



RICARDO VILHENA PORTILHO

**FATORES QUE AFETAM A FERTILIDADE
EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EQUINOS**

LAVRAS – MG

2014

RICARDO VILHENA PORTILHO

**FATORES QUE AFETAM A FERTILIDADE
EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EQUINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

LAVRAS – MG

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Portilho, Ricardo Vilhena.

Fatores que afetam a fertilidade em programa de
transferência de embriões equinos / Ricardo Vilhena Portilho. –
Lavras : UFLA, 2014.

79 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal
de Lavras, 2014.

Orientador(a): José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Ovulação. 2. Embrião. 3. Equino. 4. Sêmen. 5. Doadora.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

RICARDO VILHENA PORTILHO

**FATORES QUE AFETAM A FERTILIDADE
EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EQUINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2014.

Dra. Maria das Graças C. Moura e Silva UFLA

Dr. Francisco Duque de Mesquita Neto UFLA

Dr. Eduardo Pinto Filgueiras UFLA

Dr. José Camisão de Souza
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Aos meus pais, Francisco Silvério Portilho e Maria do Rosário Vilhena Portilho,
por nunca medirem esforços para me apoiar nos estudos. Com Amor. Dedico.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À natureza, ao seu Criador e a suas criaturas.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos pelo amor, incentivo, apoio e carinho.

A Juliana, mulher forte e guerreira, sem seu apoio não seria possível essa conquista.

A Mariana, minha filha amada, que procuro sempre mostrar que o melhor caminho é estudar.

Ao Prof. José Camisão de Souza, pelo apoio, amizade e incentivo nesta jornada.

A Maria Dirce, pela acolhida e por sempre me tratar como filho.

Aos Amigos de curso, Carolina Monteiro, Paula Rodrigues, Jesus Alfonso, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos Dr. Fernando Cavalher Fernandes, Dr. Manoel Dantas, Dr. Eustáquio Michetti, pelos ensinamentos durante a minha formação acadêmica e profissional.

Ao amigo José Reinaldo Berin, sempre orientando o caminho a trilhar.

Aos funcionários da UFLA.

A todos os amigos que diretamente ou indiretamente me ajudaram durante a realização deste trabalho, muito obrigado.

Aos cavalos, seres de natureza ímpar.

RESUMO

A reprodução assistida através da transferência de embrião (TE) proporciona a produção de potros com a finalidade de se aprimorar os animais descendentes a perpetuarem características. A transferência de embrião é uma técnica que permite o aumento do número de nascimentos por ano de uma égua, sendo o conhecimento do efeito de variáveis envolvidas no processo vital para o aprimoramento dos resultados. O objetivo deste trabalho é analisar informações sobre os aspectos ligados à fertilidade em programas de TE em equinos conduzidos ao longo de 10 anos de trabalho. Dados gerais e reprodutivos de 150 éguas doadoras de embrião, 362 receptoras e de 73 garanhões de diversas raças foram submetidos às análises estatísticas utilizando o pacote SAS[®] (Cary, NC-EUA). A proporção de receptoras gestantes foi a variável dependente, sendo os efeitos de idade, raça, diâmetro do folículo dominante (DFD) e indução da ovulação, no âmbito das doadoras, dos garanhões e das receptoras analisados por qui-quadrado. A taxa de gestação foi mais elevada ($P < 0,05$) para embriões transferidos de doadoras da raça Campolina em comparação com as demais (74,0 vs 57,6%, respectivamente). As taxas de lavados positivos de 50,2%, 58,97% e 53,16%, foram semelhantes ($P = 0,45$) entre as classes de idade de ≤ 7 anos, $>7 < 12$ anos e ≥ 12 anos, respectivamente. Em conclusão, a raça da doadora, 73%; a não indução da ovulação, 73% e a utilização de sêmen congelado/descongelado de 28,57% foram fatores que influenciaram as taxas de gestação nas condições do presente experimento. Fica evidente que em programas de TE equinos a presença de um garanhão no Haras tem o potencial para melhorar as taxas de prenhez. Adicionalmente, os técnicos de campo poderiam aprofundar suas coletas de dados, uma vez que ficou evidente que muitas variáveis de fácil obtenção que seriam úteis poderiam ter complementado este trabalho.

Palavras-chave: Sêmen. Garanhão. Embrião. Doadora. Receptora. Idade.

ABSTRACT

Assisted reproduction by means of embryo transfer (ET) provides the production of foals with the objective of honing the descendant animals to perpetrate good traits. Embryo transfer is a technique that allows the increase in the number of births per year of a mare, being that knowing the effect of variables involved in the process is vital to improving the results. The objective of this work is to analyze information on the aspects connected to the fertility in ET programs for equine conducted over 10 years of work. General and reproductive data of 150 embryo donor mares, 362 recipients and 73 stallions of many breeds were submitted to statistical analysis using the SAS[®] packet (Cary, NC – USA). The proportion of pregnant recipients was the dependent variable, being the effects of age, breed, dominant follicle diameter (DFD) and ovulation induction, in the scope of the donors, stallions and recipients, analyzed by chi-square. The gestation rate was more elevated ($P < 0.05$) for embryos transferred from donors of the Campolina breed when compared with the others (74.0 vs 57.6%, respectively). The rates of positive washed of 50.2%, 58.97% and 53.16% were similar ($P = 0.45$) between the age classes of ≤ 7 years, $> 7 < 12$ years and ≥ 12 years, respectively. Concluding, the donor breed, 73%; the non-ovulation induction, 73% and the use of frozen/thawed semen of 28.57% were factors that influenced the gestation rates on the conditions of the present experiment. It becomes clear that, in ET programs for equine, the presence of a stallion in the Horse Farm has the potential to improve gestation rates. Additionally, the field technicians might deepen the data collection, since it became evident that many easily obtained variables that would be useful might have complemented this work.

Keywords: Semen. Stallion. Embryo. Donor. Recipient. Age.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito do grupamento racial da doadora sobre as taxas de gestação de receptoras de embrião.....	48
Figura 2	Efeito da classe de idade da doadora sobre a taxa de gestação após TE	51
Figura 3	Idade das éguas doadoras utilizadas no estudo	51
Figura 4	Efeito da classe de idade do garanhão sobre a taxa de prenhez da receptora.....	54
Figura 5	Distribuição de frequência da idade dos garanhões utilizados no estudo	54
Figura 6	Efeito do tipo de sêmen sobre a porcentagem de lavados positivos (coleta resultante em embrião)	57
Figura 7	Efeito da indução da ovulação éguas receptoras sobre a taxa de gestação.....	59
Figura 8	Efeito da classe de diâmetro do folículo dominante da doadora sobre a proporção de lavados positivos	61
Figura 9	Diâmetro de folículo dominante de éguas doadoras e proporção de lavados positivos	63
Figura 10	Efeito da classe do folículo dominante da receptora em relação à gestação.....	65
Figura 11	Diâmetros dos folículos dominantes das receptoras sobre a taxa de gestação	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala para classificação e descrição dos embriões.....	29
Tabela 2	Características dos embriões recuperados baseadas nos dias após ovulação.....	30
Tabela 3	Efeito do grupamento racial da doadora sobre as taxas de gestação de receptoras de embrião.....	47
Tabela 4	Efeito da classe de idade da doadora sobre a taxa de gestação após TE.....	50
Tabela 5	Efeito da classe de idade do garanhão sobre a taxa de prenhez da receptora.....	53
Tabela 6	Efeito do tipo de sêmen sobre a porcentagem de lavados positivos (coleta resultante em embrião).....	56
Tabela 7	Efeito da indução da ovulação éguas receptoras sobre a taxa de gestação.....	59
Tabela 8	Efeito da classe de diâmetro do folículo dominante da doadora sobre a proporção de lavados positivos.....	61
Tabela 9	Diâmetro de folículo dominante de éguas doadoras e proporção de lavados positivos.....	62
Tabela 10	Efeito da classe de diâmetro do folículo dominante da receptora em relação à gestação.....	65
Tabela 11	Diâmetros dos folículos dominantes das receptoras sobre a taxa de gestação.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Fisiologia da reprodução de égua	13
2.2	Fisiologia da reprodução de garanhão	18
3	COLETA DE SÊMEN	24
4	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO	27
5	FERTILIDADE DE EQUINOS	31
5.1	Escolha do garanhão	31
5.2	Escolha da égua doadora	35
5.3	Escolha da receptora	37
5.4	Sincronização do estro	39
5.5	Indução da ovulação	40
6	MATERIAL E MÉTODOS	42
7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
8.1	Efeito do grupamento racial da doadora sobre a taxa de gestação das receptoras	46
8.2	Efeito da idade da doadora sobre a porcentagem de coletas positivas	48
8.3	Idade garanhão x prenhez	52
8.4	Tipo de sêmen utilizado na inseminação das doadoras	55
8.5	Indução da ovulação x prenhez	57
8.6	Diâmetro do folículo dominante das éguas doadoras e proporção de lavados positivos	60
8.7	Diâmetro do folículo dominante de éguas receptoras e proporção de receptoras gestantes	63
9	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Na equideocultura mundial é crescente o uso de reprodução assistida de equinos, sendo a transferência de embriões (TE) uma tecnologia que vem oferecendo muitas vantagens aos criadores e às associações de criadores de equinos, permitindo o uso de garanhões e de éguas de alto desempenho desportivo de criatórios especializados para escolha dos cruzamentos. A expansão na utilização do material genético de animais superiores em relação às características de interesse zootécnico poderá ser executada por meio da TE de forma eficiente e rápida, com a finalidade de melhorar a morfologia e o desempenho dos plantéis.

A disseminação da transferência de embrião tem aumentado a possibilidade dos criadores de experimentar diversos acasalamentos entre a égua doadora e garanhões que estejam no haras, em criatórios distantes ou até mesmo em outros países. A TE assegura a possibilidade de vários nascimentos por ano com a utilização de éguas receptoras de embrião a partir de uma única doadora.

Éguas impossibilitadas de ficarem gestantes devido a uma série de razões, tais como, idade avançada, infecção uterina crônica, lesões perineais e cervicais podem vir a gerar potros saudáveis através da utilização da TE em receptoras saudáveis e reprodutivamente aptas. Outras razões para o emprego da TE na preservação de éguas doadoras podem incluir: patologias graves, como artrite severa, laminite crônica, abdômen agudo equino ou problemas comportamentais perigosos da fêmea para os tratadores, para outros cavalos ou até mesmo para sua cria (HURTGEN, 2008). Além disso, esta biotécnica favorece o maior controle de doenças quando da transferência de material genético entre estados ou países, bem como a obtenção de divisas através de exportações de embriões congelados (ARRUDA et al., 2001).

A logística de deslocamento do sêmen refrigerado e ou congelado tem proporcionado sua utilização em égua doadora, às vezes, com potro ao pé evitando sua saída do haras para entrar no programa de TE, viabilizando o uso dessa tecnologia no próprio local em que se encontra.

O sucesso da técnica de TE acarreta uma série de cuidados a serem tomados como: a escolha da doadora, do garanhão, as receptoras, a logística de envio e recebimento de sêmen, ou seja, o embrião é o resultado de um conjunto de ações que, em sincronia, contribui para uma gestação equina.

No Brasil não é feita seleção de garanhões com o objetivo da melhoria da qualidade da congelabilidade do sêmen para aumentar sua fertilidade. Gera-se garanhões que apresentam sêmen congelado com baixa qualidade para o uso na inseminação artificial, não obtendo índice de prenhez igual ao de sêmen resfriado e/ou fresco.

As pesquisas de novos agentes crioprotetores como componentes para utilização no processo de congelamento/descongelamento se tornam cada vez mais necessárias afim de melhorar a qualidade do sêmen congelado de equinos para melhorar os índices de éguas gestantes.

O objetivo deste estudo é analisar informações sobre as possíveis influências de variáveis ligadas às técnicas reprodutivas e às características dos animais sobre a fertilidade em programas de TE em equinos, conduzidos ao longo de 10 anos de trabalho por um mesmo médico veterinário.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiologia da reprodução de égua

O ciclo estral é definido como uma sequência de eventos que prepara a égua para a concepção. No cavalo, a atividade reprodutiva sazonal é estimulada por longos dias e noites curtas (PALMER; GUILLAUME, 1992), denominado fotoperiodismo, além do fotoperíodo, fatores exógenos tais como idade, estado reprodutivo, nutrição, condição corporal e temperatura ambiental afetam a atividade reprodutiva sazonal da égua. A égua possui atividade reprodutiva regulada pelo fotoperiodismo sendo classificada como poliestral sazonal, ou seja, o cio ocorre em estações climáticas definidas havendo incremento na atividade sexual nos períodos de primavera e verão cujas incidências de luz são maiores. Porém, uma parte da população de éguas pode continuar a apresentar ciclicidade estral durante todo o ano.

A primavera é a estação que marca o período de transição, passando da inatividade (anestro) para a fase reprodutiva cujo desenvolvimento folicular se apresenta de forma irregular com folículos desenvolvendo e regredindo sem que haja ovulação, passando essa fase, normalmente as éguas regularizam seu ciclo estral.

Fases de transição do anestro de inverno para a temporada de ciclo ovulatório coincidem com períodos irregulares de estro que duram de vários dias a semanas, podendo variar consideravelmente o comprimento em dias. Em potros, a puberdade ocorre aproximadamente em uma idade de 12-18 meses. Essa idade é novamente influenciada por temporada. Em potras nascidas no início do ano, a puberdade não ocorrerá antes do início da época de reprodução dos anos seguintes (hemisfério norte).

A senescência em éguas velhas é fisiologicamente um fato, apesar de que algumas éguas continuam ciclando independentemente da idade avançada. Em éguas velhas, o intervalo interovulatório pode ser mais longo do que em éguas jovens e de meia-idade devido à taxa de crescimento mais lenta do folículo dominante (GINTHER et al., 2008).

A reprodução durante a temporada da primavera e verão tem o comprimento médio do ciclo estral por volta de 21 dias com 5-7 dias de estro. A duração do ciclo estral também é afetada pela fase reprodutiva, por exemplo, $21,2 \pm 1,8$ dias as éguas em lactação e $22,8 \pm 1,4$ dias em éguas não lactantes em monta; $p < 0,01$ (HEIDLER et al., 2004).

O comportamento estral da égua é caracterizado por aumento do interesse em garanhões e comportamento receptivo em resposta à atratividade sexual de garanhões (CROWELL-DAVIS, 2007).

O ciclo estral é dividido em estro (fase folicular) e diestro (fase luteal). Durante o estro, a fêmea é sexualmente receptiva ao garanhão e o trato genital se encontra preparado para aceitar e transportar os espermatozoides e ocorrer à ovulação. Os folículos dominantes se desenvolvem durante o estro e secretam estrógeno que induz a receptividade. A ovulação (liberação do oócito) ocorre aproximadamente 24 a 48 horas antes do final da receptividade sexual da égua passando a não ser receptiva ao garanhão, tornando-se agressiva e seu trato genital se prepara para aceitar e nutrir o embrião.

A égua em estro assume uma postura característica, abaixando a pélvis e afastando os membros posteriores, sendo acompanhado pelo desvio da cauda e exposição da região perineal juntamente com "Pisc clitóris" (eversão rítmica do clitóris). Ocorre ainda a micção em pequenas quantidades. A micção frequente garante o contato com o garanhão, que vai mostrar uma resposta olfativa incluindo reflexo de *Flehmen*. Esse comportamento da égua é parte de um mecanismo que envolve quimiorreceptores que estimulam e preparam o

garanhão para a cópula e a ejaculação. Éguas no estro têm sua expressão facial caracterizada por músculos faciais relaxados, orelhas voltadas para o lado e a cabeça abaixada, em contraste, as éguas da fase lútea será menos interessada em um garanhão. Com a aproximação do garanhão, as éguas vão começar a relinchar e a escoiceá-lo. A agressividade é caracterizada pela tensão dos músculos faciais, orelhas viradas pra trás, muitas vezes ameaçam morder o garanhão (CROWELL-DAVIS, 2007).

O comportamento estral das éguas é inibido pela progesterona e estimulado pelo estradiol. Éguas no estágio anovulatório com ovários pequenos e inativos e em éguas ovariectomizadas, o comportamento estral é visto em intervalos irregulares. O comportamento varia de leve interesse em um garanhão ao repertório completo do comportamento estral, incluindo a aceitação de monta e cópula (HERDBERG et al., 2007). O comportamento estral em éguas anovulatórias é provavelmente causado por pequenas quantidades de estradiol sintetizado pelo córtex adrenal em conjunto com a ‘sensibilidade elevada da égua a hormônios esteroides (CROWELL-DAVIS, 2007). Em contraste com outras espécies, as éguas, no primeiro estro após a temporada de inverno (anovulatórios) ou após o parto, são acompanhadas por comportamento estral. Na égua pós-parto, facilita a concepção inicial no “cio do potro” e permite que haja produção de um potro por ano.

A glândula pineal tem sua atividade modulada pelo fotoperiodismo, que estimula o hipotálamo sinalizando para a secreção do hormônio pineal melatonina. O GnRH atinge a pituitária anterior via sistema portal hipotálamo-pituitária estimulando a síntese e secreção de gonadotropinas que chegam aos ovários via circulação sistêmica. As gonadotrofinas LH e FSH são controladas pelo GnRH e até o presente momento não há nenhuma evidência de que exista um fator específico de liberação de FSH nas éguas, sendo que a maioria dos pulsos de GnRH hipotalâmicos são seguidos por pulsos de LH a partir da

pituitária e mais de 80% de pulsos de LH são acompanhado por um impulso de FSH. As mudanças de frequência de pulsos de GnRH com o estágio do ciclo estral são baixas durante a fase lútea com um intervalo de impulsos de GnRH de aproximadamente 120 minutos. No dia da ovulação, o intervalo de pulsos de GnRH duram cerca de 30 minutos. Isto é, semelhante ao intervalo de pulso de GnRH observado durante o surto de LH em ovelhas ovariectomizadas induzidas por tratamento com estradiol (ALEXANDER; IRVINE, 1991).

A liberação hipotalâmica de GnRH é modulada por mecanismos de *feedback* de esteroides, portanto, os mecanismos de reação têm que ser mediados por áreas cerebrais superiores. No cavalo, sistema opioide endógeno é ativado pela progesterona em conjunto com estradiol. Durante a fase lútea, sistemas opioidérgicos de inibição de GnRH hipotalâmico e a posterior liberação de LH hipofisário, enquanto durar a fase folicular, estão inativos e permitem o aumento da secreção de LH (AURICH et al., 1996).

O ovário tem sua atividade regulada por hormônios liberados na circulação sistêmica (ação endócrina), difusão intercelular de substâncias (ação parácrina) e autorregulação por liberação de substâncias que aderem às próprias células receptoras (ação autócrina). As principais gonadotropinas são o FSH e LH, que possuem controle endócrino no crescimento folicular. Hormônios como a inibina, activina, prolactina e insulina também desempenham um papel importante.

Hormônios esteroides também estão aparentemente envolvidos na foliculogênese em todos os níveis de regulação: endócrino, parácrino e autócrino. Os mecanismos de ação de FSH e LH no desenvolvimento de folículos antrais são os seguintes: Folículos pré-antrais adquirem receptores para LH nas células da teca e, para FSH nas células da granulosa, as células da teca produzem andrógenos sob a influência de LH, os andrógenos passam então através da lâmina basal para dentro do próprio folículo e aromatização de

andrógenos para estrógeno ocorre sob a influência de FSH quando nas células da granulosa.

O padrão divergente de liberação de LH e FSH são mais pronunciados na égua do que em muitas outras espécies animais domesticadas. Um aumento pré-ovulatório precoce em concentrações periféricas de LH é acompanhada por um modesto aumento de FSH, posteriormente, recusando-se a sua concentração mais baixa, enquanto LH está chegando ao seu máximo (BERGFELT; KASTELIC; GINTHER, 1991). No meio da fase lútea, uma segunda e robusta subida de FSH ocorre sem aumento concomitante de LH. Esta segunda onda de FSH ocorre em diferentes dias do ciclo entre éguas individualmente (GINTHER et al., 2005). No entanto, durante o estro, o período de elevadas concentrações de LH duram vários dias. O aumento gradual da LH é transitoriamente interrompido após a ovulação, devido à absorção de estradiol folicular do fluido que é sugerido para ser descarregado no ventre da ovulação (GINTHER et al., 2010).

As inibinas desempenham um importante papel na regulação hormonal da foliculogênese durante o ciclo estral, atuando como sinalizadores químicos para a hipófise sobre o número de folículos em crescimento no ovário (HAFEZ; HAFEZ, 2004), a inibina atua na diminuição da síntese e da liberação do FSH. De acordo com Webb et al. (2000), o IGF-1 interage com o FSH no estímulo da produção de estradiol pelas células da granulosa. O IGF-1 é importante para a maturação sexual, secreção de gonadotrofinas e age sinergicamente com estas para estimular o crescimento e a diferenciação dos folículos (ZULU; NAKAO; SAWAMUKAI, 2002).

Após a ovulação, o folículo rompido forma um corpo lúteo que secreta progesterona. O período na qual o corpo lúteo secreta progesterona é denominado fase luteal ou diestro. As concentrações de progesterona aumentam rapidamente para valores máximos dentro de seis dias, permanecendo alta

durante a fase luteal. A progesterona inibe o comportamento do estro, provocando a contração e fechamento cervical, preparando o útero para a gestação, seus efeitos no comportamento e no trato genital são dominantes sobre o estrógeno. A progesterona inibe a onda pré-ovulatória de LH. Entretanto, diferentemente de muitas espécies, não inibe completamente a foliculogênese e ovulação. A regressão do corpo lúteo (luteólise) determina a fase final do ciclo estral.

Luteólise funcional na égua é caracterizada por uma diminuição acentuada nas concentrações sanguíneas de progesterona em 15-17 dias do ciclo regredindo morfológicamente o corpo lúteo lentamente (GINTHER et al., 2005).

Assim, a luteólise funcional é facilitada pelo efeito inibidor protetor do IGF em apoptose e seu efeito estimulante sobre a esteroidogênese (WATSON et al., 2004).

2.2 Fisiologia da reprodução de garanhão

A espermatogênese é um processo de diferenciação contínua das células germinativas para a produção de espermatozoides. Inicia-se na fase de puberdade, que está associada à transição de um estado hipogonadotrópico na fase pré-puberal do desenvolvimento para o estado eugonadotrópico do adulto, sendo compartimentalizada dentro da barreira hematotesticular.

O principal fator que regula a espermatogênese é o hormônio folículo estimulante ou FSH, que, além da regulação parácrina de fatores localmente produzidos é responsável pela interação entre as células de Sertoli e as células germinativas em todos os estágios da maturação espermatogênica.

As espermatogônias originam-se na puberdade pela proliferação dos gonócitos e derivam das células germinativas primordiais, revestindo o túbulo seminífero próximo à membrana basal. As espermatogônias sofrem uma ou duas

divisões para manter sua população no reservatório de células tronco. Das células produzidas pelas divisões mitóticas, algumas permanecem no reservatório em “repouso” e outras espermatogônias proliferam e sofrem de 1 a 5 estágios de divisão e diferenciação, sendo que da última divisão originam-se espermatócitos primários. As espermatogônias primordiais (repouso por um determinado tempo) sofrem um novo ciclo de proliferação, ocorrendo antes da conclusão da espermatogênese pela geração anterior de células germinativas, gerando vários estágios do processo de divisão celular simultaneamente nos túbulos seminíferos. Essa dinâmica (repouso e proliferação) é fundamental para manter a capacidade dos testículos de produzirem continuamente espermatozoides.

Os espermatócitos primários sofrem duas divisões, sendo a primeira divisão meiótica que produz dois espermatócitos secundários, que são divididos completando a meiose e produzindo as espermátides. A espermiogênese ou maturação e desenvolvimento das espermátides em espermatozoides é a fase que se caracteriza pelas alterações nuclear e citoplasmáticas que produzem espermatozoides. Os principais eventos nesta fase envolvem a condensação do material nuclear da espermátide, a formação do acrossoma, o reposicionamento da espermátide para permitir a formação e alongamento das estruturas da cauda, a formação da espiral mitocondrial e a remoção do citoplasma estranho, resultando em espermatozoide.

A espermição é o processo final de liberação dos espermatozoides maduros das células de Sertoli na luz tubular. As células germinativas migram da região basal dos túbulos seminíferos para o lúmen protegido pela barreira hematotesticular. No compartimento basal ocorre a fase mitótica e no compartimento luminal a fase meiótica e pós-meiótica.

A proliferação e a atividade secretora pelas células de Sertoli são estimuladas pelo FHS e a síntese de testosterona pelo LH, estimulando a

espermatogênese mediada por receptores nas células de Sertoli. A maturação completa dos espermatozoides e o desenvolvimento de sua capacidade de fertilização do óvulo constituem funções de processos adicionais que ocorrem após a liberação dos espermatozoides das células de Sertoli realizadas pelas glândulas acessórias e do sistema excretor, órgão que desempenha papel importante na produção do ejaculado que contém espermatozoides, no transporte, armazenamento e ejaculação.

Os espermatozoides ao saírem do testículo ainda não são capazes de fertilizar o oócito. À medida que passam pelo epidídimo, os espermatozoides sofrem importantes alterações morfofuncionais, onde passam a ter capacidade fecundante (BARTH; OKO, 1989). O epidídimo é anatomicamente conectado ao testículo e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. Cada região secreta substâncias específicas que promovem mudanças na composição química e proteica do fluido epididimário, essenciais para a manutenção da viabilidade da célula espermática (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003).

As mudanças funcionais envolvem alterações do padrão de atividade flagelar e habilidade de se ligar à zona pelúcida. Mudanças na composição da membrana plasmática contribuem para estas mudanças funcionais. Elas são refletidas por mudanças na carga elétrica da superfície celular, ligação de lecitinas, distribuição de partículas intramembranas, fluidez da membrana, composição de lipídeos e proteínas e ligação de anticorpos. Portanto, tanto os eventos da espermatogênese quanto a maturação pós-testicular são necessários para a competência das células espermáticas frente à fertilização (GATTI et al., 2004).

Os espermatozoides são células alongadas, consistindo de cabeça, contendo um núcleo, e uma cauda (EDDY; O'BRIEN, 1994; HAFEZ, 1995). A cabeça apresenta forma oval e achatada, contendo cromatina altamente compacta ou condensada que compreende um complexo DNA, com uma classe especial de

proteínas denominadas protaminas espermáticas (BARTH; OKO, 1989; HAFEZ, 1995).

Na cabeça do espermatozoide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. A membrana plasmática do flagelo é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial e domínio da cauda posterior que cobre a peça principal e terminal da cauda.

A região de acrossomal da membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Nos segmentos marginal e principal a junção é denominada capa acrossomal. O acrossoma é uma estrutura composta de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do Complexo de Golgi, gerado durante a espermiogênese.

O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos. O colo conecta a cabeça do espermatozoide à cauda (flagelo), que é subdividida em peça principal, intermediária, e terminal (HAFEZ, 1995). O colo ou peça de conexão forma uma placa que se ajusta dentro de uma depressão na superfície do núcleo (EDDY; O'BRIEN, 1994) e é contínua com nove feixes de fibras que posteriormente se projetam através da maior parte da cauda. A peça intermediária, localizada entre o colo e o annulus, juntamente com o comprimento total da cauda, formam o axonema (HAFEZ, 1995). Na peça intermediária, existe um grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, produzindo energia para a motilidade espermática (EDDY; O'BRIEN, 1994).

O axonema, uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (ALBERTS, 2004), está envolvido no mecanismo de motilidade espermática. Este apresenta nove pares de

microtúbulos periféricos além da presença de uma parte central. Para ação direta deste movimento a dineína e a tubulina utilizam adenosina trifosfato (ATP), o qual é produzido através das mitocôndrias presentes na peça intermediária (HAFEZ, 1995).

Sobre o garanhão, em comparação com a égua, há uma escassez de dados disponíveis da influência do envelhecimento sobre a função reprodutiva no mesmo. Embora síndromes de infertilidade e subfertilidade documentadas existam em garanhões, com mudanças na produção de esperma, libido e alterações associadas às concentrações hormonais gonadais e hipotalâmico-hipofisárias (ROSER, 2000), estas não têm sido geralmente associada à senescência reprodutiva. Os garanhões que são mantidos até idades avançadas não só, têm a genética desejável, mas representam subpopulação que tem a menor taxa de senescência reprodutiva. Dowsett e Pattie (1982) revelaram que, embora a idade não afete as taxas de prenhez por estação de monta, o declínio da fecundidade é evidenciado com a diminuição da eficiência reprodutiva de garanhões mais velhos.

O declínio na produção de espermatozoides por dia (DSP) associado com a entrada para a temporada fora da estação de monta é mais dramático nos garanhões acima de 13 anos de idade (50%) em comparação com garanhões de 4 - 5 anos de idade (20%). Em cavalos mais velhos, este declínio é relativamente maior do que a queda sazonal no peso testicular, o que requer a redução de 34% na eficiência da produção de espermatozoides (esperma por grama de parênquima) em garanhões mais velhos em comparação com 19% para garanhões de 6 - 12 anos de idade e 12% para garanhões 4 - 5 anos (AMANN; GRAHAM, 1993).

Garanhões mais velhos são mais propensos ao declínio na fertilidade, aos efeitos da degeneração testicular na produção de espermatozoides antes de diminuição da libido tornar-se aparente (BOYLE et al., 1991). Alguns

pesquisadores relatam que há regras definidas para a redução da libido com o envelhecimento, além de pequenos aumentos no tempo de reação a provocações (KLUG et al., 2003). Como outros gananhões, no entanto, os animais podem, ocasionalmente, apresentar problemas da libido e isso não é associado com a diminuição da produção de testosterona com a idade.

3 COLETA DE SÊMEN

A utilização da inseminação artificial na espécie equina data de 1930. Um trabalho pioneiro na inseminação artificial em equinos com sêmen fresco foi realizado por Ivanow na União Soviética e por Gotze na Alemanha (GOTZE, 1949).

Quanto às técnicas de colheita de sêmen, a mais largamente utilizada é a da vagina artificial (VA) fechada, podendo ser modificada, utilizando-se a técnica de VA aberta, cuja principal finalidade é a colheita de sêmen fracionada, sendo apenas indicada em situações especiais (TRISCHNER, 1979). As mais utilizadas em todo território nacional são o modelo alemão (Hannover), seguido pelo modelo brasileiro Botucatu, havendo outros modelos como: Colorado, Japonesa ou Nishikawa.

Em garanhões que apresentam incapacidade de monta ou disfunção comportamental pode ser utilizada a combinação de dois fármacos: iminaprina e xilazina para a obtenção do ejaculado, obtendo-se sucesso de 30 a 50% (SAMPER, 2007).

A coleta de sêmen é feita utilizando-se uma égua em estro devidamente contida, para evitar possíveis lesões traumáticas no garanhão bem como no indivíduo coletor. O processo de coleta exige extrema habilidade do coletor, pois envolve alto grau de periculosidade, porque alguns garanhões se tornam extremamente agressivos durante a coleta de sêmen. Há também a utilização de manequim que faz o papel de uma égua, porém, o garanhão deverá ser treinado para realizar a coleta, não necessitando a presença de uma égua no cio e ainda podendo ser realizada fora da estação de monta. A vagina artificial é preparada com água aquecida por volta de 42°C, lubrificada e possui um recipiente de filtragem da fração gelatinosa, sujeiras e possíveis contaminantes da fração rica em espermatozoides e acondicionamento do ejaculado.

O volume do ejaculado é muito variável com a idade, época do ano, raça, regime de coleta de sêmen, estimulação sexual prévia, entre outros fatores (LOVE, 2007). A maioria dos garanhões ejacula entre 25 e 80 mL de fração rica em espermatozoides (SAMPER, 2007; SILVA FILHO, 1994).

Com a utilização de microscópio óptico e placa aquecedora, é feita a avaliação de uma gota de sêmen colocada entre uma lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 35 – 37°C em placa ou mesa aquecedora, sendo então levada ao microscópio para serem avaliadas as características de motilidade total e progressiva em escala percentual (0 a 100%) e vigor (1 a 5), segundo parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998). A motilidade total para a maioria dos garanhões varia de 40 a 80%, de 35 a 75% para a motilidade progressiva e vigor médio de três. Durante a avaliação de motilidade e vigor, amostras devem ser retiradas para avaliação da concentração e morfologia espermática. A concentração espermática varia de 50 a 400 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado para a maioria dos garanhões (LOVE, 2005).

A inseminação artificial é uma técnica utilizada para depositar espermatozoides normais e vivos no útero, no momento adequado (SAMPER, 2000). Embora este procedimento pareça simples, a perfeita coordenação das várias etapas resulta em taxas de gestação ótimas.

Nos equinos existem três métodos de inseminação artificial (IA):

- a) Sêmen fresco – quando o sêmen é colhido e usado imediatamente no seu estado puro ou diluído com um diluidor apropriado, ou até algumas horas após a colheita (geralmente menos de três horas).
- b) Sêmen refrigerado – após a colheita, o sêmen é diluído com um diluente apropriado e resfriado lentamente para 5 a 8°C, sendo transportado para ser utilizado num prazo de 12-36h após a colheita.

- c) Sêmen congelado – o sêmen é colhido e processado de forma apropriada e depois é armazenado num contentor de azoto líquido para ser utilizado durante vários dias, meses ou anos após a colheita (SAMPER, 2000).

4 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

A primeira transferência de embriões (TE) descrita em mamíferos foi realizada em 1890, por método cirúrgico, pelo cientista Walter Heape, na Inglaterra. Este retirou embriões de uma coelha Angorá, utilizando apenas uma lente de aumento para identificá-los no oviduto, e os implantou em uma lebre Belgian recém-coberta, que deu a luz a dois coelhos Angorás e quatro lebres Belgians. Walter Heape provou com isso, que era possível retirar embriões não implantados e transferi-los a um ambiente gestacional, sem afetar seu desenvolvimento (BIGGERS; HEAPE, 1991).

O primeiro relato com sucesso da TE na espécie equina ocorreu na década de 70, descrita no Japão por Oguri e Tsutsumi (1972). No Brasil, esta técnica em equinos foi primeiramente descrita por Fleury et al. (1987), adaptando a metodologia relatada por Douglas (1979) às condições brasileiras. Um grande avanço desta biotécnica aplicada à referida espécie, melhorou consideravelmente as taxas de prenhez de 12,5% para 74.55% (FLEURY; ALVARENGA, 1999; OGURI; TSUTSUMI, 1980; PERES et al., 2002; ROCHA et al., 2004; VOGELSANG et al., 1979).

A TE é utilizada com a aplicação de uma série de procedimentos para a produção de múltiplos potros por égua durante o ano, visando o melhor aproveitamento de éguas que possuam alto valor zootécnico, subférteis, idosas ou que estejam em atividade esportiva (ARRUDA et al., 2001; DAELS, 2007; HURTGEN, 2008).

Inicialmente, a técnica de TE era feita por meio de laparoscopia abdominal, envolvendo procedimento cirúrgico que envolvia riscos normais de uma cirurgia e dificuldades em ser realizado em haras e fazendas que não dispunham de um local apropriado e custos mais elevados, por isso não é mais utilizada. A técnica não cirúrgica desenvolvida é a transferência do embrião de

forma semelhante ao procedimento de IA que consiste em depositar o embrião no corpo uterino através da passagem pela cervix com uma pipeta apropriada.

O embrião é coletado a partir de uma ovulação natural ou induzida por fármacos, sendo colhidos com sete a oito dias pós-ovulação, em média. Sendo o dia da ovulação considerado D0. Alguns fatores podem influenciar na taxa de recuperação do embrião tais como: o dia da coleta, o número de ovulações (simples ou múltiplas) idade da doadora e qualidade do sêmen (SQUIRES; SEIDEL, 1995). O principal fator que afeta a recuperação de embrião é o histórico reprodutivo da égua doadora, sendo que as éguas mais velhas têm produção de óvulos reduzida, incluindo patologias uterinas, de oviduto e um aumento de perda embrionária precoce. A qualidade do sêmen também influencia, sendo que as éguas inseminadas com sêmen fresco produzem mais embriões do que as inseminadas com sêmen refrigerado e congelado/descongelado.

O médico veterinário utilizando uma luva estéril introduzirá através da vagina uma sonda siliconada com um manguito inflável em sua extremidade, fixando a sonda transcervicalmente, inflando o balão com aproximadamente 40 mL de ar e infundindo por volta de 1 litro de soro ringer com lactato e drenando em seguida para um copo filtro de 75 µc, repetindo esse procedimento por volta de três vezes, perfazendo um total de três litros, normalmente não há necessidade de repetir uma vez que o embrião possa ser visível a olho nu no copo filtro após a drenagem e filtragem do 1º ou 2º litros de soro.

O líquido coletado é transferido para uma placa de Petri e é feita uma varredura nesse líquido por meio de uma lupa estereoscópica para localização e classificação das estruturas encontradas. O embrião identificado é avaliado em estágio de desenvolvimento e grau. O tamanho varia de 0.4 a 1.0 mm de diâmetro. O estágio de desenvolvimento e o grau da qualidade do embrião estão descrito nas Tabelas 1 e 2 a seguir.

A qualidade do embrião tem grande efeito nas taxas de prenhez, pois embriões classificados como grau 3 ou maior resultam taxas prenhez reduzidas, bem como embriões pequenos em relação ao tamanho normal do dia coletado e com anormalidades morfológicas. A partir do 14º dia de vida do embrião transferido é feito o acompanhamento por exame ultrassonográfico transretal para identificar e acompanhar a possível gestação.

Tabela 1 Escala para classificação e descrição dos embriões

Grau	Categoria	Aparência	Características
1	Excelente	Esférico	Tamanho, cor e textura uniformes.
2	Bom	Poucas Imperfeições.	Alguns blastômeros deslocados, forma irregular, separação do trofoblasto
3	Regular	Problemas óbvios	Blastômeros deslocados, células degeneradas, blastocele colapsada.
4	Ruim	Problemas severos, forma irregular.	Blastocele colapsada, muitos blastômeros deslocados, células degeneradas.
5	Degenerado	Embrião morto ou degenerado	O ócitos não fertilizados ou embriões totalmente degenerado

Fonte: Evangelista (2012), adaptação de Hartman et al. (2011).

Tabela 2 Características dos embriões recuperados baseadas nos dias após ovulação

Dia	Tamanho (μm)	Média (μm)	Estágio esperado
6	200	130-750	Mórula a blastocisto inicial
7	400	135-1460	Mórula a blastocisto expandido
8	1000	120-4000	Blastocisto a blastocisto expandido
9	2000	750-4500	Blastocisto expandido

Fonte: Evangelista 2012 adaptação de Vanderwall (2000).

5 FERTILIDADE DE EQUINOS

5.1 Escolha do garanhão

A elaboração de metas a serem atingidas em uma criação equina passa pelo correto acasalamento entre garanhão e a égua adequada para expressar fenotipicamente sua descendência a fim desempenhar com máxima eficiência seu trabalho, esporte ou lazer.

Os garanhões utilizados na reprodução assistida são incapazes de fornecer uma taxa de motilidade do espermatozoide aceitável após terem sido submetidos ao resfriamento, armazenamento e criopreservação (BRINSKO et al., 2005), devido à falta de seleção com o objetivo do resfriamento e congelabilidade do sêmen. A conquista de um título importante na carreira de um cavalo pode fazer com que ele se torne um reprodutor devido ao seu desempenho. Porém, a sua fertilidade não é fator principal na decisão de se tornar um reprodutor, pois para alguns criadores um animal tido como subfêtil pode acarretar prejuízos à imagem do criatório.

Quando o cavalo se transforma em garanhão e entra no processo de reprodução do haras, faz-se necessária a coleta e o envio de sêmen para a utilização em outros centros de reprodução equina. A qualidade no recebimento de sêmen é de fundamental importância no momento da inseminação porque se faz um processo de sincronização na égua doadora, para que a inseminação ocorra o mais próximo de sua ovulação, pois o sêmen tem um tempo determinado de viabilidade no útero da égua.

A qualidade na elaboração de meios extensores vem evoluindo com o objetivo de aprimorar a integridade dos espermatozoides no processo de resfriamento e no congelamento-descongelamento, visando o aumento na qualidade dos espermatozoides viáveis para fertilização. No plasma seminal dos

equinos, ocorre a ação de enzimas como catalase e superóxido dismutase, sendo suas concentrações variáveis entre garanhões. O espermatozoide possui quantidade limitada de antioxidantes, tendo como fonte o plasma seminal, que possui a função de proteger o espermatozoide ejaculado dos efeitos adversos das espécies reativas ao oxigênio ou ROS (COTGRAVE; MOLDEUS; ORRENIUS, 1988). Durante o processo de congelamento é retirado o plasma seminal, aumentando a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo devido à retirada desses antioxidantes.

A refrigeração e o congelamento do espermatozoide podem induzir lesões da membrana celular, que estão associadas à ruptura dos lipídeos da membrana, resultando em danos para a mitocôndria e perda da integridade das membranas plasmática e acrossomal (PARKS; GRAHAN, 1992). Esses danos causam perdas de motilidade, de viabilidade e da capacidade fecundante do espermatozoide; fenômeno comumente denominado de "choque térmico" (WATSON, 2000). A capacidade do espermatozoide para resistir a choque térmico parece estar relacionada com a composição lipídica da membrana espermática (PARKS; GRAHAN, 1992).

O desafio da célula espermática durante o processo de congelamento não é a sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento de -196°C , mas sim, a sua capacidade de suportar mudanças que ocorrem durante as zonas intermediárias de temperatura ($+19^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$ e -15°C a -60°C), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento. Estudos realizados por Pickett et al. (1975) demonstraram que uma alta concentração de plasma seminal em sêmen diluído foi deletério para sêmen equino e bovino resfriado. Braun et al. (1994) demonstraram que a motilidade espermática do sêmen de garanhões durante o armazenamento por resfriamento foi melhor em espermatozoides mantidos com 25% de plasma seminal, quando comparado com a ausência de plasma. Watson (1995) relata que a criopreservação induz

mudanças na membrana plasmática e fazem com que os espermatozoides se comportem como se estivessem parcialmente capacitados, essa capacitação prematura pode ser resultado da perda de lipídeos durante o congelamento e/ou da perda de fatores descapacitantes que são removidos, juntamente com o plasma após a centrifugação.

A fertilidade do sêmen congelado é relativamente menor quando comparada ao sêmen fresco e resfriado, observando-se diminuição de até 30% nos índices de prenhez das éguas (MCKINNON; VOSS, 1993). Provavelmente, a menor taxa de prenhez se deve aos danos à estrutura e ao funcionamento da membrana plasmática decorrentes das drásticas variações de temperatura a que são submetidos os espermatozoides durante o processo de congelamento (GRAHAM; LOOMIS, 2008; PAPA et al., 2005).

Há uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, entre +19°C e +8°C, em que o espermatozoide pode ser severamente lesado. O resfriamento nesta faixa de temperatura (+19 e +8°C) faz com que os lipídios da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996).

Quando o sêmen é resfriado abaixo de 5°C, inicialmente o meio que circunda o espermatozoide e eles próprios permanecem descongelados, porque seu ponto de congelamento é abaixo de 0°C, apenas ocorrendo um super-resfriamento (AMANN; PICKETT, 1987). Se esse resfriamento for realizado de maneira inadequada, ocorre o choque térmico (WATSON, 1995, 2000), acarretando prejuízos irreversíveis como a rápida perda de motilidade, movimento circular, redução do metabolismo espermático, danos à membrana plasmática decorrente de aumento da permeabilidade, como consequência ocorre perda de íons e moléculas intracelulares e danos acrossômicos como edemaciamento e irregularidades do acrossoma.

As lesões celulares causadas durante os processos de congelamento e descongelamento (bases físico-químicas) são devidas à formação de cristais de gelo intracelular, que afetam a estrutura da célula, a concentração de solutos resultante do congelamento da água pura e a interação destes dois fatores. O espermatozoide pode sofrer danos mecânicos devido à formação de grandes cristais de gelo intracelular, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento, enquanto os pequenos cristais podem não ser deletérios. Durante o reaquecimento, porém, o crescimento desses pequenos cristais em decorrência da recristalização pode causar danos severos. Há dificuldade em se compreender o efeito da solução, sendo que, pelo menos quatro fatores distintos estão envolvidos no processo de congelação: 1) remoção da água em forma de gelo; 2) concentração de solutos de alto e baixo peso molecular; 3) redução do volume celular e 4) precipitação de solutos (ZÚCACARI, 1998).

Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta e condutividade de calor, e a temperatura (AMANN; PICKETT, 1987). Temperatura alta, como 75°C por sete segundos imergindo imediatamente em banho-maria a 37°C por mais cinco segundos para promover maior viabilidade e motilidade espermáticas pós-descongelamento comparada à temperatura e tempo são utilizados rotineiramente (37°C, 30 segundos) (HOLT, 2000).

A remoção do plasma seminal antes do congelamento melhora a motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento, pois a alta concentração de cloreto de sódio presente no líquido seminal pode causar danos aos espermatozoides preservados “in vitro”, bem como pode ser uma prática na inseminação diminuindo a quantidade de sêmen depositado no útero, diminuindo a reação inflamatória pós-inseminação.

Entretanto o plasma seminal pode conter vários componentes que protegem as membranas durante a criopreservação, cuja composição pode variar entre ganhões e isso pode explicar a habilidade diferente dos espermatozoides de ganhões, em sobreviver ao processo da criopreservação (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005).

O processo de centrifugação não é inócuo aos espermatozoides, podendo ocasionar uma redução na sua motilidade. Para a sobrevivência dos espermatozoides durante a criopreservação, estes necessitam da presença de agentes crioprotetores nas etapas de resfriamento, congelamento e descongelamento.

A logística envolvida entre a comunicação do pedido feito pelo haras onde se encontra a doadora e o haras do ganhão é muito importante para o sucesso da IA. Deve haver o sincronismo, para que o recebimento possa ocorrer no horário programado de forma que sejam minimizadas possíveis falhas. A ausência de falhas de logística permite que os espermatozoides possam chegar nas melhores condições possíveis, proporcionando uma inseminação artificial eficiente no programa de TE e aumentando a chance da obtenção de embriões viáveis.

5.2 Escolha da égua doadora

A égua a ser submetida ao programa de TE deverá passar pela avaliação do seu estado clínico e nutricional, idade, histórico reprodutivo, fertilidade, genealogia, as diretrizes de registro da raça, números de embriões a serem implantados e valor do produto a ser gerado pela TE.

Após a aprovação e entrada no programa de TE, a égua doadora passa a ser controlada diariamente, durante toda a estação de monta. Esse controle consiste em monitorar todo o seu comportamento reprodutivo, realizando

rufiação para detecção de sinais aparente de estro, avaliações de exames de palpação e avaliação do desenvolvimento folicular e do momento da sua ovulação por meio de ultrassonografia.

O uso de fármacos análogos da prostagladina $PGF2\alpha$ é necessário para a indução do estro após a coleta de embrião. Isto antecipa o retorno ao estro e ajuda a evitar possíveis infecções uterinas por contaminação oriunda da coleta de embrião e pode antecipar em até cinco dias o intervalo entre uma ovulação e outra.

Os hormônios exógenos também são utilizados para sincronizar a ovulação da égua doadora com o recebimento da dose inseminante do garanhão escolhido e entre a ovulação da doadora e a da égua receptora. Essa sincronização deve ser feita com muita precisão, pois no momento da coleta deve-se ter por volta de três receptoras ovuladas em sincronia com a ovulação da doadora. Este sincronismo deve variar de um dia antes (D-1) até cinco dias (D+5) depois da ovulação da doadora. Exames ultrassonográficos transretais feitos nas éguas receptoras são determinantes para se encontrar a égua mais apta a receber o embrião.

Éguas mais velhas podem constituir grande parte do número de doadoras em um programa de TE, principalmente por estes animais já apresentarem progênie comprovada ou terem obtido bons resultados na carreira esportiva (ALONSO et al., 2005). Entretanto, este elevado percentual pode ser um problema, pois é sabido que éguas idosas possuem eficiência reprodutiva mais baixa que éguas jovens, fato normalmente associado a distúrbios da ovulação e maturação ovocitária e/ou endometrite crônica (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). É sempre importante ter em mente que éguas idosas necessitam maiores cuidados em relação ao seu bem estar, como nutrição diferenciada, evitando estresse ambiental e social, além de que deveriam permanecer em piquetes próximos às centrais, evitando maiores deslocamentos (ALVARENGA et al.,

2010). Portanto, a idade da égua doadora influencia a taxa de recuperação de embriões, havendo queda natural de fertilidade em éguas com mais de 16 anos de idade, que se acentua gradativamente a partir desse ponto.

5.3 Escolha da receptora

A aquisição e escolha de receptoras podem vir a ser um dos fatores mais importantes para o programa de TE de uma central. A seleção e o manejo de éguas receptoras contribuem para o sucesso da TE (MCKINNON; SQUIRES, 2007; VANDERWALL; WOODS, 2007) que ao receberem o embrião, deverão estar aptas para o reconhecimento e fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento.

As éguas receptoras necessitam passar por um exame reprodutivo completo por médicos veterinários aptos, antes da aquisição, incluindo a palpação retal e exame de ultrassonografia, exame citológico, exame de biopsia endometrial, integridade dos genitais externos e exame de competência cervical. Entretanto, geralmente o exame não é feito de forma completa, havendo grande proporção de éguas aceitas que não estão aptas reprodutivamente (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Uma característica importante na escolha de receptoras é a habilidade materna, ou seja, a capacidade da égua em gestar, parir e criar os potros. Para isso, é preciso definir critérios de seleção que incluam a idade entre 3 e 10 anos, boa índole, bom desenvolvimento mamário (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999), ciclos estrais normais e ausência de anormalidades uterinas e ovarianas (VANDERWALL; WOODS, 2007), já que a idade é um fator predisponente para a degeneração do endométrio uterino, que pode comprometer a manutenção de uma gestação (RICKETTS; ALONSO, 1991). Carnevale et al. (2000) relatam que receptoras com mais de 10 anos parecem apresentar maior risco de perda de prenhez.

O manejo das éguas receptoras é um fator crítico que afeta diretamente a taxa de prenhez. As receptoras que ovulam com três dias após as doadoras possuem maiores taxas de prenhez, segundo McKinnon et al. (1988).

Carnevale et al. (2000), afirmam que o fator de escolha mais importante da receptora é o tônus do útero e da cérvix avaliados por palpação retal. As receptoras são examinadas durante o cio e no dia da TE, através de ultrassonografia retal para identificar se há presença de corpo lúteo, fluido uterino e dobras endometriais. A preferência é por éguas primíparas ou jovens de fertilidade comprovada, entretanto éguas ovariectomizadas tratadas com progesterona podem ser utilizadas como receptoras (MCKINNON et al., 1988), bem como as éguas que não estão ciclando (anestro) tratadas com progesterona (LAGNEUAX et al., 1997).

O manejo nutricional das receptoras afeta diretamente as taxas de prenhez após a transferência, sendo necessário que as éguas estejam em bom estado corporal, ganhando peso durante a estação de monta (ALONSO, 2008). É importante lembrar que uma receptora não alimentada adequadamente vai apresentar uma maior dificuldade em ciclar regularmente, gerando um produto de menor qualidade, com o agravante de comprometer sua lactação futura segundo Losinno e Alvarenga (2006).

O fornecimento de fontes de alimentação mais baratas, porém de baixa qualidade para as receptoras em uma central de TE pode afetar a taxa de prenhez. O custo com alimentação pode chegar a 25% do custo total (PESSOA, 2012), adequando-se a qualidade da dieta, disponibilizando-se água, sal mineral à vontade e capim de boa qualidade.

As receptoras começam a ser examinadas diariamente após apresentarem cio natural ou induzido por fármacos e terão monitoramento do seu crescimento folicular e sua ovulação (VANDERWALL; WOODS, 2007). McKinnon e Squires (2007) recomendam pelo menos duas receptoras

disponíveis para cada doadora no dia da coleta de embrião. Isso permite, no momento da inovulação, a escolha da receptora que apresenta as melhores condições reprodutivas para receber o embrião. Além disso, podem ocorrer coletas que resultem em dois embriões, naturalmente ou por superovulação. Há casos em que até três receptoras são sincronizadas, porém o importante é que essas éguas sejam acompanhadas e avaliadas durante todo o seu estro, para que as informações sejam cruzadas e possa-se optar pela melhor receptora no dia da TE.

5.4 Sincronização do estro

A doadora e receptora(s) necessitam estar em perfeita sincronia no período do cio, na data de ovulação e na TE. A técnica utilizada em éguas que estão ciclando é baseada nas injeções intramusculares de PGF2 α na doadora, e no 1º ou 2º dias seguintes, nas receptoras. Quando há controle o estro deve ser detectado entre o 6º e 14º dias do diestro. Antes desse período, as fêmeas não possuem receptores capazes de responder à prostaglandina e depois do 14º dia, o animal já estará entrando no estro natural que é de 21 dias em média.

O exame ultrassonográfico do sistema reprodutivo das éguas mostrará em qual situação se encontra e qual o caminho a ser seguido. Os ovários em fase reprodutiva apresentam folículos que se desenvolverão e normalmente um dos folículos irá se tornar o folículo dominante e ovular. Em éguas que estejam fora da ciclicidade normal ou não estejam sincronizadas ambas podem ser tratadas durante o curso de nove ou 10 dias com progesterona injetável ou orais sintéticos, seguindo sempre a orientação de que as doadoras deverão receber aplicação um ou dois dias à frente das receptoras e no último dia da terapia, em todas as éguas, aplica-se uma injeção de prostaglandina ou análogo para induzir a luteólise de qualquer corpo lúteo que pode estar presente neste momento

(DRIANCOURT; PALMER, 1982), devendo exibir estros em torno de três dias (BERGFELT, 2000).

5.5 Indução da ovulação

A utilização de sêmen transportado refrigerado de garanhões, que não se encontram na central de TE, exige a indução da ovulação da doadora. Isto se deve ao custo da coleta e ao transporte do sêmen e impedimentos tais como dias de semanas nos quais o sistema de entrega de cargas em aeroportos ou rodoviárias não funciona, dia de coleta de sêmen e cota de doses de sêmen a serem enviadas às centrais de TE. E também a ovulação da receptora deverá estar em sincronia com a ovulação da doadora. Na utilização do sêmen congelado, pode ser realizada a indução da ovulação a fim de garantir que esta ocorra em tempo pré-determinado.

A utilização nas éguas doadoras e receptoras de esteroides reprodutivos (progestágenos e estrógenos), prostaglandina F₂ (PGF e análogos), gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH e análogos) têm proporcionado controle do desenvolvimento folicular e tempo de ovulação, durante a transição da primavera, ciclo estral e período pós-parto de éguas, esse recurso é usado nas éguas que estão ou entrarão no programa da TE para as mesmas possam ter uma terapia de apoio para apresentarem ciclicidade reprodutiva.

A ovulação da doadora e da receptora deverá ter uma janela de -1 (ovulação um dia antes da doadora) a + 3 (ovulação três dias após a doadora), não sendo as taxas de gestação entre elas diferentes neste intervalo (MCKINNON; SQUIRES, 2007). Entretanto, hoje sabemos que podemos utilizar receptoras que ovularam em até cinco dias após a doadora ou que tenham apresentado ovulação em até quatro dias antes do dia da coleta do

embrião, pois as receptoras já saíram do cio e possuem a cervix fechada, fator importantíssimo no momento da transferência do embrião para as éguas receptoras.

Vários protocolos são recomendados e o mais utilizado consiste na administração de progesterona de curta ação (150 mg) e de 17 β - Estradiol (10 mg), por 10 dias consecutivos, com uma aplicação de PGF2 α no 10º dia e uma de hCG (2.500 UI) quando um folículo de 35 mm for detectado. Com este protocolo, 70% das éguas ovulam entre 10 a 12 dias após a última injeção do esteroide (BRADECAMP, 2007). Porém o tamanho de folículo dominante mais utilizado é a partir de 30 mm, respondendo muito bem e ovulando em até 36 horas pós-aplicação.

Na sincronização empregada, monitora-se o crescimento folicular por ultrassonografia transretal e utiliza-se hCG, GnRH ou EPE. Para induzir ovulação nas éguas, são aplicados os hormônios indutores para ovularem em até 36 horas. O hCG é o hormônio mais utilizado para a indução da ovulação, porém, destaca-se que sucessivas aplicações de hCG induzem à formação de anticorpos, reduzindo a sua eficiência na reposta ovulatória (DUCHAMP et al., 1987). O acetato de deslorelina e o extrato de pituitária equina (EPE) são fármacos alternativos para sincronizar a ovulação, podendo ser utilizados em vários ciclos consecutivos, sem o inconveniente da formação de anticorpos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado através de dados coletados entre a estação de monta de 2001/02 e a estação de 2010/2011, em centrais de transferência de embrião nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia. As éguas doadoras e receptoras que participavam do programa de TE possuíam fichas individuais, nas quais os dados referentes à sua situação eram anotados como nome, raça, idade, situação reprodutiva, garanhão utilizado na inseminação, tipo de sêmen utilizado na inseminação (monta natural, sêmen afresco, resfriado ou congelado/descongelado), data da coleta, avaliação e transferência do embrião e o acompanhamento do desenvolvimento gestacional.

Foram utilizadas no programa de TE 150 éguas doadoras de 13 raças diferentes variando de 2 a 20 anos de idade e 362 éguas receptoras de 3 a 12 anos de 13 raças diferentes. As raças das éguas utilizadas no estudo foram Campolina, Mangalarga Marchador, Quarto de Milha, Árabe, Puro Sangue Inglês (PSI), Zangersheid, Sela Francesa, Holsteiner, Warmblood, Westphalian, Pampa, Bretão e sem raça definida (SRD). As éguas doadoras e receptoras do programa de TE apresentavam-se saudáveis, com estros regulares durante a estação de monta. Foram avaliadas por exames de ultrassonografia e palpação transretal durante o estro e no dia da coleta e transferência do embrião. Foram observadas as seguintes variáveis relacionadas aos garanhões: raça, idade e tipo de sêmen: monta natural, a fresco, refrigerado e congelado/descongelado. Foram utilizados 73 garanhões de idade de 2 a 23 anos, de raças diferentes (Campolina, Mangalarga Marchador, Pampa, Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês, Zangersheid, Sela Francesa, Holsteiner, Warmblood, Westphalian, Árabe). Os animais eram manejados de acordo com cada situação da central de TE que hospedavam as éguas, sendo todas éguas saudáveis. Alimentadas a pasto ou estabuladas com feno de Tifton (*Cynodon spp.*), tinham acesso à água, sal

mineral e ração. As éguas doadoras e receptoras eram examinadas diariamente por exames de palpação retal e ultrassonográfico que utilizavam sêmen fresco, refrigerado ou monta natural antes da ovulação. A égua doadora que era inseminada com sêmen congelado/descongelado era examinada a cada 6 horas, ocorrendo a inseminação após a ovulação, utilizando sêmen descongelado a 37°C por 1 minuto.

A inseminação das éguas era realizada por monta natural ou utilizando sêmen a fresco coletado em centrais que possuíam garanhões, ou com sêmen refrigerado transportado e sêmen congelado/descongelado.

O garanhão e as éguas eram higienizados antes do procedimento com água e sabão neutro e era inseminada artificialmente através da utilização de pipeta (Provar) adaptada em uma seringa plástica para deposição do sêmen no corpo uterino (sêmen fresco e refrigerado) e com o sêmen congelado/descongelado usava uma pipeta flexível de 65 cm (Minitub[®], Alemanha) que deposita o sêmen no corno ipsilateral do ovário que ovulou.

A coleta de embrião era realizada entre o 7° e 10° dias após a ovulação da doadora utilizando sonda coletora de silicone com até três litros de solução ringer com lactato, o embrião identificado e avaliado era transferido no mesmo dia.

Os embriões eram avaliados na placa de Petri em lupa estereoscópica pelo grau (1= ótimo, 2=bom, 3=regular, 4=ruim e 5=degenerado) e o estágio de desenvolvimento em: mórula, mórula compacta, blastocisto e blastocisto expandido.

A ovulação das receptoras era sincronizada de acordo com a ovulação da doadora (D0), sendo D-1 (1 dia antes da doadora) até D+ 5 (5 dias após a ovulação da doadora). A presença de fluido uterino, a morfologia do corpo lúteo, tônus uterino e da cérvix eram os critérios utilizados na seleção das receptoras. A prenhez era acompanhada a partir do 14° dia e era confirmada com 60 dias de

vida do embrião através de exame de ultrassonografia transretal. Após a coleta de embrião as éguas doadoras e receptoras recebiam uma dose de prostaglandina $PGF2\alpha$ intramuscular. A ovulação da doadora e receptora era induzida pela utilização de gonadotrofina coriônica humana (HCG) na dose de 2.000 UI endovenosa apresentando folículos acima de 35 mm de diâmetro.

7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises utilizaram o programa estatístico SAS[®] (Cary, NC-EUA). Para a dicotomização das covariáveis e criação de mais de duas classes, foi utilizado o procedimento UNIVARIATE, pelo qual foram analisadas as distribuições de frequência e realizados os testes de normalidade Smirnov-Kolmorov.

Os efeitos da classe de idade da doadora (≤ 7 anos, $>7 < 12$ anos e ≥ 12 anos), da idade do garanhão (< 6 anos VS. ≥ 6 anos), da indução da ovulação (hCG VS. Ovulação natural) e do diâmetro do folículo dominante pré-ovulatório (< 35 mm VS. ≥ 35 mm) sobre o resultado do lavado (positivo- com embrião VS negativo- sem embrião) e a proporção de receptoras gestantes foram analisados pelo teste do qui-quadrado no procedimento GENMOD, com distribuição binomial.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Efeito do grupamento racial da doadora sobre a taxa de gestação das receptoras

A taxa de gestação foi maior ($P= 0,05$) para as receptoras que receberam embriões das doadoras da raça Campolina comparada às demais (Tabela 3 e Figura 1). Na literatura, há registros de variações na taxa de gestação de diferentes raças de receptoras variando de 40,5% e 62,2 % (CAMARGO et al., 2013). Na raça Campolina, não há relatos sobre as taxas de gestação de éguas receptoras como observadas neste trabalho. Relato sobre as demais raças apontam para índices semelhantes àqueles deste estudo. É possível que práticas de manejo mais adequadas à raça Campolina, devido ao maior número de animais em relação às demais, podem ter contribuído como fator diferencial entre raças. Um aspecto que deve ser observado com relação à raça é o melhoramento praticado com o objetivo de melhorar a fertilidade. Na raça Campolina, o tipo de sêmen utilizado, monta natural ou inseminação artificial com sêmen fresco ou refrigerado, mostrou uma maior taxa de coleta positiva de embrião e as demais raças (classe 1) o uso do sêmen refrigerado e/ou congelado, obteve taxa de coletas negativas por serem os mais utilizados (Tabela 5 e Figura 6). Como o estudo trata da avaliação de dados de campo, as éguas Campolina, receberam maior porcentagem (32,96% VS 6,92%) de sêmen fresco em relação às demais, podendo os embriões advindos dessa origem, terem maior capacidade de sobrevivência, favorecendo a raça em questão. A presença de um garanhão na central de TE da raça campolina facilitava a coleta e o uso do sêmen a fresco, de acordo com Squires, McCue e Vanderwall (1999) que relatam que o uso de sêmen fresco tem maior taxa de coleta positiva de embrião em relação ao refrigerado e/ou congelado/descongelado e as centrais de TE das demais raças

necessitavam do uso de sêmen refrigerado e/ou congelado por não haver a presença do garanhão. A perda embrionária em éguas receptoras pode ocorrer por não apresentar um ambiente uterino adequado no momento da transferência do embrião, não sendo detectável pelo exame de palpação manual retal e/ou ultrassonográfico, como inflamação uterina aguda, causando dificuldade para a motilidade embrionária entre o 10° e 16° dia e, conseqüentemente, não havendo reconhecimento da presença do embrião pelo útero da receptora (GAIVÃO; STOUT, 2007; GINTHER et al., 1984, 1985).

Tabela 3 Efeito do grupamento racial da doadora sobre as taxas de gestação de receptoras de embrião

Classe	Gestação				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
1	19	57,58	14	42,42	33
2	91	73,98	32	26,02	123
Total	110		46		156

P= 0,05

Classe 1- Demais raças.

Classe 2- Campolina.

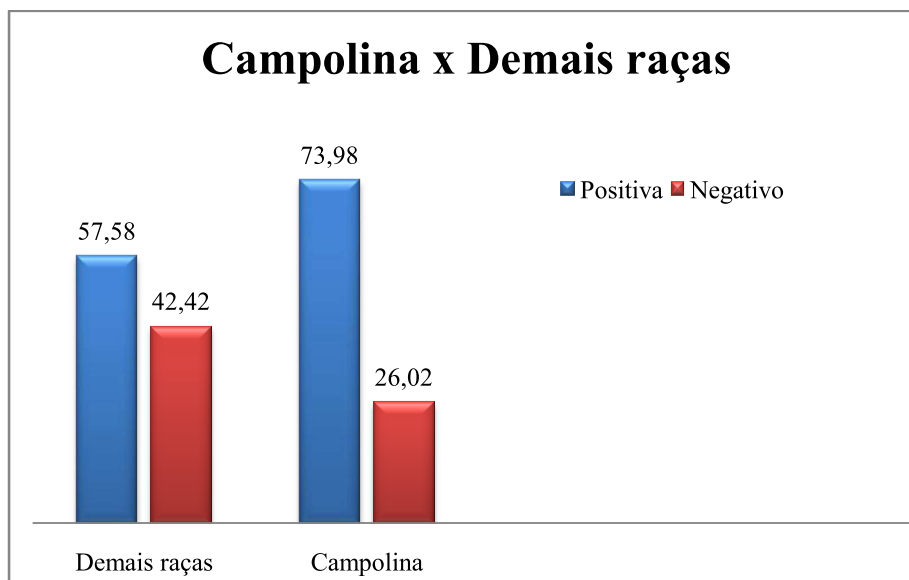


Figura 1 Efeito do grupamento racial da doadora sobre as taxas de gestação de receptoras de embrião

8.2 Efeito da idade da doadora sobre a porcentagem de coletas positivas

Foram estudadas 349 coletas de embrião de 150 doadoras de raças diferentes que foram divididas em três classes de acordo com a idade (Figura 2): Classe 1: ≤ 7 anos, classe 2: > 7 anos, < 12 anos e classe 3: ≥ 12 anos. A taxa de gestação foi semelhante ($P=0,4511$) entre as classes de idade das doadoras (Tabela 4).

As éguas idosas podem ser mais valiosas devido às provas já prestadas e comprovadas, sendo comum encontrar éguas com mais de 20anos em programas de TE (BALL, 2000). Éguas jovens (≤ 7 anos) são exploradas na reprodução de TE porque estão no início da carreira competitiva em pistas e há necessidade de se ter progênie para comprovar que a égua doadora possa acrescentar valores zootécnicos aos seus descendentes melhorando os potros através da escolha do melhor cruzamento com garanhões consagrados. Quando estão na fase de 7 anos

a 12 são consideradas éguas adultas e estão no momento de maior capacidade reprodutiva gerando óvulos para serem fecundados com maior taxa de viabilidade.

O autor McCue (2010) relata que taxas de recuperação de embrião são afetadas pela idade e fertilidade da doadora, a qualidade do sêmen do macho, o dia da coleta, o número de ovulações e experiência clínica. Segundo o mesmo autor a maior porcentagem de embriões é recuperada de éguas com idade <10 anos do que de éguas com idade >15 anos. A idade da égua doadora afeta a taxa de recuperação de embrião, com um ou mais embriões recuperados, 144 de 252 lavados (57,1%) de éguas ≤ 15 anos de idade e 93 de 236 lavados (39,4%) de éguas >15 anos de idade.

Éguas idosas quando entram no programa de TE têm sua descendência já comprovada, ou seja, sua progênie possui bons resultados no trabalho, esporte ou lazer. Porém com o passar dos anos estes animais começam a apresentar distúrbios de ovulação, maturação oocitária e algumas éguas podem apresentar endometrite crônica. Diminuindo a taxa de recuperação de embrião, consequentemente, reduzindo a taxa de prenhez no programa de TE.

Embora os estudos anteriores não demonstrassem um efeito de transporte em taxas de prenhez (BAUCUS et al., 1990; BERGHOLD; MOSTL; AURICH, 2007), é bem reconhecido que o transporte causa aumento nas concentrações de cortisol plasmático em cavalos, mesmo quando as distâncias de viagem são de curta duração (FAZIO et al., 2013).

A fertilidade da égua doadora, como um dos fatores limitantes das taxas de recuperação de embriões, é afetada pela forma como são manejadas as éguas em programas de TE (MCCUE, 2010). A rotina de treinamentos e deslocamentos em grandes distâncias pode contribuir para uma queda na produção de embrião pelas éguas doadoras por vários fatores como aumento da temperatura corporal, a não adaptação a ambientes estranhos ao de sua rotina e

estresse da viagem. Segundo Trischner, Niezgoda e Tischner (2006), as respostas ao estresse em éguas para transporte medidos em diferentes fases do ciclo estral e de prenhez pela variação máxima de noradrenalina, adrenalina e cortisol, eram mostradas em éguas em diestro e anestro durante o inverno. Essas éguas doadoras senis devem possuir manejo mais adequado evitando o estresse do ambiente, permanecendo mais tempo soltas em piquetes ou, de preferência, a pasto, com nutrição específica para animais senis. Evitar aglomeração de muitas éguas, pois pode haver disputa pela hierarquia na manada, onde normalmente há uma égua alfa que é a líder.

Tabela 4 Efeito da classe de idade da doadora sobre a taxa de gestação após TE

Classe	Coleta de Embrião				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
≤7 anos	97	50,52	95	49,48	192
7 a 12 anos	46	58,97	32	41,03	78
≤12 anos	42	53,16	37	46,84	79
Total	185		164		349

P=0,4511

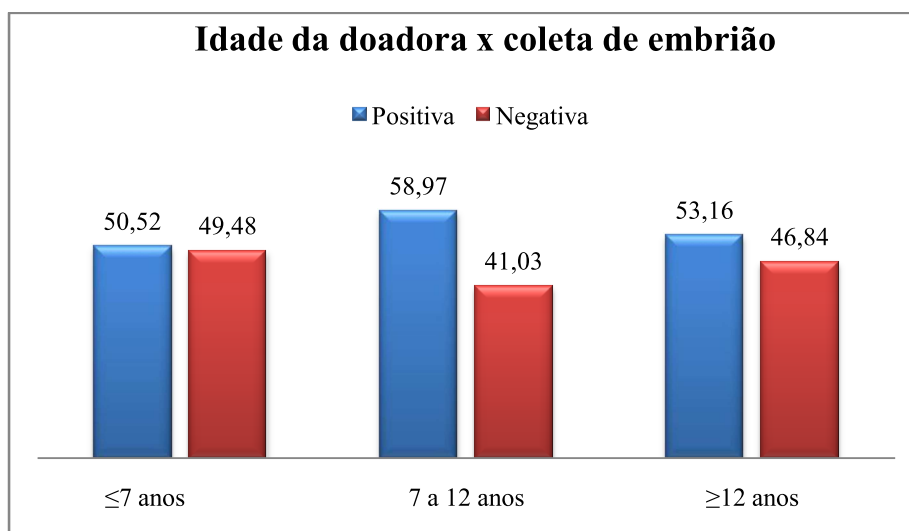


Figura 2 Efeito da classe de idade da doadora sobre a taxa de gestação após TE

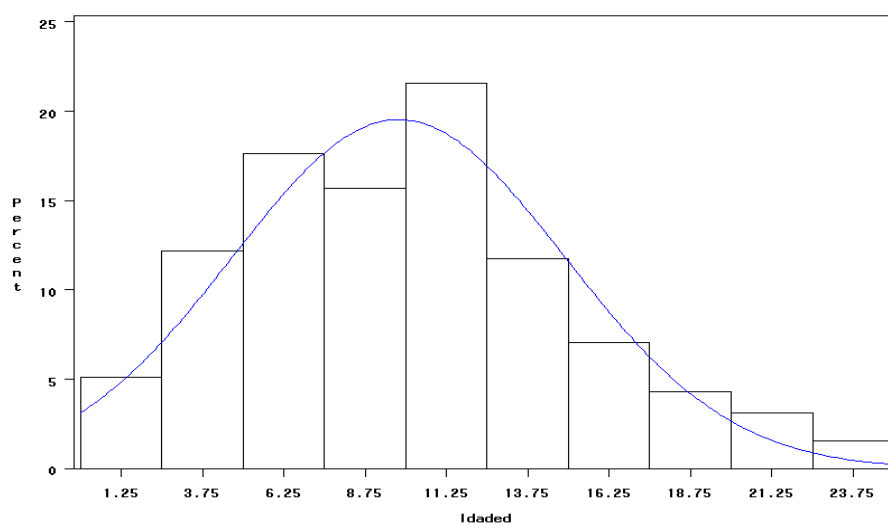


Figura 3 Idade das éguas doadoras utilizadas no estudo

8.3 Idade garanhão x prenhez

Foram estudados 73 garanhões de idades entre 2 e 22 anos (Figura 5) de 10 raças diferentes, utilizados em monta natural, inseminação artificial com sêmen a fresco, refrigerado e congelado/descongelado. Os garanhões foram divididos em classe de idade na TE x prenhez, a classe 1 (< 6 anos, n=111) e classe 2 (\geq 6 anos, n= 63), não havendo efeito ($P= 0,4355$) sobre a prenhez na TE (Tabela 5 e Figura 4).

A presença do garanhão na central de TE favorece a disponibilidade de se ter sêmen de boa qualidade devido à facilidade para utilização da monta natural ou sêmen a fresco, já a utilização do sêmen refrigerado necessita da entrega da dose inseminante no dia programado para ovulação da égua doadora, mas ocorre queda na qualidade do sêmen.

Em geral, garanhões com menos de três ou mais de 14 anos apresentam baixa qualidade seminal, como consequência da variação fisiológica no funcionamento dos túbulos seminíferos (CHENIER; ESTRADA; KOENIG, 2007). Os testículos do garanhão desenvolvem-se até, aproximadamente, seis anos de idade, fase que coincide com a estabilização da produção espermática.

Já garanhões velhos são mais propensos a produzirem maiores porcentagens de espermatozoides com anomalias morfológicas em relação a garanhões adultos, refletindo na taxa de gestação por ciclo que é, aproximadamente, 8% menor do que a de animais com idades entre 3 e 14 anos (BUITEN; WESTERS; COLENBRANDER, 2003).

O envelhecimento do garanhão é semelhante ao que ocorre com o avançar da idade na égua (oócito de baixa qualidade), pode acarretar maior número de aberrações cromossômicas e desordens genéticas nas células espermáticas (HERMANN et al., 2000). Estudos sugerem que a causa da falha reprodutiva nos garanhões tem início precocemente, em nível testicular e se

propaga para as duas áreas do cérebro envolvidas na regulação da reprodução, hipotálamo, na região produtora de GnRH e na adenohipófise, região produtora de gonadotrofinas (ROSER, 2000), demonstrando o acometimento geral da função endócrina ligada ao eixo reprodutivo em animais senis (SOUZA; BORGES; SILVA FILHO, 2008). Os garanhões têm uma vida bem controlada em centrais e haras quanto à qualidade da nutrição, sanidade e frequência de coleta de sêmen durante a estação de monta.

Por não haver seleção de garanhão pela aptidão qualidade sêmen congelado/descongelado, não se tem disponível no mercado doses do sêmen de garanhões de alto desempenho nas pistas com a qualidade equivalente no congelamento do seu sêmen.

Tabela 5 Efeito da classe de idade do garanhão sobre a taxa de prenhez da receptora

Classe	Gestação				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
< 6 anos	78	70,27	33	29,73	111
≥6 anos	47	75,81	15	24,19	62
Total	125		48		173

P= 0,4355

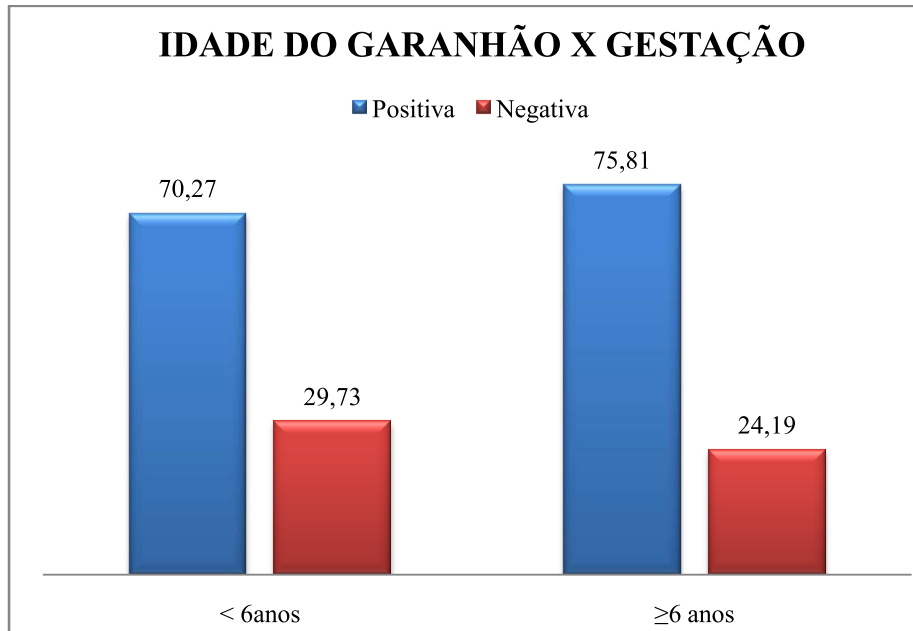


Figura 4 Efeito da classe de idade do garanhão sobre a taxa de prenhez da receptora

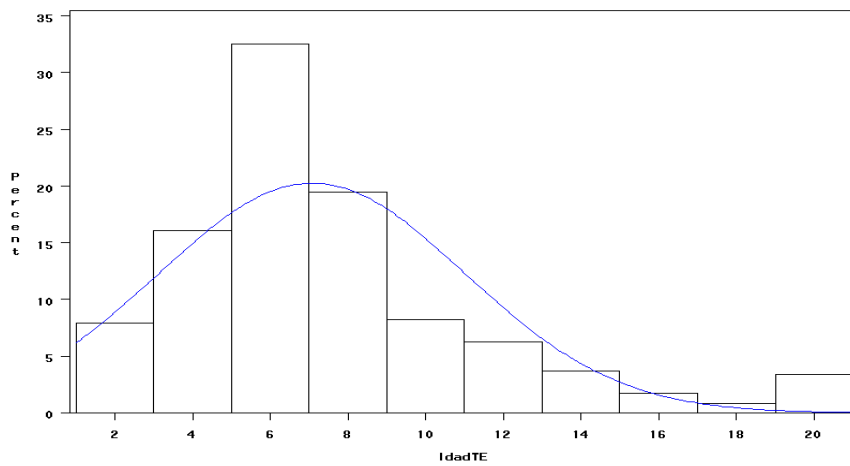


Figura 5 Distribuição de frequência da idade dos garanhões utilizados no estudo

8.4 Tipo de sêmen utilizado na inseminação das doadoras

Foram analisados quatro tipos diferentes de sêmen no programa de transferência de embrião divididos em classe 1= monta natural, classe 2= sêmen a fresco, classe 3= refrigerado e classe 4= congelado/descongelado. A proporção de lavados positivos foi maior ($P=0,01$) para a classe de sêmen 2 (sêmen a fresco) em relação às demais (Tabela 5 e Figura 6).

O sêmen congelado/descongelado causa queda na taxa de recuperação de embrião, mostrando que a qualidade desse tipo de sêmen é desfavorável no programa de TE. No controle reprodutivo feito com precisão a cada seis horas, as éguas apresentam uma taxa de prenhez média, por ciclo com sêmen congelado, de cerca de 30-40% e com 1,8-2 ciclos por gestação (SAMPER et al., 2001). As lesões causadas nas membranas dos espermatozoides durante o processo de resfriamento é menos extensa do que na criopreservação, porque as membranas dos espermatozoides resfriados não estão expostas ao estresse osmótico, toxicidade do crioprotetor e à formação de cristais de gelo intracelular, que ocorrem durante o congelamento e descongelamento (WATSON, 2000).

A fertilidade de sêmen refrigerado inseminado intrauterino é semelhante ou ligeiramente inferior ao sêmen fresco (JASKO, 1992). Isso pode ser devido à ausência de seleção de garanhões aptos a produzir um sêmen de boa qualidade para o processo de congelamento/descongelamento.

Todas as éguas experimentam uma resposta inflamatória fisiológica dentro do útero após a inseminação e algumas éguas apresentam reação inflamatória ao sêmen congelado/descongelado em resposta para os espermatozoides e esta não é dependente do tipo de extensor, ou qualquer um dos seus componentes, tais como gema de ovo, proteínas do leite, ou glicerol (KOTILANNEM; HUHTINEN; KATILA, 1994; MCKINNON et al., 1993). A

resposta inflamatória uterina é modulada pelo plasma seminal. A criopreservação de sêmen envolve a remoção da maior parte do plasma seminal e este talvez agrave a resposta inflamatória transitória na égua.

O uso de sêmen refrigerado tem se mostrado eficiente em relação ao fresco porque devido à logística entre a coleta e o recebimento na central de TE passam-se poucas horas, ocorrendo, às vezes, a coleta na parte da manhã, o recebimento e inseminação da égua doadora no mesmo dia à tarde. Os índices na utilização do sêmen de garanhão estão em torno de 60-77% para o fresco, 44% para refrigerados e 46% para sêmen congelado (SQUIRES, 2006), porém, os dados encontrados nesse estudo mostram valores muito próximos entre os sêmen a fresco, resfriado e a monta natural.

Tabela 6 Efeito do tipo de sêmen sobre a porcentagem de lavados positivos (coleta resultante em embrião)

Classes	Coleta de Embrião				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
1	23	54,76	19	45,24	42
2	82	59,85	55	40,15	137
3	69	51,49	65	48,51	134
4	10	28,57	25	71,43	35
Total	184		164		348

P=0,0110.

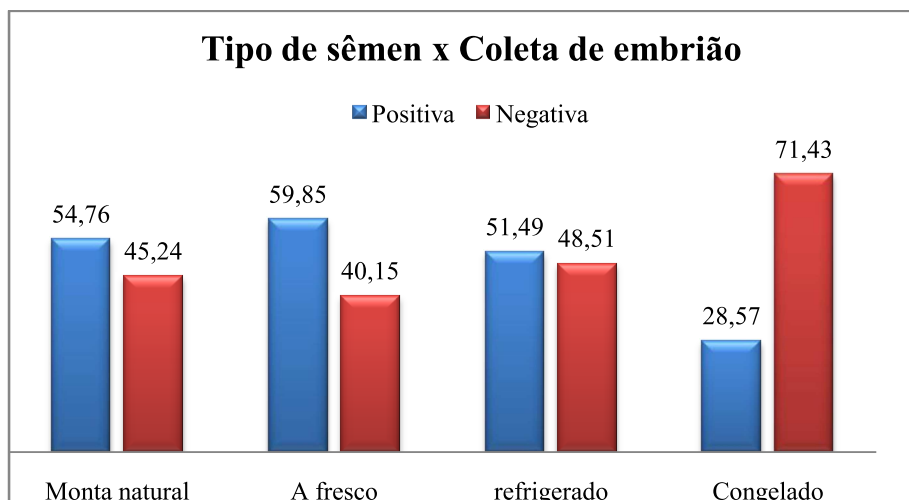


Figura 6 Efeito do tipo de sêmen sobre a porcentagem de lavados positivos (coleta resultante em embrião)

8.5 Indução da ovulação x prenhez

As éguas receptoras foram separadas em classe 0 = sem indução e classe 1 = com indução. A indução da ovulação não influenciou ($P= 0.6937$) as taxas de gestação das éguas receptoras (Tabela 6 e Figura 7).

As éguas receptoras utilizadas em programas de TE foram examinadas durante o estro e no dia da coleta e da transferência do embrião para avaliar a detecção do corpo lúteo visível, presença de líquido uterino, cistos e dobras endometriais e avaliação da parede uterina. Estas análises combinadas com o tônus uterino e cervical determinados pela palpação retal são os principais critérios utilizados para a seleção da receptora (SQUIRES; MCKINNON; SHILDER, 1988).

Este trabalho comparou os dados na utilização de hormônio para a indução da ovulação das éguas receptoras com a prenhez na TE. A indução da ovulação é importante devido à incronização da égua receptora com a doadora

para que estejam pelo menos duas éguas receptoras ovuladas no dia da coleta de embrião. Perla et al. (2007) observaram que a aplicação de hCG em éguas receptoras, para a indução de ovulação, no dia seguinte à ovulação (d1) e no dia da transferência (d5 a d8), promoveram o aumento na concentração de progesterona, com uma tendência de éguas induzidas com melhores taxas de prenhez 81,3% e sem indução 55,6% ($P>0,05$) aos 16 dias.

Com base nos dados, este estudo mostrou que a sincronia da ovulação claramente definida no intervalo de 0-4 dias foi suficiente para maximizar a taxa de prenhez quando acompanhados por um excelente tônus uterino e cervical e textura homogênea e compacta do corpo lúteo e o trabalho de Resende (2009), resultou em que éguas receptoras que receberam hCG apresentaram melhores taxas de gestação (88,24%) quando comparadas às receptoras que não receberam este hormônio (71,76%).

A indução da ovulação na égua doadora também é indispensável porque na utilização do sêmen refrigerado transportado, em que o garanhão não se encontra na Central, há uma forte dependência de fatores de logística como transporte aéreo e rodoviário que não entregam carga no fim de semana, dias específicos da semana de coleta de sêmen do garanhão, cota do número de doses disponíveis no dia da coleta para envio do sêmen, necessitando da indução da ovulação para assegurar o menor intervalo entre a inseminação e a ovulação.

A aplicação de hormônio de indução da ovulação na utilização do sêmen congelado/descongelado é necessária, porque o procedimento de avaliar a égua doadora por exame ultrassonográfico a cada seis horas demanda mão de obra contínua diuturnamente durante o estro. A indução aumenta o número de ovulações em até 48 horas após a aplicação. Sendo assim, a ovulação da égua receptora ocorre logo após a da égua doadora, evitando o risco de não haver receptoras sincronizadas no dia da coleta do embrião.

Tabela 7 Efeito da indução da ovulação éguas receptoras sobre a taxa de gestação

Classe	Gestação				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
Sem indução	77	73,33	28	26,67	105
Com indução	48	70,59	20	29,41	68
Total	125		48		173

P= 0.6937.

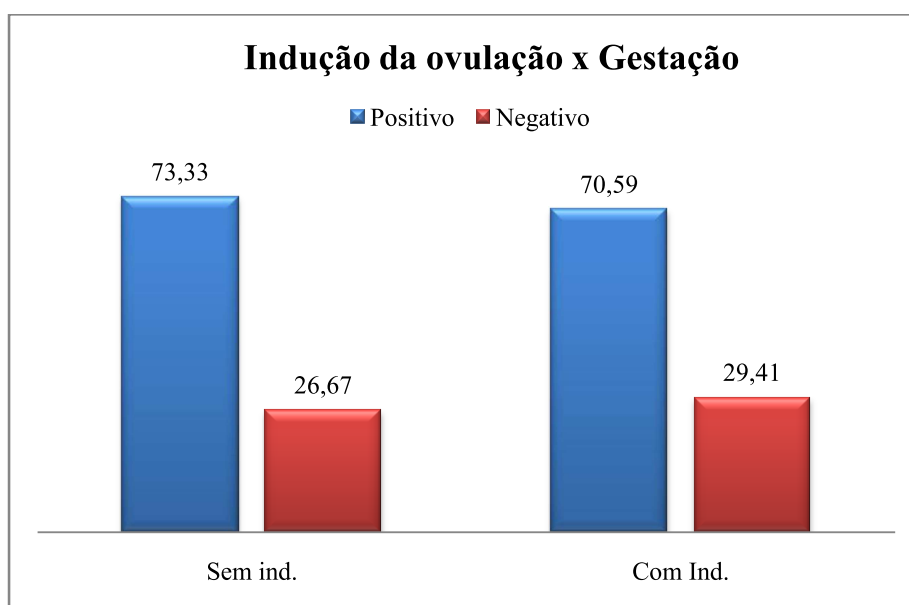


Figura 7 Efeito da indução da ovulação éguas receptoras sobre a taxa de gestação

8.6 Diâmetro do folículo dominante das éguas doadoras e proporção de lavados positivos

O efeito da classe do diâmetro do folículo dominante nas éguas doadoras foi avaliado com respeito à proporção de lavados positivos. A classe 1 foi constituída de $FD < 35$ mm de diâmetro e a classe 2 para os folículos ≥ 35 mm. As taxas de coletas positivas não diferiram ($P=0,07$) entre as classes de diâmetro do FD das doadoras (Tabela 9 e Figura 8).

A definição do folículo dominante é um processo contínuo de crescimento e regressão folicular que ocorre nos ovários das éguas e sofre influência diretamente pelo fotoperiodismo, nutrição, temperatura e estresse. O folículo pré-ovulatório dominante em éguas é conhecido por atingir cerca de 40 mm de diâmetro antes da ovulação com o folículo subordinado mais próximo normalmente ser pelo menos > 15 mm segundo Palmer e Driancourt (1980) e Pierson e Ginther (1985). Divergindo do presente estudo em que coletas de embrião positivas (185/349) não diferiram ($P=0,07$) entre as classes de diâmetro do FD das éguas doadoras, ou seja, folículos dominantes com diâmetro < 35 mm (100/204) e ≥ 35 mm (85/145) converteram-se em folículos dominantes e ovularam resultando em lavados positivos.

As categorias de tamanhos dos folículos dominantes avaliados a partir de 20 mm até 50 mm tiveram a porcentagem de coletas positivas mais altas ($P=0,03$) que os folículos dominantes de 30 mm e 40 mm em relação aos demais tamanhos. Goudet et al. (1997) pesquisaram oócitos equinos recuperados “in vivo”, Brück et al. (1996) e Del Campo et al. (1995) e com oócitos equinos de ovários extirpados demonstraram uma taxa de maturação menor em ovócitos de folículos pequenos ($<$ de 10 mm de diâmetro) com a sugestão que este foi associado a uma maior prevalência de atresia.

O trabalho de Hinrichs e Schmidt (2000), indicou que folículos equinos precisam ser > 20 mm de diâmetro para que seus oócitos possam ter atingido a competência meiótica e folículos < 20 mm, durante o período pré-ovulatório, são improváveis de conter oócitos viáveis, a menos que emana de uma onda folicular posterior. No entanto, os folículos < 10 milímetros são muito pequenos para ser pré-ovulatório na égua e por isso este trabalho realmente não lança luz sobre o efeito do tamanho do folículo pré-ovulatório na viabilidade dos oócitos.

Tabela 8 Efeito da classe de diâmetro do folículo dominante da doadora sobre a proporção de lavados positivos

Classe	Lavado				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
< 35mm	100	49,02	104	50,98	204
≥ 35 mm	85	58,62	60	41,38	145
Total	185		164		349

P=0,0766.

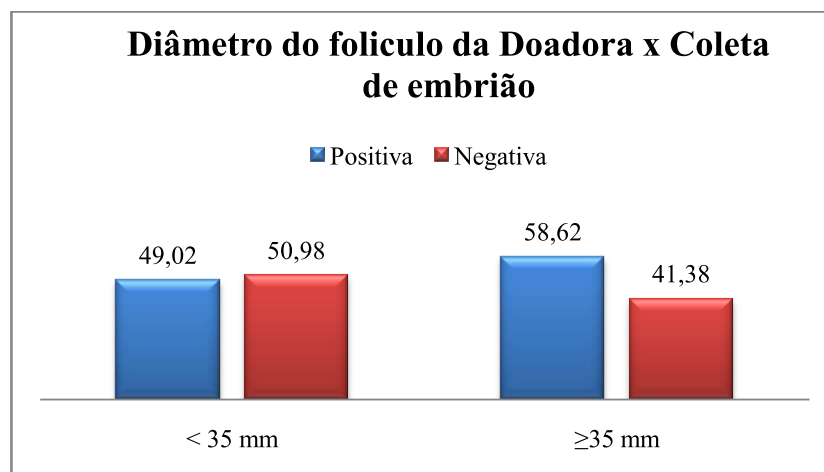


Figura 8 Efeito da classe de diâmetro do folículo dominante da doadora sobre a proporção de lavados positivos

A porcentagem de coletas positivas foi mais alta ($P=0,03$) nos diâmetros 30 e 40 mm em relação às demais (Tabela 8 e Figura 9).

Tabela 9 Diâmetro de folículo dominante de éguas doadoras e proporção de lavados positivos

Classe (mm)	Coleta				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
20	1	100	0	0	1
25	0	0	1	100	1
30	24	64,86	13	35,14	37
35	75	45,73	89	54,27	164
40	73	62,39	44	37,61	117
45	11	40,74	16	59,26	27
50	1	100	0	0	1
total	185		163		348

$P=0,0270$

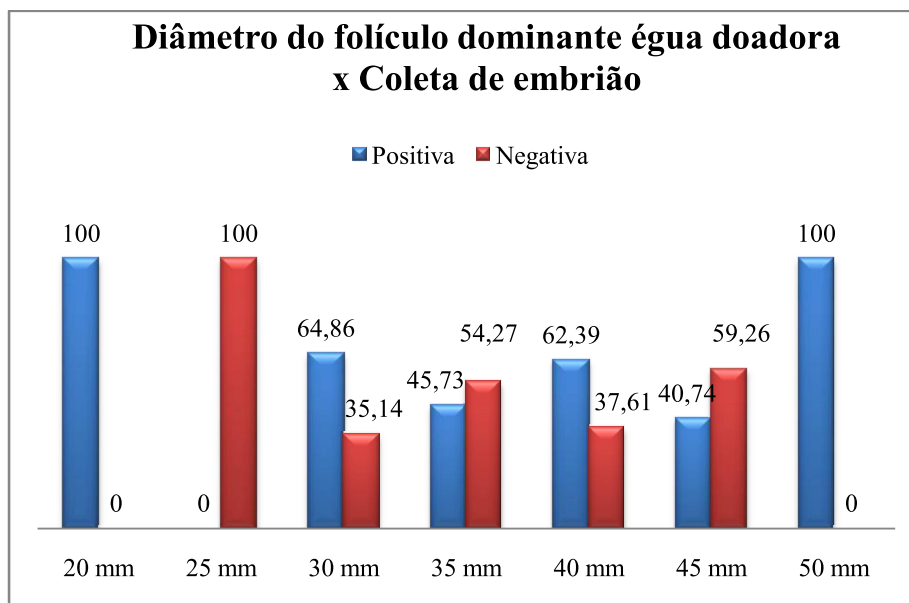


Figura 9 Diâmetro de folículo dominante de éguas doadoras e proporção de lavados positivos

8.7 Diâmetro do folículo dominante de éguas receptoras e proporção de receptoras gestantes

A proporção de receptoras gestante foi semelhante ($P=0,8$) entre as classes de diâmetro do FD das receptoras (Tabela 9 e Figura 10).

Ao analisar a proporção de éguas receptoras gestante entre as classes 1 e 2 de diâmetro do FD apresentou valores semelhante ($P=0,8$) para os diâmetros < 35 mm (73,33%) e ≥ 35 mm (71,68%) não indicando que haja diferença no tamanho do folículo dominante ovulado com a taxa de gestação das receptoras em TE. Em contraste, o trabalho de Resende (2009), resultou em que folículo pré-ovulatório com diâmetro superior ou igual a 40 mm tiveram melhores taxas de gestação, sendo estatisticamente significativas, ($P<0,0116$).

O estrógeno produzido em folículos ≥ 25 mm de diâmetro, durante a fase folicular, mantém a concentração elevada até a ovulação da égua (NEWCOMBE, 2007; PIERSON, 1993), estimulando a formação de receptores para progesterona no aparelho genital feminino em diversas espécies (VALLE et al., 2007), porém o folículo ovariano equino mostra-se dependente do grau de vascularização para a produção de esteroides e não do seu diâmetro de acordo com Young Lai (1971). Segundo os autores Borges et al. (2013), o estudo realizado apresentou uma taxa de concepção geral aos 15 dias de 85,4%, maior que o presente estudo, porém, foi próxima aos valores descritos de 65 a 75% (SQUIRES et al., 1999), e com a raça Mangalarga Marchador de 73,4% (LOPES et al., 2011) e 74,9% (FLEURY et al., 2001).

Segundo Arruda et al. (2001) vários são os fatores que podem interferir nos índices de prenhez das receptoras após a TE, como a sincronia da ovulação entre doadora e receptora, a qualidade dos embriões transferidos, o método de transferência de embriões, o grau de alterações patológicas do endométrio uterino de receptoras, o tônus uterino e cervical e a funcionalidade da glândula luteínica da receptora. Essas análises em termos práticos são utilizadas no momento da avaliação e escolha da receptora no programa de TE. É necessária uma ampliação nos estudos das características citadas para que se possa desvendar qual ou quais são os fatores que realmente podem influenciar na taxa de gestação das receptoras.

Tabela 10 Efeito da classe de diâmetro do folículo dominante da receptora em relação à gestação

Classe	Gestação				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
< 35mm	44	73,33	16	26,67	60
≥ 35mm	81	71,68	32	28,32	113
Total	125		48		173

P=0.8173

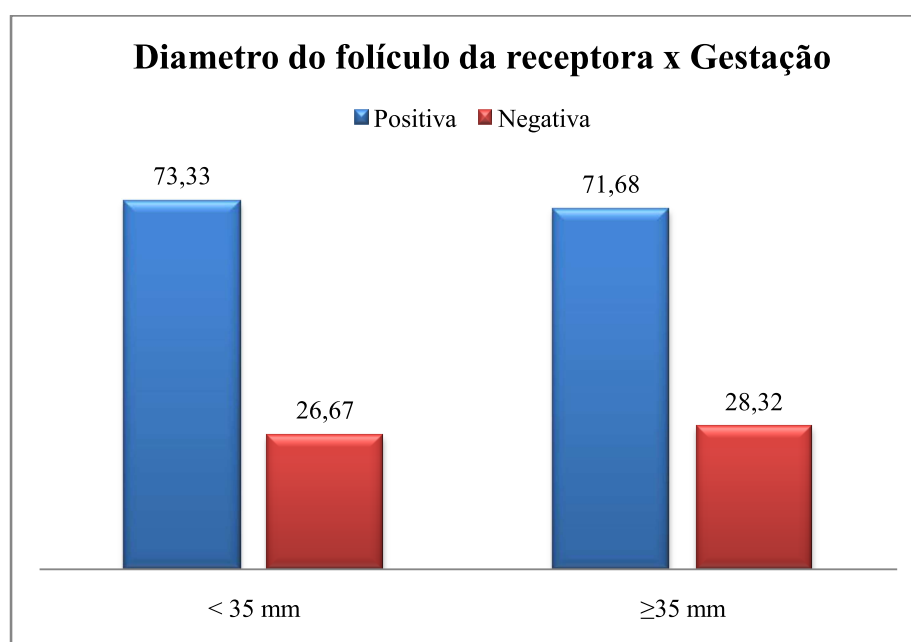


Figura 10 Efeito da classe do folículo dominante da receptora em relação à gestação

Os folículos dominantes das éguas receptoras foram separados em classes medindo a partir de 30 mm até 45 mm. Não houve diferença (P=0,58) para os tamanhos do FD das receptoras mostrando que esse não é o fator responsável pela confirmação da gestação aos 60 dias.

Não houve diferença ($P=0,58$) na proporção de éguas gestantes entre os diâmetros do FD das receptoras (Tabela 10 e Figura 11). As éguas receptoras eram controladas diariamente e seus folículos mensurados por exames ultrassonográficos retal, acompanhando-o do crescimento até a ovulação. O corpo lúteo resultante da ovulação era avaliado no dia da transferência do embrião quanto ao tamanho e ecogenicidade e concluindo com a confirmação da gestação com 60 dias de vida do embrião.

Tabela 11 Diâmetros dos folículos dominantes das receptoras sobre a taxa de gestação

Classe	Coletas				Total
	Positiva	(%)	Negativa	(%)	
30mm	5	62,50	3	37,50	8
35mm	39	75	13	25	52
40 mm	60	68,97	27	31,03	87
45 mm	21	80,77	5	19,23	26
Total	125		48		173

$P= 0,5755$

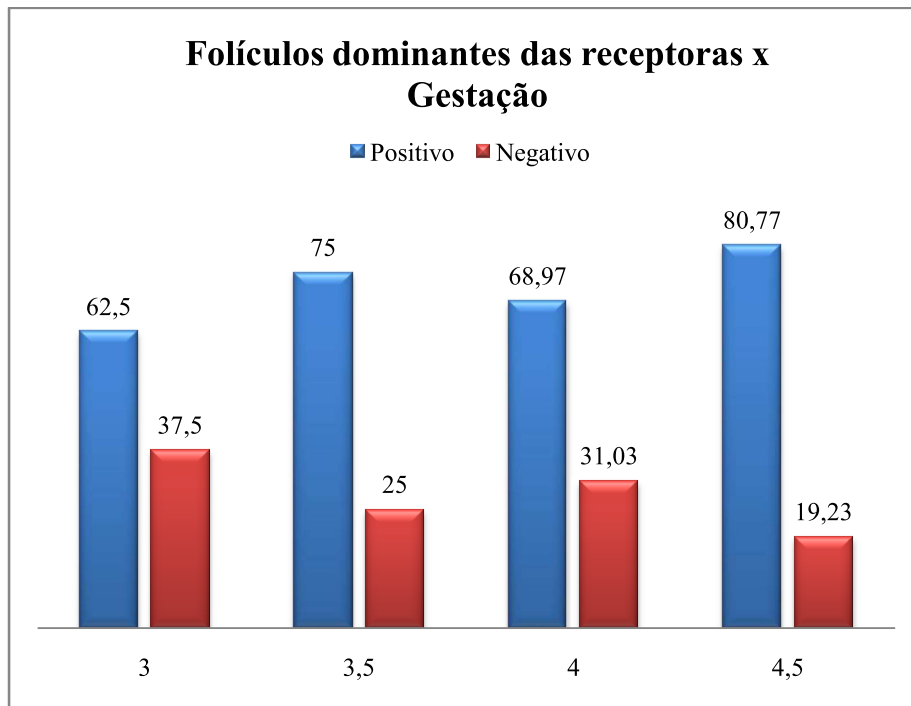


Figura 11 Diâmetros dos folículos dominantes das receptoras sobre a taxa de gestação

9 CONCLUSÃO

A raça Campolina, devido à seleção de éguas doadoras de fertilidade comprovada, mostrou uma taxa de prenhez maior que as demais raças agrupadas, pela logística de poder utilizar o garanhão em centrais de transferência de embrião, facilitando a monta natural e/ou à utilização do sêmen a fresco e a entrega do sêmen resfriado no dia da inseminação artificial programada quando comparado com o sêmen congelado/descongelado.

Éguas doadoras jovens com a idade abaixo de sete anos possuem fertilidade igual quando comparadas com éguas entre 7 e 12 anos e acima de 12 anos não havendo queda na taxa de coleta de embrião.

Garanhões acima de seis anos não apresentam queda de fertilidade quando comparados com garanhões abaixo de seis anos na utilização em programas de TE de inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado, congelado e/ou descongelado e a monta natural.

A utilização do sêmen congelado/descongelado apresentou redução na taxa de coleta de embrião quando comparado ao fresco, refrigerado e a monta natural.

A indução da ovulação se faz necessária somente quando há utilização de sêmen refrigerado devido à logística de entrega da dose do sêmen no dia programado ou pela garantia da ovulação da égua doadora na utilização da inseminação artificial com sêmen congelado/descongelado.

O tamanho do folículo dominante influi diretamente na taxa de coleta, transferência de embrião e gestação de éguas receptoras.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Organização interna da célula: estrutura da membrana. In: _____. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 583-595.
- ALEXANDER, S. L.; IRVINE, C. H. G. Control of the onset of the breeding season in the mare and its artificial regulation by progesterone treatment. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 307-318, 1991. Supplement.
- ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. **Acta Scientia e Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, p. s207-s214, 2008. Suplemento 2.
- ALONSO, M. A. et al. Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. **Acta Scientia e Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 204, 2005. Suplemento 1.
- ALVARENGA, M. A. et al. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121, p. 186-187, 2010. Supplement.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Sperm function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 735-736.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Practice**, New York, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- ARRUDA, R. P. et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultrassom e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 233-239, Jan. 2001.
- AURICH, J. E. et al. Endogenous opioids and reproductive functions in the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1/4, p. 119-129, Apr. 1996.

BALL, B. Reduced reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. In: _____. **Recent advance in equine theriogenology**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Reproduction_Ball/embryonic_loss_ball/chapter.asp?LA=1>. Acesso em: 10 out. 2014.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa University, 1989. 285 p.

BAUCUS, K. L. et al. Effect of transportation on the estrous cycle and concentrations of hormones in mares. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 419-426, Feb. 1990.

BERGFELT, D. R. Estrous synchronization. In: SAMPER, J. C. (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 165-177.

BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 24, n. 3/4, p. 193-204, Feb. 1991.

BERGHOLD, P.; MOSTL, E.; AURICH, C. Effects of reproductive status and management on cortisol secretion and fertility of oestrous horse mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 102, n. 3/4, p. 276-285, Dec. 2007.

BIGGERS, J. D.; HEAPE, W. FRS: a pioneer in reproductive biology: centenary of his embryo transfer experiments. **Journal of Reproductive and Fertility**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 173-186, Sept. 1991.

BORGES, L. M. et al. Taxas de perda gestacional até 60 dias são afetadas por características cíclicas da égua receptora de embrião Mangalarga Marchador. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 397-403, 2013.

BOYLE, M. S. et al. The effects of continuous treatment of stallions with high levels of a potent GnRH analogue. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 169-182, 1991. Supplement.

BRADECAMP, E.A. Estrous synchronization. In: SAMPER, J.C.; PYCOOK, J.F.; MCKINNON, A. O. (Ed.). **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Elsevier, 2007. p. 22-25.

BRAUN, J. et al. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 101, n. 8, p. 319-322, 1994.

BRINSKO, P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, Mar. 2005.

BRUCK, I. et al. *In vitro* maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 46, n. 1, p. 75-84, July 1996.

BUITEN, A. van; WESTERS, P.; COLENBRANDER, B. Male, female and management risk factors for non-return to service in Dutch mares. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 17-26, 2003.

CAMARGO, C. E. et al. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian jumper horse breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, Fordham, v. 33, n. 11, p. 1-6, Nov. 2013.

CARNEVALE, E.M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 54, n. 6, p. 965-979, Oct. 2000.

CHENIER, T.S.; ESTRADA, A.T.; KOENIG, J.B. Theriogenology question of the Month. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 230, n. 10, p. 1469-1472, 2007.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COTGRAVE, I.A.; MOLDEUS, P.; ORRENIUS, S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.28, p.189-212, 1988.

CROWELL-DAVIS, S.L. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, New York, v. 52, n. 1, p.12-17, June 2007.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 61, n. 1, p. 7-11, May 2003.

DAELS, P. Embryo transfer tips and tricks. In: EUROPEAN VETERINARY CONFERENCE, 5., 2007, Amsterdam. **Proceedings...**Amsterdam: IVIS, 2007. p. 213-215.

DEL CAMPO, M. R. et al. Morphology and location of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 43, n. 3, p. 533-542, Feb. 1995.

DOUGLAS, R.H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 11, p. 33-36, 1979.

DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. Characteristics and fertility of stallion semen. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 1-8, 1982. Supplement.

DRIANCOURT, M.A.; PALMER, E. Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 283-291, 1982.

DUCHAMP, G. et al. Alternative solutions to HCG induction of the ovulation in the mare. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 221-228, 1987. Supplement.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2nded. New York: Raven, 1994. p. 29-77.

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

FAZIO, E. et al. Comparative endocrinological responses to short transportation of equidae (equus asinus and equus caballus). **Animal Science Journal**, Berlin, v. 84, n. 3, p. 258-263, Mar. 2013.

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

FLEURY, J. J. et al. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

FLEURY, J.J. et al. Transferência de embriões em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, p. 485-487, 1987.

GAIVÃO, M.M.F.; STOUT, T.A.E. Maternal recognition of pregnancy in the mare: a mini review. **Revista Lusófona Ciência e Medicina Veterinária**, Lisboa, v.1, n. 1, p.5-9, jan. 2007.

GATTI, J. L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, n. 1, p. 321-239, July 2004.

GINTHER, O. J. et al. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 22, n. 4, p. 401-408, Oct. 1984.

GINTHER, O. J. et al. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 20, n. 6, p. 684-693, July 2008.

GINTHER, O. J. et al. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17β-estradiol at the time of ovulation in mares **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, n. 1/2, p. 178-182, Jan. 2010.

GINTHER, O. J. et al. Embryonic loss in mares: incidence and ultrasonic morphology. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 24, n. 1, p. 73-86, July 1985.

GINTHER, O. J. et al. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, n. 1/2, p. 315-323, Jan. 2005.

GOTZE, R. **Insemination and infertility in domestic animals**. Schaper: Hannover, 1949.613 p.

GOUDET, G. et al. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 2, p. 232-245, Aug. 1997.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

GRAHAM, J. K.; LOOMIS, P. R. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallionsperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 1/2, p. 119-128, Apr. 2008.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: _____. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 513-535.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HARTMAN, D.L. et al. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 76, n. 1, p. 143-152, July 2011.

HEIDLER, B. et al. Body weight of mares and foals, estrous cycles and plasma glucose concentration in lactating and non-lactating Lipizzaner mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v.61, n. 5, p. 883-893, Apr. 2004.

HERDBERG, Y. et al. Effect of ACTH (tetracosactide) on steroid hormone levels in the mare: part A, effect in intact normal mares and mares with possible estrous related behavioral abnormalities. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 100, n. 1/2, p. 73-91, July 2007.

HERMANN, M. et al. Aging of the male reproductive system. **Experimental Gerontology**, Amsterdam, v. 35, n. 9, p. 1267-1279, 2000.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A.L. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 5, p. 1402-1408, May 2000.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 3-22, Aug. 2000.

HURTGEN, J.P. Management of embryo donor mares with chronic infertility. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 54., 2008, San Diego. **Proceedings...**San Diego: AAEP, 2008. p.414-417.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners**, Philadelphia, v. 8, n. 1, p. 129-148, 1992.

KLUG, E. et al. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 60, n. 6, p. 1153-1164, Feb. 2003.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperminduced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 41, n. 3, p. 629-636, Feb. 1994.

LAGNEUAX, D. et al. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos EMBRYO TRANSFER IV. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 25, p. 94-97, 1997. Supplement.

LOPES, E.P. et al. Reproductive parameters of Mangalarga Marchador mares in a commercial embryo transfer programme. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v.46, n. 2, p.261-267, Apr. 2011.

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 39-49, 2006.

LOVE, C. C. Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: YOUNGQUIST, R. S.; THARELFALL, W. R. (Ed.). **Current therapy in large animal**. 2nd ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1/4, p. 39-45, Oct. 2005.

MCCUE, P. M. Embryo recovery procedures and collections success: results of 492 embryo-flush attempts. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 56., 2010, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: AAEP, 2010. p. 318-321.

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**, Los Angeles, v. 29, p. 1055-1063, 1988.

MCKINNON, A. O. et al. Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 25, n. 4, p. 321-323, July 1993.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related technologies. In: _____. **Current therapy equine reproduction**. Missouri: Saunders, 2007. p. 319-334.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 763p.

MOORE, I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 63, n. 9, p. 2372-2381, June 2005.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 31, p. 387, 1972.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical transfer of equine embryos. **Archives of Andrology**, New York, v. 5, p. 108, 1980. Abstract.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 13, p. 203-216, 1980.

PALMER, E.; GUILLAME, D. Photoperiodism in the equine species: what's a long night? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 28, n. 1/4, p. 21-30, July 1992.

PAPA, F. O. et al. Methodological innovations in the Biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 19-27, 2005. Supplement 1.

PARKS, E.J.; GRAHAN, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Los Angeles, v.38, n. 2, p. 209-222, Aug. 1992.

PERES, K. R. T. et al. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 57, n. 9, p. 2299-2309, June 2002.

PERLA, D. C. et al. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. **Revista Brasileira Reprodução de Animais**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 27-31, jan./mar. 2007.

PESSOA, M.A. Custos envolvidos em central de reprodução equina (central de TE). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, São Paulo, v. 41, p. 99-102, 2012.

PICKETT, B. W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 26, p. 167-174, 1975.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993. p. 161-171.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the pre-ovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 24, p. 359-368, 1985.

RESENDE, A. M. **Efeito do tratamento anti-inflamatório na histologia endometrial, produção de prostaglandina e taxa de gestação após transferência de embriões e/ou manipulação cervical em éguas**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

RICKETTS, S. W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, New Market, v. 23, n. 3, p. 189-192, May 1991.

ROCHA FILHO, A.N. et al. Transfer embryos into anovulatory recipients supplement with short or long acting progesterone. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 91-95, Oct./Dec. 2004.

ROSER, J.F. Testicular function and fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, Fordham, v. 20, n. 2, p. 90-93, 2000.

SAMPER, J.C. **Artificial insemination**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 131 p.

SAMPER, J. C. Techniques for artificial insemination. In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFALL, W.R. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. 2nded. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 37-42.

SAMPER, J. C. et al. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3/4, p. 219-228, Dec. 2001.

SILVA FILHO, J.M. **Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas**. 1994. 497 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.

SOUZA, F.A.et al. Taxa de concepção de éguas submetidas a duas frequências de palpação retal (24 e 12 horas) e cobertas após a ovulação. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 146-151, 2008.

SQUIRES, E. L. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary**, New York, v. 26, n. 5, p. 215-218, May 2006.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University, 1999. 4 p. (Bulletin, 9).

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

SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. S.; SHILDER, R. K. Use of ultrassonografia in reproductive management of mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 29, p. 55-70, 1988.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Collection and transfer of equine embryos. In: _____. **Animal reproduction Biotechnology laboratory bulletin**. Fort Collins: Colorado State University, 1995. p.397.

TRISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 53-59, 1979.

TRISCHNER, M.; NIEZGODA, J.; TRISCHNER, M. Intensity of stress reaction in the mare during transportation at different stages of ovarian activity and pregnancy. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 234-237, Apr. 2006.

VALLE, G.R.et al. Nuclear estrogen and progesterone receptors in the oviduct of heifers under natural and superovulated estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.101, n. 1/2, p.28-37, Sept. 2007.

VANDERWALL, D. K. Current equine embryo transfer techniques. In: BALL, B. A. (Ed.). **Recent advances in equine theriogenology**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000. p. 1-8.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, R. W. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. 2nded. Saint Louis: W.B. Saunders, 2007. p. 211-218.

VOGELSANG, S.G. et al. Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 383-386, 1979.

WATSON, E. D. et al. Insulin-like growth factors-I,II and insulin-like growth factor binding protein-2 in dominant follicles during spring transition and the ovulatory season. **Reproduction**, Cambridge, v. 128, n. 3, p. 321-329, Sept. 2004.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60/61, n. 2, p. 481-492, July 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WEBB, S. et al. Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Fordham, v. 20, n. 3, p. 191-194, Mar. 2000.

YOUNG LAI, E.V. Steroid content of the equine ovary during the reproductive cycle. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 50, p. 589-597, 1971.

ZÚCACARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula equina**. 1998. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

ZULU, V. C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor-1 as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. **Theriogenology**, Los Angeles, v.64, n. 8, p.657-665, Aug. 2002.