêmen. Os animais (doadoras e/ou receptoras) foram inclusos como preditoras contínuas do modelo de regressão. Para efeito significativo considerou-se um valor de $p < 0,05$.

Para análise estatística descritiva os dados estão apresentados como porcentagens (%). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O formato do embrião não sofreu influência da idade da doadora ($P=0,249$). Na maioria dos embriões, independentemente da faixa etária, o formato esférico foi superior (94,87%; 37/39) ao formato oval (5,13%; 2/39; $P<0,0001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de embriões esféricos e ovais de acordo com o número de embriões.

Formato	N (Total de embriões)	N (%)	P
Esférico	39	37 (94,87) ^a	0,0001
Oval		2 (5,13) ^b	

Letras minúsculas sobrescritas (a, b) dentro de uma mesma coluna, indicam diferença estatística ($p<0,05$) para os diferentes formato de embriões esféricos e ovais utilizado sob o modelo de regressão logística.

A prevalência de embriões com o formato esférico está intimamente ligada a qualidade do embrião; geralmente embriões com formato esférico são embriões de graduação excelente ou bom (MCKINNON; SQUIRES, 1988). Observou-se no presente estudo que animais jovens de 2 a 6 anos, apresentaram 91,67% de embriões com formato esférico e 8,33% com o formato oval. Já animais adultos, com idade superior a 6 anos, apresentaram 100% (15/15) de embriões com formato esférico, sugerindo que animais adultos têm uma melhor produção de embriões em virtude da maturidade do sistema reprodutivo. Outros fatores muito importantes são o estado nutricional dos animais, um manejo bem adequado no momento da recuperação embrionária, sanidade e a raça da doadora, habilidade do técnico, assim também como o clima do local de estudo. O município de Rolim de Moura -RO apresenta clima tropical em todas as épocas do ano, sendo assim esses animais sofrem pouca interferência do fotoperíodo podem inclusive, ciclar o ano todo.

A graduação do embrião sofreu influência da idade das doadoras ($P=0,036$), como indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Idade das doadoras em relação a graduação do embrião.

Idade	Graduação do Embrião			N Total	P
	1-Excelente	2-Bom	3-Ruim		
2 a 6 anos	0% (0)	87,50% (21)	12,50% (3)	24	0,036
> 6 anos	6,67% (1)	93,33% (14)	0% (0)	15	

Foi utilizado o modelo de regressão logística ($p<0,05$).

No presente estudo a maioria dos embriões coletados se encontravam com a graduação bom; este fato pode ser justificado pelo transporte seletivo de embriões viáveis através do oviduto equino, que é facilitado pela secreção de prostaglandina E2 (PGE2) embrionária; embriões considerados ruins, embriões mortos e ovócitos não fertilizados (UFO) tendem a ficar retidos no oviduto (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

É importante ressaltar que independentemente da faixa etária, embriões graduados como bons (89,74%; 35/39) foram significativamente superiores aos excelentes (2,56%; 1/39) e ruins (7,69%; 3/39) ($P < 0,0001$), possivelmente em decorrência do fato que todas as éguas doadoras tinham idade inferior a 12 anos. Já foi estabelecido em estudos relacionados que embriões de qualidade inferior são provenientes de éguas velhas (acima de 12 anos) ou com problemas uterinos (PANZANI et al., 2012; PANZANI et al., 2014; SILVA, 2018).

O tipo de sêmen (congelado, refrigerado e fresco/monta natural) influenciou na qualidade do embrião ($p = 0,039$). Éguas inseminadas com sêmen fresco/monta natural proporcionaram uma qualidade de embriões significativamente superior às inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado (Tabela 4).

Tabela 4. Graduação embrionária de acordo com os tipos de sêmen utilizados.

Tipo de Sêmen	Graduação do Embrião			N Total	P
	Excelente	Bom	Ruim		
Congelado (%/N)	0% (0) ^b	87,5% (7) ^a	12,5% (1) ^b	8	0,039
Refrigerado (%/N)	25% (1) ^a	75% (3) ^b	0% (0) ^a	4	
Fresco/Monta natural (%/N)	0% (0) ^b	92,59% (25) ^a	7,41% (2) ^b	27	
Total (%/N)	2,56% (1)	89,74% (35)	7,69% (3)	39	

Letras minúsculas sobrescritas (a, b) dentro de uma mesma coluna, indicam diferença estatística ($p < 0,05$) para o teste utilizado sob o modelo de regressão logística.

Esse resultado pode ser explicado pelo fato do sêmen fresco/monta natural apresentar maior viabilidade espermática, sendo viável por alguns minutos após a coleta sem comprometer a sua capacidade fecundante e conseqüentemente os resultados obtidos, além disso sêmen congelado quando é depositado no útero tem uma longevidade menor, comparado com o sêmen fresco, diluído e transportado usado na IA tornando a associação do momento da inseminação com a ovulação da égua (LEY, 2006). Em relação ao sêmen refrigerado que obteve embrião excelente diferentemente dos outros tipos de sêmen, sugere-se que seja feito um estudo com o

número de (N) maior, do sêmen refrigerado para que obtenha os resultados com a graduação de embriões excelente.

A taxa de prenhez obtida no presente trabalho foi 79,41% aos 45 dias e está acima dos resultados relatados por Panzani et al. (2016) com 69,2% aos 40 dias e Felicio et al. (2017) com 62% aos 45 dias. Os valores diferentes encontrados na literatura podem ser em virtude de os autores trabalharem em condições e situações diferentes como idade dos animais, tipo de materiais utilizados na transferência, habilidade do técnico, morfologia e manipulação do embrião.

A taxa de prenhez não sofreu influência da doadora ($P=0,722$), da receptora ($P=0,983$), da idade da receptora ($P=0,399$), da idade da doadora ($P=0,776$) e nem da qualidade do embrião ($P=0,111$). No entanto, o tipo de sêmen utilizado nesse trabalho influenciou ($P=0,018$) na taxa de prenhez dos embriões transferidos na estação 2018/19 (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do tipo de sêmen sobre a taxa de prenhez da receptora.

Tipo de sêmen	Prenhez	P
Congelado (% , n/N)	87,50% ^a (7/8)	
Refrigerado (% , n/N)	25% ^b (1/4)	0,018
Fresco/Monta natural (% , n/N)	70,37% ^a (19/27)	

Letras minúsculas sobrescritas (a, b) dentro de uma mesma coluna, indicam diferença estatística ($p<0,05$) para os diferentes tipos de sêmen utilizado sob o modelo de regressão logística.

Observou-se uma taxa de prenhez significativamente superior com a utilização de sêmen congelado e sêmen fresco/monta natural em relação ao sêmen refrigerado ($p<0,05$). Em virtude da IA com sêmen congelado ainda apresentar questões técnicas a serem solucionadas, como a variação individual frente à criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado e a diminuição da motilidade espermática (NUNES et al., 2006), presumia-se que as taxas de prenhez com sêmen congelado seriam inferiores às obtidas com sêmen fresco ou refrigerado.

O sêmen refrigerado utilizado neste trabalho era proveniente de garanhões de outros haras próximos ao município de Rolim de Moura; já o sêmen fresco era oriundo dos garanhões do próprio haras e o congelado de garanhões submetidos a testes andrológicos rigorosos. Em virtude da espécie equina ser selecionada pelo padrão racial e performance atlética, pouca atenção é dada para o desempenho reprodutivo, portanto, alguns garanhões apresentam baixos índices de eficiência reprodutiva. Darenius (1998), sugere que os garanhões a serem utilizados

nos programas de IA com sêmen refrigerado devam possuir: órgãos genitais internos e externos sem alterações, produção semanal de espermatozoides em torno de $30-35 \times 10^9$, 70% de células morfológicamente normais, motilidade superior a 50% e, após 12 horas de refrigeração, uma redução da motilidade inicial não superior a 30%, considerando como motilidade mínima ao final desse período de 40%.

Os ganhões doadores do sêmen refrigerado avaliados nesta pesquisa provavelmente não passaram por nenhuma avaliação clínica ou seminal, o que poderia explicar os resultados inferiores em relação à taxa de prenhez, ratificando a necessidade de uma seleção reprodutiva rigorosa destes animais antes da sua inclusão em programas de TE.

Para que os animais expressem o seu potencial devem ser fornecidos diariamente quantidades adequadas de vitaminas, proteínas, evitar o estresse desses animais no momento de inseminação, coleta do embrião, transferência de embrião e ser feito corretamente uma profilaxia para prevenir doenças no rebanho, afim de evitar grandes prejuízos na estação de monta e garantir um sucesso na TE e na taxa de prenhez. Assim tendo um progresso genético do plantel existente em nossa região.

6. CONCLUSÃO

Estes resultados permitem concluir que em éguas submetidas a TE no município de Rolim de Moura, a graduação embrionária foi influenciada pelo tipo de sêmen utilizado e da idade das doadoras e que a taxa de prenhez é superior quando a inseminação foi realizada com sêmen congelado e sêmen fresco/monta natural em relação ao sêmen refrigerado, sugerindo que o uso de garanhões seja analisado de forma mais rigorosa pelos técnicos na introdução nos programas de TE.

Novos estudos são necessários com o mesmo objetivo, pois as variáveis do presente estudo foram limitadas.

7. REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R.. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, p. 513-527, 2001.

ALLEN, W. R.. The physiology of early pregnancy in the mare. In: **American Association of Equine Practitioners. Proceedings**, p. 338-354, 2000.

ALJARRAH, A. H.. **Methods to induce earlier onset of cyclicity in transitional mares**. 2004. 65f. (Dissertation) - Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, USA, 2004.

ALONSO, M. A.. **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Botucatu – SP, 2008.

ARAR, S. et al. Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 8, p. 1110-1115, 2007.

ARISTIZÁBAL, V. V. H. et al. Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias. **Res. Med. Vet.**, n. 33, p. 137-147, 2017.

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI E. C. C.; NEVES NETO J. R.. 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.** P. 233-239, 2001.

BETTERIDGE, K. J.. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 691-702, 2000.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R.. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v.135, n.1, p. 191-209, 1982.

BORTOT, D. C.; ZAPPA, V.. Aspectos da reprodução equina: Inseminação Artificial e transferência de embrião: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, 2013.

CAIXETA, E. S.; et al. Desenvolvimento embrionário inicial equino – revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 25-34, 2008.

CARMO, M. T.. **Comparação entre Doses Constantes e Decrescentes de Extrato Pituitário Equina na Indução de Superovulação em Éguas**. p. 156, 2003.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A.. **Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 252-254, 2002.

CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERWALL, D. K. ; MCCUE, P. E.. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-980, 2000.

CARVALHO, A. L.. **Fatores que influenciam o sucesso de um programa de transferência de embriões equinos**. 2012. 62 f. Dissertação de (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2012.

CHU, J. W. K. et al.. Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin-induced pregnancy failure. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 46, n. 3, p. 286-295, 1997.

CINTRA, A. G. C.. O CAVALO Características, Manejo e Alimentação. p. 294-297, 2014.

COSTA, L. D. P.. **Avaliação da taxa de fertilidade em éguas da raça puro sangue lusitano: efeito da idade da égua e do tipo de cobrição (cobrição natural vs inseminação artificial)**. 2014. 78 f. Dissertação de (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLER, A.; ALLEN, W. R.; STEWART, F.. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 3, p. 483-490, 1998.

DARENIUS, A.. Experiences with chilled, transported equine semen. *In: Stallion Reproduction Symposium*, 1998. *Proceeding*. Montgomery, AL: Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners, p. 60-70, 1998.

EVANGELISTA, R. M.. **A transferência de embriões em equinos e a importância da égua receptora**. 2012. 53 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, 2012.

FARIA, D. R.; GRADELA, A.. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.114-122, 2010.

FELICIO, L. C. S. et al.. Fertilidade de éguas durante a estação de monta 2016/2017 inseminadas com sêmen refrigerado e congelado no hospital veterinário da universidade Tuiuti do Paraná. **Revista Eletrônica Biociências Biotecnologia E Saúde**, v. 10, n. 19, p. 2-2, 2017.

FLEURY, P. D. C. et al.. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 27-31, 2007.

FUTINO, O. D.. **Transferência de embriões em equinos**. 2005. Monografia apresentada para a conclusão do Curso de (Medicina Veterinária). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. 2005.

GASTAL, M. O. et al.. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 989-999, 1998.

GINTHER O. J.. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2ª ed. Equiservices: Madison, Wisconsin, p. 642, 1992.

HAFEZ, B.; HAFEZ E. S. E.. **Reprodução Animal**. 7ª. ed. p. 513, Monole, São Paulo, 2004.

HERRLER, A.; BEIER H. M.. Early Embryonic Coats: Morphology, Function, Practical Applications. **Cells Tissues Organs**, p. 233-246, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 10 de maio de 2019.

LENZI, C.. **Transferência de embriões em equinos**. 2008. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado Medicina Veterinária). Universidade de Tuiuti do Paraná, 2008.

- LEY, M. B.. **Reprodução em Éguas para Veterinários de Equinos**. 2ª ed. São Paulo, Roca, p. 106, 2013.
- LEY, W. B.. **Reprodução em éguas: para veterinários de equinos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, p. 220, 2006.
- LIRA, R. A; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R.. Transferência de embrião em equinos: revisão. **Acta Veterinária Brasília**, v. 3, n. 4, p. 132-140, 2009.
- LOPES, E. P.. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 39, n. 1, p. 223-229, Belo Horizonte, 2015.
- LOPES, E. P.. **Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga Marchador em projeto comercial de transferência de embriões**. 2004. 40 p. Monografia de pós-graduação (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- MARIZ, T. M. A. et al.. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da raça Mangalarga Marchador no estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 2, n. 2, p. 39-43, 2008.
- MCCUE, P. M.. Transferência de Embriões em Equinos – Avaliação do Embrião / **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP**. Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 3, p. 80–83, São Paulo, 2011.
- MCKINNON, A. O. et al.. 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.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.. Embryo transfer and related technologies. In: **Current therapy in equine reproduction**. p. 319-334. 2007.
- MEIRA, C.. **Endocrinologia da Reprodução, Dinâmica Folicular, Superovulação e Transferência de Embriões na Espécie Equina**, 2007. (Mestrado em Área da Reprodução). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2007.
- MELO, C. M.. **Indução de ovulação em éguas**. 2006. 24 f. Monografia (Doutorado em Reprodução Animal). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MELO, C. M. **Efeito da criopreservação por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino**. 2005. 104p. Tese (Mestrado) faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2005.

MIES, F. A.. **Inseminação Artificial**. 6ª ed. p. 750, Porto Alegre, 1987.

MONTECHIESI, D. F.. Transferência de embriões em equinos e os fatores relacionados as taxas de prenhez. **Ciência Animal**, v. 25, n. 1, p. 187-194, 2015.

NETO, O. I. V.. **Protocolos hormonais para transferência de embriões equinos em tempo fixo**. 2017. 42 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2017.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V.. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 30, p. 42-56, 2006.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y.. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of reproduction and fertility**, v. 31, n. 2, p. 187-195, 1972.

ORIOLO, J. G.; SHAROM, F. J.; BETTERIDGE, K. J.. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 653-664, 1993.

PANZANI, D. et al.. Embryo quality and transcervical technique are not the limiting factors in donkey embryo transfer outcome. **Theriogenology**, v. 77, p. 563-569, 2012.

PANZANI, D. et al.. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 82, n. 6, p. 807-814, 2014.

PANZANI, D. et al.. Factors affecting recipients' pregnancy, pregnancy loss, and foaling rates in a commercial equine embryo transfer program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 37, p. 17-23, 2016.

QUINN, B. A.; HAYES, M. A.; WAELECHLI, R. O.; KENNEDY, M. W.; BETTERIDGE, K. J.. Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 161-170, 2007.

RIERA, F. L.; SAMPER, J. C.. Equine embryo transfer. In: **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia: Saunders Elsevier, p.185-199, 2009.

ROCHA, R. M. P. et al.. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 147-157, 2011.

RODRIGUES, T. G. et al.. Uso de Progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 1, p. 14-26, 2012.

SAMPER, J. C.. **Equine breeding management and artificial insemination**. 2^a ed.. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, p. 310, 2009.

SAMPER, J. C.; ESTRADA, A. J.; MCKINNON, A. O. Insemination with frozen sêmen. In: **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Elsevier-Saunders, p. 285-288, 2007.

SHARP, D. C.. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 679-689, 2000.

SILVA, A.G.. **Transferência de embriões em equinos (Revisão)**. 2014. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, 2014.

SILVA, N. J.. **Relatório do estágio supervisionado obrigatório (ESO): Atividades desenvolvidas em reprodução equina**. 2018. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D.. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 91-104, 1999.

SQUIRES, E. L., SEIDEL, G. E.. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction and Biotechnology**, Laboratory Bulletin. n. 8, p. 32-38, 1995.

STOUT, T. A. E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R.. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal reproduction science**, v. 87, n. 3-4, p. 269-281, 2005.

TESKE, J.. **Transferência de embriões em equinos**. 2017. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2017.

TEZZA, L.; DITTRICH, J.. Reprodução em Equinos, p.1–13, 2006.

TOMAZELLA, D.. **Eficácia no tratamento para indução de ciclicidade em éguas fora do período reprodutivo**. 2013. 5 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2013.

8. APÊNDICE I

Questionário
IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE
2. Nome da Propriedade:
3. Localização:
IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL - DOADORA
1. Nome ou código do animal:
2. Pelagem: Alazão () Baio () Baio Amarelo () Tordilho () Preto () Castanho () Rosilho () Pampa de Castanho () Pampa de Preto ()
3. Idade:
4. Raça: Quarto de Milha
5. Tipo de criação: Confinado () Campo ()
AVALIAÇÃO
1. Data da ovulação:
2. Data da inseminação:
3. Data da coleta:
4. Sêmen: () Congelado () Resfriado () Fresco () Monta Natural
5. Quantidade de embrião: () 1 () 2 () 3 () 4 () 5
6. Formato do embrião: () Esférico () Oval () Colapsado
7. Graduação do embrião: 1. Excelente () 2. Bom () 3. Ruim () 4. Degenerado ou morto ()
5. Ovócito não Fertilizado – UFO ()
IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL - RECEPTORA
1. Nome ou código do animal:
2. Pelagem: Alazão () Baio () Baio Amarelo () Tordilho () Preto () Castanho () Rosilho () Pampa de Castanho () Pampa de Preto ()
3. Idade:
4. Raça: Quarto de Milha () Crioulo () Mangalarga () S.R.D. ()
5. Tipo de criação: Confinado () Campo ()
6. Prenhes: () Sim () Não
Obs: